



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

193  
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE DIFERENTES MEDIOS SOBRE LA VIABILIDAD  
DE TIMOCITOS DE CONEJO IN VITRO"

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G A  
P r e s e n t a

GABRIELA ROSAS SALGADO

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Enero de 1992.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## CUADRO DE CONTENIDO.

RESUMEN.....	2
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.	
Ciclo celular.....	6
El cultivo celular.....	8
Viabilidad celular.....	12
El cultivo de timocitos como modelo experimental.....	14
Planteamiento del problema.....	17
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.	
Obtención, siembra e incubación de timocitos.....	20
Determinación de la viabilidad celular.....	21
Determinación del contenido de DNA y proteínas.....	21
RESULTADOS.	
Medición de la viabilidad y de la sobrevivencia celular.....	24
Ajuste de las curvas de sobrevivencia.....	24
Contenido de DNA y proteínas.....	25
DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	27
APENDICES.	
I Cronología.....	40
II Composición del medio TC-199.....	42
REFERENCIAS.....	44

## RESUMEN.

El suero fetal de bovino (SFB) se usa frecuentemente como complemento en los medios de cultivo de diferentes células, entre ellas el linfocito, el cual se utiliza para investigaciones diversas. En el presente trabajo se determinó el efecto del SFB sobre la viabilidad de linfocitos in vitro no estimulados.

Se obtuvieron timocitos de conejos machos de 1.5 Kg y se incubaron hasta 50 horas a 37°C en medio TC-199 con antibióticos y glutamina o en el mismo medio complementado con 20% de SFB. La viabilidad se cuantificó con azul tripano. Se hicieron curvas de sobrevivencia a lo largo del tiempo y se observó que las células en medio TC-199 tienen una tasa de mortalidad alta en las primeras 5 horas que posteriormente se estabiliza. Las células en medio complementado presentan una tasa de mortalidad inicialmente baja que se incrementa al transcurrir el tiempo.

Los datos se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$\log lx = \log lo - (t/t_{max})^m$$

donde  $lx$  es la sobrevivencia,  $lo$  ó son la sobrevivencia inicial,  $t$  el tiempo,  $t_{max}$  la longevidad de las células in vitro y  $m$  es un parámetro que depende del tipo de la sobrevivencia.

Las extrapolaciones indican que la longevidad de las células en ambas condiciones de incubación es entre 60-70 horas. Se concluye que el SFB aumenta la sobrevivencia de las células pero no su longevidad in vitro y al parecer no hay efectos densodependientes en la sobrevivencia de las células en las condiciones particulares de nuestros experimentos. Las células que se mantuvieron en medio complementado presentaron curvas de sobrevivencia de tipo I, mientras que las que se mantuvieron en medio sin suero la presentaron de tipo III.

## INTRODUCCION.

Una de las técnicas más empleadas para el estudio de la célula es su mantenimiento in vitro. El cultivo de células y de tejidos ha cobrado importancia dentro de la biología básica y de la biotecnología ya que con las condiciones apropiadas, muchos tipos de células pueden sobrevivir, multiplicarse y a menudo, expresar diferentes grados de diferenciación en condiciones in vitro. Así, es posible determinar el efecto de moléculas específicas, como hormonas o factores de crecimiento; obtener poblaciones homogéneas para realizar análisis bioquímicos o realizar estudios de interacción entre diferentes tipos celulares. Por otra parte, estos cultivos tienen la ventaja de que permiten estudiar la complejidad del comportamiento celular en condiciones controladas, pudiendo extrapolarse con cierta medida a situaciones in vivo. Hoy en día, hay una gran variedad de tipos celulares que se pueden mantener y estudiar en cultivo entre los que se podría mencionar a los fibroblastos, osteocitos, condrocitos, miocitos, células epiteliales, células gliales, neuronas, células endócrinas, melanocitos y diferentes tipos de células tumorales. Una de las células más utilizadas dentro de este campo es el linfocito, ya que puede adaptarse fácilmente a las condiciones de cultivo y su obtención es sencilla. Los linfocitos, cuando se mantienen en cultivo, tienen propiedades que los hacen únicos para el estudio de las funciones celulares y se ha visto que la presencia del suero fetal de bovino (SFB) les proporciona condiciones adecuadas para su sobrevivencia y división, cuando son estimulados. Ya que el cultivo celular se utiliza rutinariamente, un considerable esfuerzo de investigación se orienta hacia el desarrollo de medios de cultivo más estables. Toda información que brinde conocimiento acerca del efecto de los componentes de los medios de cultivo sobre la sobrevivencia de las células, resulta de interés.

Para evaluar las condiciones de un cultivo (cuando las células se dividen) o de una incubación (cuando las células no se

dividen) se puede emplear un parámetro como la viabilidad, la cual se define como el número de células que se mantienen vivas en determinadas condiciones en un momento dado. Con el estudio de las células in vitro es factible hacer estudios de poblaciones en el laboratorio, como se ha hecho con bacterias donde se estudian las relaciones poblacionales de las células y la forma en que estas modifican al medio. Dichas relaciones pueden ser descritas a partir de modelos de crecimiento poblacional. La ecuación que Verhulst desarrolló en el siglo XIX establece que el cambio de densidad (N) de una población con respecto al tiempo en un medio con nutrientes limitados es:

$$dN/dt = \alpha N - \tilde{N}^2$$

donde  $\alpha$  es la diferencia neta entre las tasas de natalidad y mortalidad intrínsecas y  $\tilde{N}$  es un factor que depende de la depleción de nutrientes. Las tablas de vida describen, entre otras cosas, la esperanza de vida de una población de acuerdo a la longevidad de los individuos que la integran y los parámetros que consideran son intervalos de edades, número de individuos, sobrevivientes al comienzo del intervalo de una edad determinada, proporción de individuos que sobreviven para comenzar el intervalo que corresponde a otra edad determinada, tasa de mortalidad en los intervalos de edades y media de la esperanza de vida (Bertalanffy 1976, Hutchinson 1978, Krebs 1985). Las tablas de vida fueron creadas por Raymond Pearl en 1921 quien reconoció 3 tipos principales de curvas de sobrevivencia: la de tipo I, que representan poblaciones cuya mortalidad es escasa en los individuos jóvenes pero es alta en los individuos de edad avanzada y se observa en poblaciones humanas de países industrializados. La curva de tipo II presenta una tasa constante de mortalidad independiente de la edad y se observa en muchas especies de aves y reptiles. La curva de tipo III, se caracteriza por una mortandad muy alta en las primeras etapas de vida de los organismos como se puede observar en los peces (Krebs 1985). En

el objetivo de este trabajo se concibe el cultivo celular como una población y su medio. Esto permite el uso de herramientas de análisis que nos dan un punto de vista diferente al habitual en este campo de investigación. Consideramos que esto amplía nuestra visión de la dinámica de las células en estas condiciones y por lo tanto su uso dentro de la Biología.

Desde el punto de vista de la teoría general de los sistemas se pueden comparar fenómenos que pueden ser diferentes, como es el caso de una población de organismos en su medio con un sistema de células que se mantienen in vitro dado que son sistemas que tienen una misma estructura formal, esto es, todas las interacciones que ocurren en el primero ocurren en el segundo (Bertalanffy 1976). El crecimiento de poblaciones con recursos limitados es un caso ilustrativo de las dinámicas de saturación en las que se tiene por un lado la tendencia intrínseca de la población a crecer y la restricción determinada por la cantidad finita de los nutrientes. Muchos fenómenos en la naturaleza presentan este tipo de dinámica y son descritos por ecuaciones parecidas a la de Verhulst como las reacciones autocatalíticas, la cinética enzimática y la producción de rayos láser (Haken 1978). La ecuación de Verhulst supone que los nutrientes estén limitados y uniformemente distribuidos en el medio, los individuos son indistinguibles y también están distribuidos uniformemente. Los cultivos se ajustan bien a estas premisas por lo que puede aplicarse este modelo. No sólo las nociones de la ecología de poblaciones pueden utilizarse para analizar fenómenos celulares, sino que también la ecología de poblaciones puede enfocarse desde las nociones teóricas de ciencias como la bioquímica como es el caso del modelo de Williams que en 1972 aplicó la ecuación de Michaelis-Menten para analizar el crecimiento de poblaciones bacterianas en función de la cantidad de nutrientes (Hutchinson 1978).

## ANTECEDENTES.

### Ciclo celular.

Las células presentan un ciclo en el que se alternan una fase de división o mitosis y una interfase entre las mitosis. Este ciclo en células típicas de mamífero tiene una duración aproximada de 20 horas (Mazia 1974, Karp 1987). La interfase es la que se lleva el mayor tiempo del ciclo celular y se divide en 3 etapas: G1, S y G2, las cuales, por lo general, se distinguen por las moléculas que se sintetizan en cada una de ellas y también por la forma que adoptan las células en cada una de estas fases (Lerner y Dixon 1971, Mazia 1974).

La fase G1 se encuentra entre la mitosis y la fase S que es en la que se sintetiza el DNA, su duración es muy variada (Pardee et al. 1978, Mitchison 1981), en células HeLa tiene una duración de 5 a 6 horas y en células típicas de mamífero tiene una duración de 6 a 8 horas. En la última parte de la fase G1 se producen las proteínas o polipéptidos especializados según las características de las células, como las inmunoglobulinas en el caso de los linfocitos (Lerner y Dixon 1971, Mazia 1974). En los linfocitos T estimulados aumentan los antígenos de diferenciación CD3, CD4 y CD8, así como los de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad. Ya que hay síntesis de proteínas, se cree que en G1 se puede inducir la síntesis de enzimas específicas. En células en cultivo, en esta fase, la célula se une al sustrato (Lerner y Dixon 1971, Mazia 1974). Durante la fase S hay síntesis de proteínas de tipo histonas y se duplica el DNA. Las histonas y otras proteínas cromosómicas se unen rápidamente a las moléculas de DNA duplicado. La duración de esta fase en células típicas de mamífero es de aproximadamente 6 horas, y en células HeLa de 8 a 10 (Lerner y Dixon 1971, Mazia 1974, Darnel et al. 1986). Durante G2 la célula se prepara para la mitosis, ya que se sintetizan algunas proteínas necesarias para la división celular como la proteincinasa soluble que se

encarga de fosforilar las proteínas de la lámina nuclear y la histona H1 (Alberts et al. 1982). Esta fase termina cuando comienza la profase de la mitosis. En células HeLa tiene una duración de 2 a 3 horas y en células típicas de mamífero es de aproximadamente 5 horas (Lerner y Dixon 1971, Mazia 1974). Durante la mitosis las células suelen verse esféricas y no muy unidas al sustrato. En células HeLa tiene una duración de 3 a 4 horas y en células típicas de mamífero es de 1 hora (Lerner y Dixon 1971, Mazia 1974).

Las células pueden también existir en un estado quiescente o no estimulado, en el cual las células no crecen y no se dividen por largos períodos (Pardee et al. 1978). Se plantea entonces el problema de cómo ubicar este estado en el ciclo celular, alrededor del cual existen varias opiniones:

- 1.- La que considera al estado quiescente dentro de G1, por lo que esta fase puede durar indefinidamente (Mazia 1974).
- 2.- La que considera al estado quiescente o no estimulado independiente de G1 y la llama G0 (Pardee 1974).
- 3.- La que divide al ciclo celular en dos etapas, el estado A y la fase B, donde se abarca el estado quiescente o no estimulado dentro del estado A. Dicho estado ocurre después de la mitosis, en el cual su actividad no se dirige hacia la duplicación, en este estado la célula puede mantenerse por largos períodos, en los cuales la probabilidad de dejar este estado se mantiene constante. Al dejar el estado A entra en la fase B, en la cual su actividad se dirige hacia la duplicación. Según esta teoría, la tasa de crecimiento de una población celular se determina por la probabilidad de dejar el estado A, entrar a la fase B, y la muerte celular (Smith y Martin 1973).

Inclinamos nuestra preferencia hacia la segunda teoría, ya que una célula en estado quiescente (también llamado G0) no incrementa su masa, pero puede conservar sus características funcionales de acuerdo al tipo de tejido al que pertenezca, como sería la síntesis y exportación de proteínas en células de hígado o la transmisión de impulsos nerviosos en el caso de las neuronas

(Darnel et al. 1986).

G0 es un estado diferente a G1, ya que en G1 se sintetizan todas las proteínas necesarias para la fase S lo que no ocurre en G0. La diferencia que hay entre G0 y G1 es que la célula en G0 se demora más en llegar a S que cuando está en G1. En G0 disminuye la velocidad de transcripción, por lo cual tiene muy baja actividad de síntesis proteica (Pardee et al. 1978, Darnel et al. 1986).

Las células pueden continuar en estado quiescente o entrar en la fase proliferativa en un momento determinado, que al parecer se encuentra en G1, ya que se sabe que está entre G0 y S. A dicho momento se le conoce como punto de restricción. La naturaleza bioquímica de este punto aún es desconocida (Stiles et al. 1981). El control del punto de restricción permite que las células normales se mantengan vivas cuando las condiciones del medio no son óptimas para el crecimiento. Se ha propuesto que en la transformación de las células malignas se pierde el control sobre dicho punto de restricción (Pardee 1974).

## El cultivo celular.

Numerosos estudios sobre la célula se realizan in vitro ya que se puede trabajar bajo condiciones controladas.

El cultivo de tejidos se inició propiamente en 1907 con un experimento diseñado por Harrison para resolver la controversia sobre la naturaleza sincitial o celular del sistema nervioso. Este experimento consistió en cultivar médula espinal de anfibios. El apéndice I muestra un resumen cronológico de los principales eventos en la historia de los cultivos celulares.

El desarrollo de las técnicas modernas de cultivo se puede esquematizar en tres etapas:

En la primera, hasta la década de los 50's, se emplearon medios que sólo permitían mantener vivas a las células por corto tiempo. En esta etapa se desarrolló el medio 199 de Morgan,

Morton y Parker (TC-199), el cual originalmente se diseñó para prolongar la sobrevivencia de las células de corazón de embrión de pollo sin utilizar ningún suplemento biológico. Morgan y sus colaboradores lograron que la preparación se mantuviera viva entre 4 y 5 semanas. El medio TC-199 también se usó para cultivos de células de músculo de embriones de pollo de 11 días, y se ha utilizado para múltiples estudios de virología (Morgan et al. 1950). Cuando este medio se complementó con suero, éste permitió que hubiera un buen crecimiento de muchos tipos de células sin importar la edad del donador o de las mismas células, lo que se debe al proceso de desdiferenciación celular.

La segunda etapa comenzó en la década de 1950 - 1960 y consistió básicamente en el crecimiento de líneas celulares, se utilizaron sobre todo la L de ratón y la HeLa de humano gracias a las cuales hubo grandes progresos en la elaboración de medios. En esta época surgió el medio basal de Eagle y el Medio Mínimo Esencial (MEM), que se diseñaron para utilizarse con suero dializado. Se elaboraron otros medios que permitían el crecimiento de las líneas celulares sin ser suplementados con elementos biológicos (Ham y McKeehan 1979).

En la tercera etapa, que comenzó en 1960, se desarrollaron medios que permiten que las células se adapten al cultivo, puedan reproducirse e incluso diferenciarse. Un logro importante en los últimos años ha sido el de controlar el contenido de sustancias que se requieren en muy poca cantidad como factores de crecimiento, hormonas y elementos traza que antes se agregaban como parte de los suplementos como el suero fetal (Ham y McKeehan 1979).

Un medio de cultivo químicamente definido está formado por agua y compuestos químicos que están completamente libres de impurezas (Ham y Sullivan 1977). Los medios de cultivo típicos están constituidos por mezclas definidas de nutrientes de bajo peso molecular que se disuelven en un amortiguador fisiológico de solución salina y que tratan de imitar, en lo posible, las condiciones fisiológicas en las que se encuentran las células

(Waymouth 1965). El término nutrientes se restringe a sustancias que pueden penetrar a la célula y ser utilizadas como substratos para el metabolismo. Muchos medios también contienen unos pocos componentes que no son nutritivos como el rojo fenol que es un indicador del pH y algunas veces Hepes como amortiguador, al igual que algún tipo de antibiótico para evitar la contaminación del cultivo por hongos o bacterias. En los medios de cultivo típicos se ven los siguientes componentes: iones, carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y bases nitrogenadas que suelen ser complementados con alguna solución de origen biológico como lo es el suero de caballo, el suero fetal de ternera o extractos de embriones de pollo (Alberts et al. 1982, Ham y McKeehan 1979).

La base para la elaboración del medio de cultivo es una solución salina balanceada que usualmente contiene los iones sodio, potasio, magnesio, calcio, cloro, bicarbonato, sulfatos y fosfatos. Estos iones se requieren tanto para mantener el balance osmótico y el pH como para preservar las características eléctricas de las células. Esta solución salina puede complementarse con glucosa. Estos elementos no son nutrientes en el sentido estricto de la palabra, pero su requerimiento es universal, y la mayoría de ellos tienen papel de cofactores en los diferentes procesos enzimáticos. Normalmente esta solución se usa para diluir los demás compuestos que integran el medio de cultivo (Penso y Bladizzi 1963, Ham y McKeehan 1979, Freshney 1984).

Los elementos traza suelen venir en cantidades muy pequeñas como contaminación en los componentes que se utilizan para la preparación del medio. En el caso de los medios químicamente definidos vienen incluidos en su lista de ingredientes. En general son cobre, manganeso, molibdeno y vanadio (Ham y McKeehan 1979, Freshney 1984).

Los azúcares que se utilizan por lo general son los de 6 carbonos y son la fuente de energía metabólica principal. El azúcar más usado es la glucosa aunque en algunos medios se utiliza la galactosa ya que ésta se metaboliza más lentamente,

pero acidifica el medio. También hay reportes en los que se utiliza piruvato y ribosa en lugar de glucosa, pero esta mezcla es poco usada (Ham y McKeehan 1979).

Los L-aminoácidos que se agregan al medio de cultivo son de tipo esencial como la cisteína, tirosina, arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina y valina. La glutamina se necesita como fuente de nitrógeno y de carbono. En algunos casos una cantidad suficiente de cisteína puede elaborarse a partir de metionina, que es favorable para la multiplicación de las células. Entre los aminoácidos no esenciales están la serina, asparagina, prolina, glicina. Se sabe que la serina frecuentemente se requiere para cultivos que son densodependientes. La asparagina se necesita para el cultivo de ciertas células malignas.

La prolina se requiere para algunas células de ovario de hamster y puede ser benéfica para una población de células que sean dependientes de otras células. La glicina es algunas veces esencial cuando hay deficiencia de ácido fólico o cuando el metabolismo del mismo ácido es ineficiente. Los 20 aminoácidos que tienen que ver con la síntesis de proteínas se incluyen en los medios de cultivo lo cual es benéfico porque reducen mucho la biosíntesis celular y esto hace posible manipular experimentalmente condiciones que hacen que el crecimiento sea dependiente de los aminoácidos que normalmente no son esenciales (Ham y McKeehan 1979, Freshney 1984). Normalmente las células requieren de: vitamina B, ácido fólico, ácido pantoténico, piridoxina y tiamina. La vitamina B12 y el ácido lipoico probablemente se requieren, pero no hay muchos antecedentes (Ham y McKeehan 1979, Freshney 1984).

La colina y el inositol, al igual que el mesoinositol son requeridos por muchos tipos celulares. Estos compuestos son sustancias hidrosolubles que actúan como factores de crecimiento en algunos organismos y células. El inositol es un derivado del ciclohexano completamente hidroxilado, que existe en varias formas estereoisómeras. La colina es componente de los

fosfolípidos y forma la parte no polar de los mismos. (Ham y McKeehan 1979, Lehninger 1982, Freshney 1984).

Hay células que para cultivarse requieren de sustancias adicionales, como la adenina, la hipoxantina y la timidina. Algunos tipos de células tienen requerimientos específicos de ácidos grasos. En algunos casos también se necesita el colesterol. La putresina y otras poliaminas se requieren para el crecimiento de células de ovario de hamster chino, en un medio libre de proteínas (Ham y McKeehan 1979).

De los suplementos biológicos mencionados en un principio el más utilizado, al parecer porque es el más efectivo para promover la proliferación celular, es el SFB, ya que contiene un gran número de diferentes factores de crecimiento. El suero completo contiene muchos de los nutrientes de bajo peso molecular necesarios para la multiplicación celular. Se sabe que aporta nucleósidos, intermediarios del ciclo de Krebs, piruvato, lípidos y principalmente proteínas como albúmina, globinas, fibronectina, macroglobulinas. También contiene factores de crecimiento epidérmico y de fibroblastos. Hay hormonas presentes como la insulina, la de crecimiento, las somatomedinas y las esteroides. El suero también aporta proteínas acarreadoras para sustancias insolubles como los lípidos (Ham y Sullivan 1977, Ham y McKeehan 1979, Freshney 1984). Una ventaja que ofrece el suero es que con sus proteínas puede neutralizar el efecto de la tripsina y de otras proteasas. Por otro lado, se sabe que el suero tiene un efecto indefinido sobre la interacción entre la célula y el sustrato, aunque este efecto se puede sustituir con polilisina (Ham y Sullivan 1977, Ham y McKeehan 1979, Freshney 1984).

#### Viabilidad celular.

El estado de un cultivo se determina por diferentes criterios, como la secreción de compuestos celulares, la síntesis proteica, el aspecto general de las células así como la

viabilidad de las células que se encuentran en él. La viabilidad se define como la proporción de células vivas que se encuentran en un momento determinado del cultivo.

Existen varias técnicas para medir la viabilidad celular. Una de las más utilizadas es el conteo de células tanto teñidas como no teñidas por algún colorante en un hemocitómetro (Dickson 1970, Phillips 1973, Holden et al. 1973, Patterson 1979). Estas pruebas se basan en el hecho de que las células que son viables pueden excluir dichos colorantes por procesos de transporte activo, mientras que las células que no son viables no tienen esta capacidad debido a que su membrana y su metabolismo están afectados (Dolan 1965, Patterson 1979). Numerosos colorantes han sido utilizados para diferenciar a las células vivas, no teñidas, de las muertas como el azul tripano, la eritrosina B, la nigrosina, la eosina, el naranja de acridina, el verde lisamina, el rojo congo, y el azul de metileno (Dolan 1965, Dickson 1970 Phillips 1973, Daly 1973, Patterson 1979). Con conteos realizados en el hemocitómetro se puede calcular el número total de células vivas y muertas que se encuentran en una suspensión dada (Absher 1973). Se ha establecido que hay algunas fuentes de error inherentes al conteo en el hemocitómetro como son la inadecuada dispersión de las células, inexactitud en la dilución, una mala resuspensión del medio del cual se toma la muestra, rebasar el límite volumétrico de la cámara, la presencia de burbujas o de partículas extrañas y la distribución de las células en la cámara o error de campo. Algunos estudios hechos ex profeso sobre la determinación de la viabilidad estiman que estos factores suman de un 10% a un 20% de error (Berkson et al. 1939, Absher 1973).

Hay otras técnicas que miden las condiciones de vitalidad de las células como lo es la propuesta por Dickson en 1970, quién encontró que la absorción de aminoácidos no metabolizables que se marcan con radioactividad depende de un complejo acarreador que se encuentra en la membrana y que realiza transporte activo semejante a una bomba de aminoácidos, por lo cual, el hecho de que la célula tome los aminoácidos y los acumule dentro de sí.

puede usarse como una prueba de viabilidad celular. Dickson demostró que las células que tienen la capacidad de concentrar los aminoácidos no metabolizables corresponden directamente a aquellas células que excluyen al azul tripano.

Otra forma de evaluar las condiciones del cultivo se basa en el movimiento que presentan las células, lo que se puede captar a través de filmaciones. Un ejemplo de esto es el movimiento por pseudópodos que realizan los fibroblastos (Dolan 1965). Por medio de la microscopía de contraste de fases se puede monitorear la habilidad de las células para unirse a la superficie del recipiente de cultivo, la integridad de su membrana al igual que su apariencia general. Con estos últimos procedimientos sólo se tiene una evaluación cualitativa de las condiciones del cultivo (Bashor 1979).

**El cultivo de timocitos como modelo experimental.**

Los linfocitos son las células responsables de la respuesta inmune y se encuentran en abundancia en la sangre, la linfa y los tejidos linfoides. Los linfocitos se denominan como T ó B según se originen en el timo ó el bazo.

El timo es una glándula linfoide situada a ambos lados de la tráquea, en el espacio mediastínico anterior. Con el tiempo y la madurez del organismo, el timo tiende a disminuir su tamaño (Burnet 1962, Frandson y Whitten 1985).

Se origina en el embrión a partir de la tercera y cuarta bolsa faríngea y está formado por lóbulos y éstos a su vez por lobulillos

que se unen entre sí por tejido conectivo laxo. Cada lobulillo presenta una parte medular y una cortical (Trautman y Fiebiger 1950, Osoba 1972, David 1985). Las poblaciones celulares que están presentes en el timo son: a) Epiteliales, que forman la cápsula de los lobulillos; b) Tejido conjuntivo, que forma la corteza que recubre a la cápsula de los lobulillos, c) Macrófagos tímicos y d) Linfocitos T, que son los más abundantes (Ham y Cormack 1983, David 1985). Junto a la corteza están las células que originan a los timocitos que son los linfoblastos, los cuales entran al timo durante el proceso embrionario, provienen de la médula ósea (Osoba 1972, David 1985) y proliferan abundantemente. En el momento del nacimiento, la tasa de división de estas células es mayor que en las demás células del cuerpo (Ham y Cormack 1983, David 1985). Los linfocitos viajan de la corteza de cada lobulillo a la médula del mismo, donde se diferencian bajo la influencia de las células epiteliales y posiblemente también por sustancias secretadas por los macrófagos tímicos. Es durante este viaje cuando los linfocitos maduran. La madurez de los linfocitos se manifiesta como cambios en los antígenos de superficie de su membrana que los hacen capaces de responder a un estímulo dado por las partículas extrañas contra los que han sido preparados, es decir, están maduros y listos para responder a un estímulo antigénico cuando éste se presente (David 1985).

El epitelio del timo sintetiza muchos factores que actúan como hormonas y probablemente desempeñen el papel principal de la regulación y diferenciación de las células T (Ham y Cormack 1983). Las sustancias proteínicas que han sido aisladas desde 1965 y que se han propuesto como hormonas tímicas son: Hormona Tímica Homeostática (HTH), Factor Humoral Tímico (THF) y Hormona Estimulante de los Linfocitos (LSH). La HTH y la LSH incrementan la cantidad de linfocitos con respecto a la de leucocitos polimorfonucleares mientras que la timocina y la THF estimulan la inmunidad mediada por células. También se ha aislado la timopoyetina que se secreta hacia la sangre y hace que los animales se tornen inmunológicamente competentes. La timopoyetina

hace que los linfocitos se diferencien a partir de las células precursoras ya que participa en la formación de marcadores de superficie. En 1973 se aisló un esteroide tímico denominado timoserina que inhibe tanto la linfopoyetina como el crecimiento tumoral (Ham y Cormack 1983, Stites et al. 1983, Frandson y Whitten 1985)

De las diferentes poblaciones celulares que integran al timo, la más abundante es la de timocitos los cuales tienen características como el ser responsables de la respuesta inmune, tanto celular como mediada por anticuerpos. A su vez, esta población se divide en varias subpoblaciones que tienen diferentes funciones, localización, grados de madurez, tiempo de vida y marcadores de superficie. Las células cooperadoras o auxiliares tienen el antígeno de superficie T4 ó CD4, brindan el factor T auxiliar que facilita las reacciones inmunitarias a otros timocitos o a linfocitos B especializados y actúan sobre los macrófagos. Las células supresoras inhiben las reacciones inmunitarias humorales o mediadas por células. Finalmente, las células citotóxicas destruyen específicamente a células extrañas o infectadas por virus. Tanto las células supresoras como las citotóxicas tienen el antígeno de histocompatibilidad T8 ó CD8. Los linfocitos de memoria y los amplificadores se encuentran dentro del bazo y del timo, son menos maduros que las circulantes, su vida es más corta y participan en conservar y ampliar la base de la población de linfocitos T (Stites et al. 1983, David 1985). A las células cooperadoras y a las supresoras Alberts et al. (1982) las han llamado también reguladoras. Al encontrarse con el antígeno contra el cual reaccionan específicamente, los linfocitos crecen, proliferan y se diferencian en los subtipos celulares anteriormente mencionados, por lo cual, el timocito virgen ó no estimulado y la célula especializada representan respectivamente el principio y el final de un proceso de diferenciación, lo que debe considerarse cuando se cultivan timocitos.

Los receptores de las células T sólo reconocen al antígeno

cuando éste se presenta junto con su antígeno de histocompatibilidad HMC y forman juntos un complejo que es presentado sobre la superficie de un macrófago. Las células T4 y algunas citotóxicas requieren del HMC de tipo II y la mayoría de las T8 requieren del HMC de tipo I. La capacidad de los timocitos para reconocer su respectiva molécula de HMC se determina en el timo antes de que el linfocito se exponga al antígeno (David 1985).

Cuando los timocitos colaboradores responden al antígeno segregan sustancias que activan a otros linfocitos como es el factor de crecimiento de las células T o interleucina 2, que se une a los receptores de superficie de las células T activadas y estimula su proliferación (Alberts et al. 1982).

Los linfocitos tienen propiedades que, cuando se les mantiene en cultivo, les hacen muy útiles para investigaciones de la fisiología celular en general y particular de estas células (Lerner y Dixon 1971). Dichos estudios incluyen el metabolismo, la división celular, la diferenciación celular, la regulación génica, la mutagénesis, la citoestructura, citogenética, comunicación celular, el intercambio de sustancias entre la célula y su medio así como los procesos particulares de la respuesta inmune.

Los linfocitos son abundantes, se obtienen con facilidad y se adaptan bien a las condiciones de cultivo. Como se cultivan en suspensión, el manejo del cultivo es sencillo. Se conoce bien la forma de estimular su actividad mitótica o de mantenerlos en estado quiescente por lo que es relativamente fácil controlar la fase del ciclo celular en que los linfocitos se encuentren. Actualmente, los cultivos de linfocitos son rutinarios en los laboratorios de investigación y de análisis clínicos.

#### Planteamiento del problema.

El problema de mantener células en cultivo radica

básicamente en que existe un gran número de necesidades nutricionales que se deben cumplir para proporcionar a las células las condiciones adecuadas para sobrevivir y dividirse en cultivo. Por otro lado, las diferentes variables que existen entre las células y el medio forman una red muy complicada de interacciones que no es posible analizar individualmente. Por ello es preferible analizar el problema de la nutrición de las células in vitro desde un punto de vista global u holístico y ésto ha dado lugar al uso de sueros como suplementos de los cultivos. El suero hace perder el control de la composición química del medio de cultivo por lo que se necesita probar diferentes tipos de suero y en diferentes concentraciones hasta encontrar la mejor para las células que se desee cultivar (Ham y McKeehan 1979).

Las células que se mantienen en cultivo son un buen modelo para el estudio de la interacción de las células con el medio y para observar cómo es que estas interacciones varían de acuerdo a las condiciones ambientales, de ahí que resulte de interés para nosotros el concebir al sistema célula-medio in vitro desde el punto de vista de la ecología de poblaciones. Este enfoque puede brindar información para optimizar el uso de esta herramienta tan empleada en la Biología moderna.

Ya que el uso del SFB permite simular mejor el medio extracelular, se espera que incremente la viabilidad celular en comparación a un medio sin SFB. Se sabe bien que el uso de sueros mejora el estado de los cultivos permitiendo incluso que algunos tipos de células diferenciadas como los fibroblastos proliferen en estas condiciones. Lo que se trata en este trabajo es determinar la influencia del SFB en la viabilidad celular con respecto al tiempo, lo cual puede analizarse con el modelo de Verhulst y con tablas de vida. La determinación de las ecuaciones que se ajusten a los datos pueden entonces interpretarse en la fenomenología específica de las células en cultivo y con ello, contribuir a clarificar el efecto de los sueros en los cultivos celulares.

El objetivo de este trabajo es analizar los cambios de viabilidad de timocitos de conejo in vitro ocasionado por el SFB a lo largo del tiempo, para lo que se considerará al cultivo celular como una poblacion en su medio, lo que permite utilizar herramientas de analisis que dan un punto de vista diferente al cotidiano en este campo de investigacion.

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.

### Obtención, siembra e incubación de timocitos.

Los experimentos de este trabajo se realizaron con células de timo de 5 conejos jóvenes, de entre 1.5 y 2.0 Kg.

El pecho del conejo se abrió en forma de V, se partió de la base del esternón hacia las articulaciones de la cintura pectoral para dejar al descubierto el timo el cual se colocó sobre una rejilla de acero inoxidable contenida en una caja de petri pequeña, se le agregaron 3 ml de TC-199 (Difco 5477) a 37 °C y se dispersó la glándula mecánicamente. Cuando el medio se enturbió por la presencia de las células disgregadas, se colocó en un tubo de centrifuga. Este procedimiento se repitió hasta que sólo quedó tejido conjuntivo en la rejilla.

Los tubos que contenían las células se centrifugaron a 1000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante, y al botón se le agregó amortiguador lisador preparado con 4.5 gr. de cloruro de amonio (Mallinckrot 3384), 1.0 gr. de Tris-hidroximetil amino metano (Sigma 5280), 500 ml de agua destilada, y pH ajustado a 7.3 con HCl concentrado, a 37 °C y hasta 5 ml para eliminar eritrocitos.

Se resuspendieron las células y se incubó a 37 °C por 5 minutos. Se centrifugó a 1000 rpm durante 10 minutos, se retiró el subrenadante y los posibles eritrocitos que pudieran haber quedado sobre el botón. A cada tubo se le agregaron hasta 2 ml de TC-199 a 37 °C y se resuspendió el botón suavemente. Las suspensiones de células de los diferentes tubos se juntaron en uno solo del cual se tomó una alícuota de 0.05 ml y se diluyó en 9.95 ml de medio F10 (Gibco 239) a 37 °C. Se resuspendió y se tomaron 0.9 ml de la suspensión, a la que se le agregaron 0.1 ml de azul tripano (Sigma 468) al 5% en medio TC-199, para conocer el número de células vivas por ml y a partir de este dato

calcular el volumen necesario para sembrar aproximadamente 3.5 millones de timocitos vivos en 1 ml de medio.

Las muestras sembradas se incubaron en 2 diferentes condiciones a 37 °C:

1) Medio TC-199.

2) Medio TC-199, complementado con 20% de SFB (Difco 506555) previamente inactivado a 60 °C durante 30 minutos).

Por cada 1 ml de medio se agregó glutamina 0.5% (Difco 5789), 100 unidades de penicilina, 100 µg de estreptomicina (Difco 5458) y 300 unidades de heparina (Abbot 3979).

Hay que notar que no se agregó ningún tipo de mitógeno lo que define incubaciones más que cultivos. Por ello los conteos de células vivas corresponden a determinaciones de viabilidad y no de crecimiento.

#### Determinación de la viabilidad celular.

Se hicieron conteos de timocitos cada hora durante 50 horas a partir de la siembra. Se agregaron 0.05 ml de azul tripano como colorante de exclusión a cada muestra (Phillips 1973), se resuspendió y se contaron las células vivas y muertas en un hemocitómetro. Se realizaron 5 siembras para cubrir los conteos de las 50 horas de incubación y la determinación se hizo por triplicado en la mayoría de los tiempos.

#### Determinación del contenido de DNA y proteínas.

Se cuantificó el contenido de DNA y proteínas en las primeras 24 horas de incubación en medio TC-199 complementado con SFB para comprobar que la población celular no aumentara. Para ello, se utilizaron 2 conejos. Las determinaciones se realizaron por triplicado cada 2 horas a partir de la siembra. De la hora 0 a la 10 se utilizó el timo del primer conejo, y de la 13 a la 24

se utilizó el del segundo conejo. Se hicieron las determinaciones al tiempo 0 para ambos conejos.

Para determinar la cantidad de proteínas la muestra se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante hasta 0.2 ml arriba del botón lo que se repitió 2 veces más. Se resuspendió a la velocidad más baja del vortex, se agregó solución salina al 0.85% hasta llegar a un volumen de 3 ml, se centrifugó a 1000 rpm por 10 minutos, se retiró el sobrenadante hasta 0.2 ml por arriba del botón y se congeló. Se descongeló y congeló 2 veces más para romper las células. Una vez descongelada la muestra por segunda ocasión se agregó hasta 1 ml de solución salina al 0.85% y posteriormente se le agregaron 4 ml de reactivo de Lowry (Lowry et al. 1951). Se elaboró una curva patrón con diferentes concentraciones a partir de una solución de albúmina de bovino (Sigma 568) de 1 mg/ml. Se realizó el ensayo de acuerdo a la modificación del método de Lowry por Oyama y Eagle (1956) y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 660 nm.

Para la cuantificación de DNA se sembraron 6 frascos y se utilizaron dos frascos por determinación, de tal manera que se tiene un triplicado para cada tiempo. En el momento en que se cumplía el tiempo requerido de incubación se congelaron las muestras las cuales se mantuvieron en el congelador hasta que se juntaron las muestras correspondientes a todos los tiempos. Todas las muestras se descongelaron y congelaron 2 veces. El contenido de 2 frascos de cultivo se trasvasó a un sólo tubo de centrifuga, se le agregaron a cada tubo 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) (Merck K5011707) al 10% frío y se incubó 5 minutos a 4 °C. Se centrifugó a 2000 rpm por 10 minutos, se deshechó el sobrenadante de manera que quedaran sólo 0.2 ml arriba del botón, se resuspendió con varilla de vidrio, se agregó TCA frío al 10% hasta 5 ml y se repitió el paso anterior. Se agregó TCA al botón hasta 2 ml, se incubaron los tubos a 90 °C por 20 minutos en baño María. Se les dejó enfriar y se les agregó 5 ml de reactivo de Burton (Burton 1955). Se incubaron los tubos de 17 a 18 hrs en la oscuridad y pasado ese tiempo se hicieron las lecturas en el

espectrofotómetro a 600 nm. Se hizo una curva patrón a partir de una solución de DNA de timo de ternera de 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## RESULTADOS.

### Estimación de la viabilidad y de la sobrevivencia celular.

Para analizar las variaciones en la viabilidad de las células en el tiempo, se definió ésta a partir de las cantidades de células vivas y muertas (Cuadros I y II) a diferentes tiempos de la siguiente forma:

$$V(t) = \frac{\text{\# células vivas (t)}}{\text{\# células vivas (t) + \# células muertas (t)}}$$

donde  $V(t)$  es la viabilidad al tiempo  $t$ . Los cambios de viabilidad en el tiempo se describieron con la variable  $lx$  que es la viabilidad referida a la viabilidad inicial como sigue:

$$lx = V(t) / V(0)$$

donde  $V(t)$  es la viabilidad al tiempo  $t$  y  $V(0)$  la viabilidad al tiempo cero.  $lx$  no se estimó a partir del número absoluto de células vivas por la gran variabilidad de los datos experimentales y, con la finalidad de normalizarlos, fue necesario calcular  $lx$  a partir de la viabilidad.

La viabilidad es un valor entre 0 y 1 y el error de medición es cercano al 10% (Berkson et al. 1939, Absher 1973) lo que se representa como sigue:

$$V = [0,1] \pm 0.1$$

De acuerdo a Sokal y Rohlf (1979) el error de  $lx$  ( $\delta lx$ ) que es un cociente es:

$$\delta l_x = \{ (V_o * \delta V_t) - (V_t * \delta V_o) \} / (V_o)^2 = \{ 0, 0.1 \}$$

donde  $\delta V_o$  y  $\delta V_t$  son los errores de la viabilidad inicial y al tiempo T. Así que, dependiendo del valor de la viabilidad, el error en  $l_x$  varía entre 0 y 0.1. Por ello,  $l_x$  no puede estimarse con más precisión que una o dos cifras decimales.

Estimación de la longevidad de las células en cultivo y ajuste de las curvas de sobrevivencia.

Para hacer esta determinación se recurrió a las tablas de vida, las cuales son formatos que describen la mortalidad de los individuos de una población. Estas fueron desarrolladas por demógrafos para las compañías de seguros de vida, los cuales tenían gran interés en conocer qué tanto podía vivir una persona.

Se definen dos tipos de tablas de vida, las de cohorte, que se calculan con base en un grupo de organismos los cuales se van siguiendo a lo largo de su vida y las estáticas que se calculan con base en la distribución de edades de los individuos de una población en un momento determinado. En el presente trabajo, el tipo de tabla de vida que se utiliza es la de cohorte, ya que se describe la mortalidad de una cohorte celular a lo largo del tiempo.

Los parámetros que integran una tabla de vida son los siguientes:

$x$  = intervalo de edad, que en este caso son las diferentes horas de conteo.

$n_x$  = Número de individuos vivos que se presentan al comienzo del intervalo  $x$  determinado, que son el número de células vivas presentes en la muestra.

$l_x$  = Proporción de organismos que sobreviven al inicio del intervalo  $x$ . Como se dijo,  $l_x$  se calculó con base en la viabilidad.

$d_x$  = Número de individuos que mueren en el intervalo de  $x$  a  $x + 1$ .

$q_x$  = Tasa de mortalidad de los individuos en el intervalo de  $x$  a  $x + 1$ .

$e_x$  = Esperanza de los organismos que llegarán vivos a la edad  $x$ .

Las tablas de vida fueron introducidas a la ecología por Raymond Pearl en 1921. Pearl en 1928 reconoce tres tipos generales de curvas de sobrevivencia:

- Tipo I en donde la mayor mortalidad se observa en los individuos mas viejos de la población.
- Tipo II que implica una tasa constante de mortalidad independiente de la edad.
- Tipo III donde los individuos que mueren en mayor cantidad son los mas jóvenes (Krebs 1985).

Se debe aclarar que en las curvas de sobrevivencia la escala de  $lx$  es logarítmica, lo cual refleja la tasa o probabilidad de sobrevivencia per capita de los individuos en cada intervalo (Begon et al.).

Existen expresiones matemáticas para analizar las curvas de  $lx$  que no representan modelos sobre la forma de sobrevivencia de los organismos (Hutchinson 1978). En este trabajo se desarrolló una expresión matemática ad hoc para ajustar las curvas de  $lx$  y estimar la longevidad de las células in vitro.

Si se supone que  $lx$  decae a una tasa constante, se tiene que:

$$\log lx / t = - \log l_0 / t_{\text{max}}$$

donde  $l_0$  es  $lx$  inicial ( $l_0 = 1$ ) y  $t_{\text{max}}$  es la longevidad de las células in vitro. La ecuación de la recta de la Figura 3 estará definida por:

$$\log lx = \log l_0 - t / t_{\text{max}}$$

Esta expresión puede generalizarse de la siguiente forma:

$$\log l_x = \log l_0 - (t/t_a \text{ ax})^m$$

La inclusión de  $m$  determina la existencia de una familia de curvas cuya forma depende de  $m$  como se ilustra en la Figura 3.

El ajuste a ésta ecuación a los datos experimentales se realizó por medio de mínimos cuadrados. El Cuadro III muestra los valores de los parámetros de esta ecuación, así como, algunas medidas de error. Al ajustar los datos del medio TC-199 se tiene el problema de que pequeños errores pueden dar valores de  $t_{max}$  elevados debido a la forma de la curva ajustada. En las Figuras 1 y 2 se observa que, extrapolando los datos experimentales, la longevidad en ambos medios se aproxima al intervalo 70-80 horas. Sin embargo, en la Figura 1 la curva ajustada indica una longevidad de 108 horas. Creemos que esta diferencia se debe a la forma de la curva y la dispersión de los datos.

Se observa que los timocitos incubados en medio TC-199 sin SFB presentan una curva de sobrevivencia tipo III, mientras que la adición de SFB 20% hace que la curva de sobrevivencia sea de tipo I.

#### Contenido de DNA y proteínas.

La cantidad de proteínas y DNA presente en la incubación con medio complementado se muestra en la Figura 5. El contenido de proteínas durante las primeras 10 horas de incubación se mantiene alrededor de 180  $\mu\text{g}$ . En la segunda determinación, que abarcó de la hora 13 a la 24 con su respectiva determinación al tiempo 0, el contenido de proteínas se mantuvo alrededor de 150  $\mu\text{g}$ . El contenido de DNA en las muestras correspondientes al primer conejo se mantuvo alrededor de 28  $\mu\text{g}$  y en el segundo alrededor de 18  $\mu\text{g}$ . Para ambos tipos de determinación las variaciones en el contenido de proteínas y DNA se deben a la variabilidad entre

individuos y no se asocian al tiempo por lo que se puede afirmar que en las primeras 24 horas la cantidad de proteínas y DNA es prácticamente constante.

CUADRO I. Datos de viabilidad correspondientes al medio TC-199.

EXPERIMENTO 1				
TIEMPO horas	CELULAS VIVAS ( miles )	CELULAS MUERTAS ( miles )	CELULAS TOTALES ( miles )	lx
0	4,007	737	4,74	1.0
0.35	2,878	1,472	4,350	0.8
1.07	2,476	1,086	3,562	0.8
1.35	1,440	784	2,224	0.8
2.58	2,580	1,816	4,396	0.7
3.0	1,226	742	1,968	0.7
3.63	1,128	958	2,086	0.6
4.45	1,162	3,718	4,880	0.3
4.95	934	3,228	4,162	0.3
5.65	1,106	1,704	2,810	0.5
5.98	1,360	2,230	3,590	0.4
17.1	1,490	2,580	4,070	0.4
18.37	152	4,148	4,300	0.0
18.81	542	3,708	4,250	0.1
19.01	234	4,340	4,574	0.1
19.51	366	3,438	3,804	0.1
20.21	76	3,940	4,016	0.0
21.05	248	4,094	4,342	0.1
21.6	54	4,494	4,548	0.0
22	330	3,400	3,730	0.1
22.7	148	4,378	4,526	0.0
EXPERIMENTO 2				
1.0	946	362	1,308	0.8
2.0	500	222	722	0.8
3.0	254	178	432	0.6
4.0	950	558	1,508	0.7
5.0	520	792	1,312	0.4
6.0	386	282	668	0.6
7.0	1,044	1,592	2,636	0.4
8.0	206	158	364	0.6
21.0	126	462	588	0.2
25.0	124	470	594	0.2
28.0	350	442	792	0.5
47.0	512	348	860	0.6
48.0	640	480	1,120	0.6
49.0	148	1,242	1,390	0.1
50.0	240	92	332	0.8

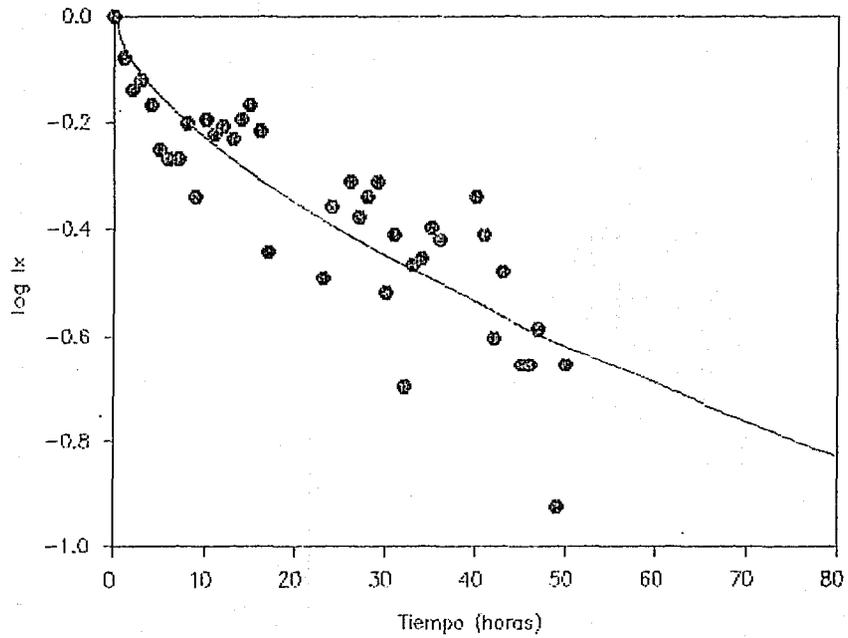
EXPERIMENTO 3

TIEMPO horas	CELULAS VIVAS ( miles )	CELULAS MUERTAS ( miles )	CELULAS TOTALES ( miles )	lx
1.0	3,878	1,322	5,200	0.9
2.0	1,668	1,012	2,680	0.7
3.0	3,180	990	4,170	0.9
4.0	3,002	1,810	4,812	0.7
5.0	2,710	1,382	4,092	0.8
6.0	2,250	2,484	4,734	0.5
7.0	2,130	1,722	3,852	0.6
8.0	2,134	1,750	3,884	0.6
9.0	1,844	2,814	4,658	0.5
20.0	1,398	3,498	4,896	0.3
21.0	1,778	4,044	5,822	0.3
22.0	1,418	3,344	4,762	0.3
23.0	1,638	4,276	5,914	0.3
24.0	1,696	2,736	4,432	0.4
25.0	422	5,820	6,242	0.1
26.0	2,372	3,276	5,648	0.5
27.0	2,124	3,740	5,864	0.4
28.0	1,894	2,956	4,850	0.4
29.0	1,652	3,082	4,734	0.4
30.0	1,352	3,842	5,194	0.3
31.0	1,588	3,118	4,706	0.4
32.0	1,048	4,966	6,014	0.2
33.0	1,376	3,286	4,662	0.3
45.0	1,284	5,438	6,722	0.2
46.0	612	3,934	4,546	0.1
47.0	704	4,516	5,220	0.1
50.0	1,216	5,324	6,540	0.2

EXPERIMENTO 4

TIEMPO horas	CELULAS VIVAS ( miles )	CELULAS MUERTAS ( miles )	CELULAS TOTALES ( miles )	lx
11.0	676	696	1,372	0.6
12.0	602	580	1,182	0.6
13.0	584	616	1,200	0.6
14.0	794	724	1,518	0.6
15.0	762	596	1,358	0.7
16.0	1,016	1,006	2,022	0.6
17.0	258	770	1,028	0.3
18.0	680	1,162	1,842	0.4
19.0	646	1,298	1,944	0.4
20.0	850	966	1,816	0.6
21.0	646	1,236	1,882	0.4
34.0	582	1,434	2,016	0.3
35.0	706	1,464	2,170	0.4
36.0	500	1,094	1,594	0.4
37.0	880	1,202	2,082	0.5
38.0	210	1,400	1,610	0.1
39.0	1,072	710	1,782	0.7
40.0	884	1,428	2,312	0.5
41.0	624	1,308	1,932	0.4
42.0	372	1,430	1,802	0.2
43.0	498	1,336	1,834	0.3
44.0	1,020	1,354	2,374	0.5
46.0	398	1,348	1,746	0.3
47.0	668	1,582	2,250	0.4
48.0	798	1,034	1,832	0.5

FIGURA 1. Curva de sobrevivencia de timocitos de conejo a lo largo de 50 horas de incubación en medio TC-199. Se hicieron 5 experimentos y se representa el promedio cuando se tiene más de un dato para la misma hora. La línea indica el ajuste descrito en el texto. El ajuste indica una longevidad de 108 horas aunque se observa que ésta se aproxima al intervalo 70-80 horas. El coeficiente  $m$  descrito en el texto tiene un valor de 0.625 lo que define que la curva sea de tipo III.



CUADRO II. Datos de viabilidad correspondientes al medio TC-199 con SFB 20 %.

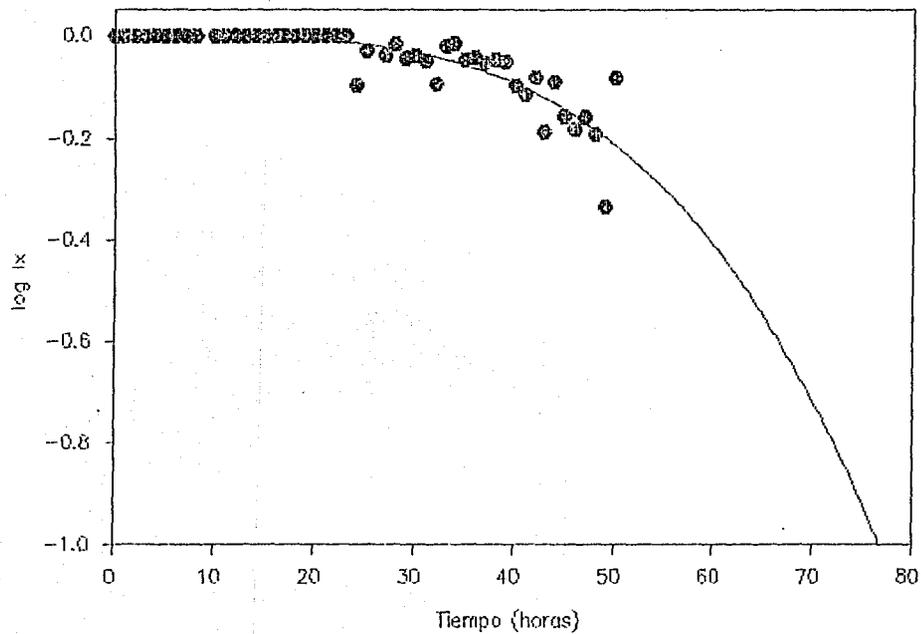
EXPERIMENTO 1				
TIEMPO horas	CELULAS VIVAS ( miles )	CELULAS MUERTAS ( miles )	CELULAS TOTALES ( miles )	lx
0.0	4,588	384	4,972	1.0
1.0	4,316	108	4,424	1.0
2.0	3,818	96	3,914	1.0
3.0	4,086	72	4,158	1.0
4.0	4,054	242	4,296	1.0
5.0	4,038	106	4,144	1.0
18.0	5,310	86	5,396	1.0
20.0	4,356	272	4,628	1.0
21.0	5,162	244	5,406	1.0
22.0	4,576	186	4,762	1.0
23.0	4,894	202	5,096	1.0
24.0	2,702	1,758	4,460	0.6
25.0	3,878	896	4,774	0.9
27.0	3,388	944	4,332	0.8
28.0	3,872	506	4,378	1.0
EXPERIMENTO 2				
0.0	3,910	190	4,100	1.0
1.0	4,162	122	4,284	1.0
2.0	3,584	80	3,664	1.0
3.0	3,660	24	3,636	1.0
4.0	3,698	28	3,726	1.0
5.0	4,014	28	4,042	1.0
6.0	3,808	26	3,834	1.0
7.0	3,606	18	3,624	1.0
8.0	4,076	80	4,156	1.0
22.0	3,740	32	3,772	1.0
23.0	3,442	166	3,608	1.0
24.0	3,324	1,350	4,674	0.7
28.0	3,744	362	4,106	0.9
47.0	1,202	1,156	2,358	0.5
48.0	1,398	1,022	2,420	0.6
49.0	834	1,058	1,892	0.5
50.0	1,144	290	1,434	0.8

EXPERIMENTO 3				
TIEMPO horas	CELULAS VIVAS ( miles )	CELULAS MUERTAS ( miles )	CELULAS TOTALES ( miles )	lx
0.0	3,552	200	3,752	1.0
1.0	3,464	100	3,564	1.0
2.0	3,730	78	3,808	1.0
3.0	3,784	72	3,856	1.0
4.0	3,764	92	3,856	1.0
5.0	4,048	50	4,098	1.0
20.0	3,440	266	3,706	1.0
21.0	2,868	644	3,512	0.9
22.0	3,288	434	3,722	0.9
29.0	2,780	692	3,472	0.8
30.0	3,130	662	3,792	0.9
31.0	2,838	772	3,610	0.8
32.0	2,314	1,546	3,860	0.6
43.0	1,286	1,538	2,824	0.5
45.0	1,438	1,750	3,188	0.5
46.0	1,036	2,142	3,178	0.3
EXPERIMENTO 4				
0.0	7,282	114	7,396	1.0
1.0	8,054	136	8,190	1.0
2.0	6,338	62	6,400	1.0
3.0	6,946	70	7,016	1.0
4.0	7,610	74	7,684	1.0
5.0	7,144	110	7,254	1.0
6.0	6,944	108	7,052	1.0
7.0	7,668	58	7,726	1.0
8.0	7,188	692	7,880	0.9
20.0	7,324	188	7,512	1.0
22.0	7,256	186	7,442	1.0
23.0	7,378	204	7,582	1.0
24.0	7,352	178	7,530	1.0
25.0	7,388	222	7,610	1.0
27.0	7,106	270	7,376	1.0
28.0	8,302	292	8,594	1.0
29.0	7,002	410	7,412	0.9
30.0	6,960	436	7,396	1.0
31.0	5,634	382	6,016	0.9
32.0	6,414	324	6,738	1.0
33.0	6,820	430	7,250	0.9
45.0	6,878	778	7,656	0.9
46.0	7,202	908	8,110	0.9
47.0	5,264	1,362	6,626	0.8
50.0	5,350	1,296	6,646	0.8

EXPERIMENTO 5

TIEMPO horas	CELULAS VIVAS ( miles )	CELULAS MUERTAS ( miles )	CELULAS TOTALES ( miles )	lx
0.0	3,460	162	3,622	1.0
10.0	4,336	72	4,408	1.0
11.0	4,656	80	4,736	1.0
12.0	4,510	64	4,574	1.0
13.0	5,180	120	5,300	1.0
14.0	4,632	84	4,716	1.0
15.0	5,432	102	5,534	1.0
16.0	4,586	96	4,682	1.0
17.0	4,858	114	4,972	1.0
18.0	4,964	108	5,072	1.0
19.0	4,462	122	4,584	1.0
20.0	4,302	98	4,400	1.0
21.0	4,266	246	4,512	1.0
34.0	3,886	346	4,232	1.0
35.0	3,894	660	4,554	0.9
36.0	4,354	684	5,038	0.9
37.0	4,048	748	4,796	0.9
38.0	4,066	690	4,756	0.9
39.0	3,848	696	4,544	0.9
40.0	3,602	1,116	4,718	0.8
41.0	3,700	1,368	5,068	0.8
42.0	3,436	914	4,350	0.8
43.0	3,750	1,064	4,814	0.8
44.0	3,498	1,028	4,526	0.8
46.0	3,274	1,480	4,754	0.7
47.0	3,246	1,382	4,628	0.7
48.0	3,036	1,622	4,658	0.7

FIGURA 2. Curva de sobrevivencia de timocitos de conejo a lo largo de 50 horas de incubación en medio TC-199 complementado con 20% de SFB. Se representan los resultados de 5 experimentos diferentes promediando cuando se tiene más de un dato para la misma hora. El ajuste a la ecuación explicada en el texto, representado por la línea, indica una longevidad de 77 horas y el valor de  $m$  es 3.62 lo cual define una curva de tipo I.



CUADRO III. Parametros de ajuste de las curvas de sobrevivencia.

		TC-199 COMPLEMENTADO	TC-199
m		3.623	0.62
	desviación estandar	0.55	0.086
	coeficiente de variación (%)	15.2	13.84
	dependencia	0.95	0.87
tmax		76.7	108.4
	desviación estandar	6.50	19.35
	coeficiente de variación (%)	8.5	17.85
	dependencia	0.95	0.87

FIGURA 3. Representación de diferentes formas del decaimiento de la sobrevivencia en función del parámetro  $m$  de la fórmula de sobrevivencia descrita en el texto. Se observa que las curvas con  $m > 1$  corresponden a las curvas de sobrevivencia de tipo I, las de  $m = 1$  a las de tipo II, y las de  $m < 1$  a las de tipo III, según denominadas por Pearl en 1928.

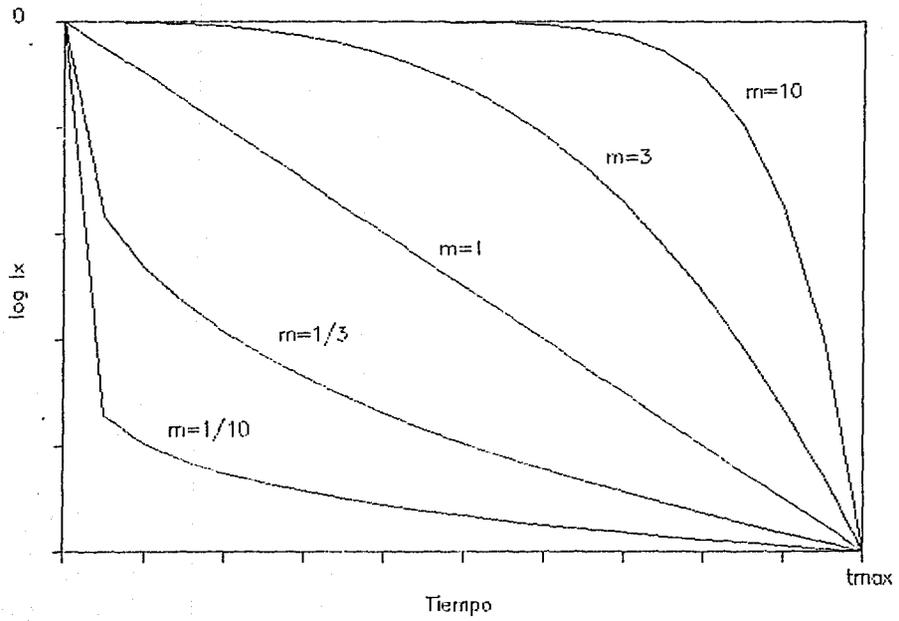
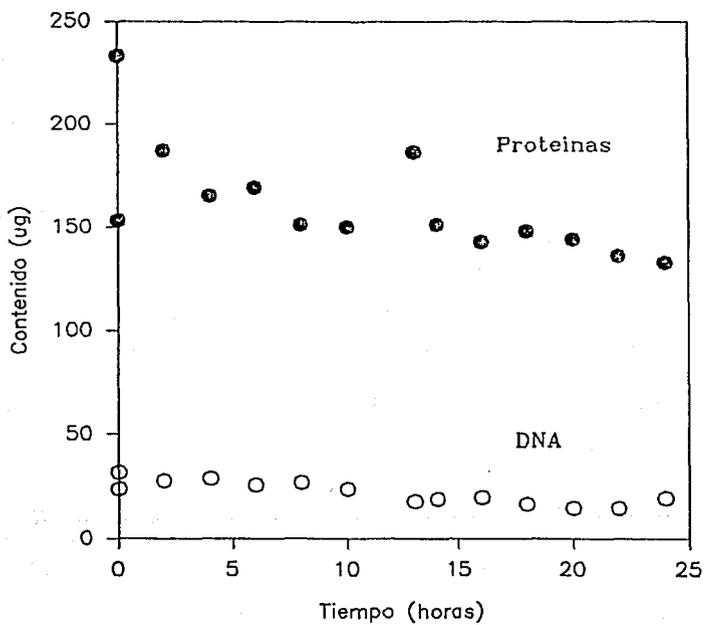


FIGURA 4. Contenido de proteínas y de DNA a lo largo de 24 horas de incubación en medio TC-199 complementado. Las determinaciones se hicieron en lotes experimentales de dos conejos diferentes. El primer lote abarcó las mediciones del tiempo 0 a 10 horas y el segundo lote, el tiempo correspondiente a 0 y 13 a 24 horas.



## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En una primera aproximación teórica se podría ver al conjunto de linfocitos en el medio como una población que ocupa un espacio determinado descrita por el modelo de Verhulst, el cual supone premisas que cumplen los linfocitos en cultivo como: la de ser una población de individuos en principio indistinguibles, que se distribuyen uniformemente y que tienen los nutrientes y espacio limitados. La ecuación de Verhulst establece:

$$dN/dt = \alpha N - \phi N^2$$

Donde N es el número de organismos en un espacio constante,  $\alpha$  es la tasa neta de crecimiento y  $\phi$  es un factor de competencia por los nutrientes. Es importante hacer notar que:

$$\alpha = g - f'$$

donde g es la tasa de natalidad y  $f'$  la de mortalidad. Ya que en nuestro caso se tienen incubaciones de timocitos no estimulados, se tiene que  $\alpha = -f'$ . Al integrar la ecuación de Verhulst se obtiene la ecuación logística:

$$N = \alpha C / (e^{-\alpha t} - \phi C)$$

donde C es una constante que resulta de la integración. Los datos del medio TC-199 se ajustan a la ecuación de Verhulst con una correlación  $r = 0.9$ ,  $\alpha = 0.07$ ,  $\phi = 0.18$  y  $C = -8.67$ . Los datos del medio TC-199 con SFB 20 % no se ajustan a la ecuación logística.

El hecho de que los datos del medio complementado no se ajusten a esta ecuación sugiere que no hay densodependencia. Posiblemente, ello se debe al factor alimento porque el suero aporta muchos nutrientes a las células que se mantienen in vitro.

Parece haber densodependencia en las células que se incubaron en TC-199, ya que en estas condiciones hay menos nutrientes. Como se ha visto, para la mayoría de las células es indispensable un suplemento biológico para que puedan crecer y dividirse. Para probar esta hipótesis se requirieron pruebas calorimétricas, al igual que repetir estos mismos experimentos con densidades celulares variables.

Al no considerar los factores de densodependencia, la ecuación de Verhulst se reduce a:

$$dN / dt = \alpha N$$

y en el caso de nuestros experimentos en donde no hay reproducción, se reduce a:

$$dN / dt = - f'N$$

Reordenando se tiene:

$$dN / N = - f'dt$$

Como se explicó en la sección de resultados, los cambios en el número de células se analizaron con la variable  $lx$ . Así:

$$dlx / lx = - f'dt$$

$f'$  no es un valor constante sino en general una función del tiempo lo que se puede escribir como:

$$dlx / lx = -f'(dt)$$

Al integrar, se tiene:

$$\ln lx = -f(t) + C$$

Al dividir entre  $\ln 10$ :

$$\log lx = -f(t) + C$$

donde C resume las constantes de integración y  $f(t)$  es la forma integrada de  $f'(dt)$ . Como se explicó en la sección de resultados.

La función propuesta para  $f(t)$  es:

$$f(t) = (t/t_{max})^5$$

y C puede definirse como:

$$C = \log l_0$$

lo que origina la ecuación desarrollada en la sección de resultados:

$$\log lx = \log l_0 - (t / t_{max})^5$$

Las Figuras 1 y 2 muestran las curvas de sobrevivencia con los puntos experimentales y las curvas obtenidas con la ecuación desarrollada *ad hoc* en donde se observa lo siguiente:

- 1) La presencia de SFB en el medio aumenta la esperanza de vida de las células, es decir, la probabilidad de que una célula en un tiempo determinado sobreviva. El suero fetal bovino brinda a las células las condiciones necesarias para mantenerse en mejor forma que cuando las células se encuentran sin el suero. Como se mencionó, muchos de los efectos del SFB en las células son sobre su condición fisiológica que en forma global puede definirse como viabilidad.
- 2) Como primera aproximación, aunque el SFB aumenta la esperanza de vida de las células no modifica su longevidad in vitro. De esto se infiere que el SFB aumenta el tiempo que puede mantenerse un cultivo porque las células se dividen. Incluso en este caso,

se sabe que las células de organismos multicelulares cultivadas presentan un número limitado de divisiones (Hayflick 1980). Este descubrimiento ha hecho pensar que el proceso de envejecimiento tiene una base celular que puede estudiarse experimentalmente. Nuestros resultados son coherentes con dicha hipótesis y además sugieren que, al observarse el mismo fenómeno en la vida de una célula individual, el envejecimiento tiene un componente a corto plazo en el metabolismo que se acelera al mantener a las células en cultivo. Asimismo, este proceso puede estudiarse en el sistema experimental usado en esta tesis.

Se hicieron análisis del contenido de DNA y proteínas de células que se mantuvieron en incubación por 24 horas en medio complementado, en los que se observó que la cantidad de ambos componentes se mantenían constantes a lo largo del tiempo de incubación, lo que sugiere que realmente las células no se dividieron en este tiempo. Por este método no es posible conocer la viabilidad de las células ya que no hay manera de discernir entre la condición fisiológica de las mismas. Sin embargo estos resultados apoyan lo observado en los resultados de viabilidad, en los que se observó que la cantidad de células cuantificadas tanto vivas como muertas se mantienen constantes. Se requeriría pues:

- 1) Realizar determinaciones de proteínas y ADN para observar el efecto del SFB sobre la estabilidad de la célula, ya que si se rompe la membrana, las proteínas y el DNA se deben degradar por el efecto de enzimas líticas.
- 2) Repetir los experimentos hasta las 72 horas para conocer la cantidad de proteínas y DNA en función de la sobrevivencia.
- 3) Desarrollar una técnica de determinación de la viabilidad más fácil y con un error sistemático. La espectrofotometría podría ser una opción.

## APENDICE I.

Cronología de los principales eventos en la historia de los cultivos celulares (Tomado de Alberts et al. 1982).

- 1885 Roux Demostró que las células embrionarias de pollo se podían mantener en solución salina fuera del cuerpo del animal.
- 1907 Harrison cultivó medula espinal de anfibio con lo que demostró que los axones son extensiones de una sola célula y no es el resultado de la fusión de varias.
- 1910 Rous indujo la formación de un tumor por el uso de extractos filtrados de células tumorales de pollo los cuales, se demostró posteriormente, contenían virus de RNA.
- 1913 Carrel demostró que las células podían crecer por largos periodos en cultivos cuando se mantenían bajo condiciones asépticas.
- 1948 Earle y sus colaboradores aislaron células de la línea celular L y demostraron que formaban clones en cultivo.
- 1952 Gey y colaboradores establecieron una línea continua de células que provenían de carcinoma cervical de humano, el que después se conoció como células HeLa.
- 1954 Levi-montalcini y asociados demostraron que el factor de crecimiento neural estimula el crecimiento de axones en cultivos neuronales.
- 1955 Eagle realizó la primera investigación sistemática de los requerimientos nutricionales de las células en cultivo y encontró que las células animales se pueden propagar en una mezcla de moléculas pequeñas suplementada con una pequeña fracción de proteínas séricas.
- 1956 Puck y asociados seleccionaron mutantes con requerimientos alterados a partir de cultivos de células HeLa.
- 1958 Temin y Rubin desarrollaron un método cuantitativo para infectar células de pollo en cultivo por el virus del sarcoma de Rous purificado.
- 1961 Hayflick y Moorhead mostraron que los fibroblastos humanos morían después de un número finito de divisiones en cultivo.
- 1964 Littlefield desarrolló el medio HAT para el crecimiento selectivo de células somáticas híbridas.  
Kato y Takeuchi obtuvieron una planta completa de zanahoria a partir de una sola célula en cultivo.
- 1965 Ham introdujo un medio sin suero que permitía el crecimiento clonal de algunas células de mamífero.  
Harris y Watkins produjeron los primeros heterocariontes de células de mamífero por la fusión inducida por virus de células de humano y de ratón.
- 1968 Augusti-Tocco y Sato adaptaron un neuroblastoma de ratón a condiciones de cultivo y aislaron clones que fueron exitables y que formaron procesos nerviosos. Otras líneas celulares diferenciadas también se aislaron como células de músculo esquelético y de hígado.
- 1975 Kohler y Milstein produjeron las primeras líneas celulares

secretoras de anticuerpos monoclonales.  
1976 Sato y asociados publicaron la primera de una serie de publicaciones en las que se demostró que diferentes líneas celulares necesitan mezclas diferentes de hormonas y factores de crecimiento para desarrollarse en medio libre de suero.

APENDICE II.

COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO TC-199 (mol/L)

AMINOACIDOS	ARGININA	3.3E-4
ESCENCIALES	CISTEINA	6.3E-7
	GLUTAMINA	6.8E-4
	HISTIDINA	1.0E-4
	ISOLEUCINA	3.0E-4
	LEUCINA	9.1E-4
	LICINA	3.8E-4
	METIONINA	2.0E-4
	FENILALANINA	3.0E-4
	TREONINA	4.0E-4
	TRIPTOFANO	4.9E-5
	TIROSINA	2.0E-4
	VALINA	4.3E-4
	ALANINA	5.6E-4
	ASPARTATO	4.5E-4
	GLUTAMATO	9.1E-4
	GLICINA	6.7E-4
	PROLINA	3.5E-4
	SERINA	4.8E-4
DERIVADOS	AMINO BUTARATO	3.6E-7
DE	GLUTATIONE	1.6E-7
AMINOACIDOS	HIDROXIPROLINA	7.6E-5
VITAMINAS	AC. ASCORBICO	2.8E-7
COENZIMAS	BIOTINA	4.1E-8
SOLUBLES	AC. FOLICO	2.3E-8
EN AGUA	AC. PARA AMINO BENZOICO	3.6E-7
	AC. NICOTINICO	2.0E-7
	NICOTINAMIDA	2.0E-7
	PIRIDOXINA	1.2E-7
	TIAMINA	3.0E-8
	PIRIDOXAL	1.2E-7
	AC. PANTOTENICO	4.2E-8
VITAMINAS	VITAMINA D	2.5E-7
SOLUBLES	VITAMINA K	5.8E-8
EN	VITAMINA E	2.0E-8
GRASA	VITAMINA A	3.5E-7
CARBOHIDRATOS	ACETATO	6.1E-4
Y SUS	DESOXIRIBOSA	3.7E-6
DERIVADOS	GLUCOSA	5.6E-3
	RIBOSA	3.3E-6

DERIVADOS DE ACIDOS NUCLEICOS (PURINAS)	ADENINA AMP ATP GUANINA HIPOXANTINA XANTINA	4.9E-5 5.8E-7 1.8E-6 1.6E-6 2.2E-6 2.0E-6
DERIVADOS DE ACIDOS NUCLEICOS (PIRIMIDINAS)	TIMINA URACIL UTP	2.4E-6 2.7E-6 2.1E-6
LIPIDOS Y SUS DERIVADOS	COLINA i-INOSITOL	8.3E-6 1.1E-5
IONES INORGANICOS	CALCIO MAGNESIO POTASIO SODIO CLORO NITRATO FOSFATO SULFATO	1.8E-3 8.1E-4 5.4E-3 1.5E-1 1.3E-1 1.2E-3 1.0E-3 8.6E-4
ELEMENTOS TRAZA	HIERRO	4.1E-7
AMORTIGUADORES E INDICADORES	BICARBONATO ROJO FENOL	2.6E-2 4.2E-5

## REFERENCIAS.

- Absher, M. (1973). Hemocytometer counting. In: Methods and applications. Krusse, P.F. and Patterson, M.K., (eds.). Academic Press, Inc. New York., E.U.A.. Pp. 395-397.
- Alberts, B., Lewis, J., Raff, J., Keith, R., Watson, J. D. (1982). Molecular biology of the cell. Gardner, New York, E.U.A.. Pp. 1146.
- Begon, M., Harper, J.L., Towsend, C.R. (1986). Ecology. Ciencias, por una educación popular.
- Berkson, J., Magath, T. B. y Hurn, M. (1939). The error of estimate of the blood cell count as made with the hemocytometer. Amer J Physiol 128:309-323.
- Burton, K. (1955). A study of the conditions and mechanism of the diphenilamine reaction for the colorimetric estimation of Desoxirribonucleic Acid. Biochem Jour 62:315-322.
- Bashor, M. M. (1979). Medium and Growth Requeriments. Meths Enzimol LVIII:119-131.
- Bertalanffy, L. (1976). Teoría general de los sistemas. Fondo de cultura económica. México . Pp 311.
- Burnet, M. (1962). The thymus gland. Sci. Amer. 207: 50-57.
- Daly, W. F. (1973). Electronic enumeration and sizing of cells. In: Methods and applications. Krusse, P. F. and Patterson, M. K. (eds) Academic Press Inc. New York, E.U.A. Pp. 398-399.
- Darnel, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1986). Molecular cell biology. Scientific American Books. New York, E.U.A. Pp. 1187.

- David, J. (1985). The organs and cells of the immune system. Sci. Amer. 1-11.
- Dickson, J. A. (1970). The uptake of non-metabolizable amino acids as an index of cell viability in vitro. Exp Cell Res 61:235-245.
- Dolan, M. F. (1965). Viability assays - a critique. Fed Amer Soc Exp Biol 15:S275-S279.
- Freshney, R. I. (1984). Culture of animal cells. Alan R. Liss Inc. New York, E.U.A. Pp. 67-78.
- Frandsen, R.D., Whitten, E.H. (1985). Anatomía y fisiología de los animales domésticos. Interamericana. Tercera edición. México. Pp. 463-464.
- Haken, H. (1978). Synergetics. An introduction. Springer-Verlag. New York, E.U.A. Pp. 1-16, 263-297.
- Ham, A.W. y Cormack, D.H. (1983). Tratado de histología. Interamericana. Séptima edición. México, D.F. Pp. 1080.
- Ham, R. G. y Sullivan, P. M. (1977). Qualitative and Quantitative analysis of nutritional factors of cell growth. In: Cell culture and its applications. Octon. R.D., Lynn, J.D. (eds.) Academic Press. New York, E.U.A. Pp. 533-540.
- Ham, R. G. y McKeehan, W. L. (1979). Medium and Growth Requeriments. Metbs Enzimol LVIII: 44-93.
- Hayflick, L. (1980). The cell biology of the human aging. Sci Amer 236:58-65.
- Holden, H. T., Lichter, W. y Sigel, M. M. (1973). Quantitative methods for measuring cell growth and death. In: Methods and applications.

Krusse, P.F. and Patterson, M.K., (eds.). Academic Press, Inc. New York, E.U.A.. Pp. 408-412.

-Hutchinson, G. E. (1978). An introduction to population Ecology. New Haven and London. Yale University Press. Great Britain. Pp. 41-89.

-Karp, G. (1987). Biología celular. Mc Graw Hill. 2ª edición. México. Pp. 717-719.

-Krebs, J. C. (1985). Ecology. Harper International Edition. New York, E.U.A.. Pp 799.

-Lehninger, A. L. (1982). Bioquímica. Omega. Segunda edición. Barcelona. España. Pp. 1117.

-Lerner, R. A. y Dixon, F. J. (1971). The human lymphocyte as an experimental animal. Sci Amer 227:2-11.

-Lowry, H. O., Roseburg, J. N., Farr, L. y Randall, J. R. (1951). Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem 193: 265-275.

-Mazia, D. (1974). The cell cycle. Sci Amer 230(1):54-64.

-Mitchison, J. M. (1981). Changing perspectives in the cell cycle. In: The cell cycle. John, P.C.L.. Soc Exptl Biol. Seminar Series. 10. Pp.1-10.

-Morgan, F. J., Morton H. J. y Parker, C. R. (1950). Nutrition of animal cells in tissue culture. Initial studies on a synthetic medium. Proc Soc Exp Biol Med. 73(1): 1-8.

-Osoba, D. (1972). Thymic function, immunologic deficiency, and autoimmunity. Med. Clin. of North. Amer. 56(2):319-335.

-Oyama, V. I. e Eagle, H. (1956).. Measurement of cell growth in tissue culture with phenol reagent (folin-ciocalteu). Proc Soc Exp Biol Med 91: 305-307.

-Patterson, M. K. Jr.. (1979). Measurement of growth and viability of cells in culture. Meth Enzymol LVIII:141-151.

-Pardee, A. B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc Nat Acad Sci. 71 (4): 1286-1290.

-Pardee, A. B., Dubrow, R., Hamlin, J. L. y Kletzien, R. F. (1978). Animal cell cycle. Ann Rev Biochem 47:715-750.

-Penso, G. y Baldicci, D. (1963). Tissue culture in biological reserch. Elsevier Publishing Company. New York, E.U.A. Pp. 68-100.

-Phillips, H. J. (1973). Dye exclusion test for cell viability in tissue culture. In: Tissue Culture: Methods and aplicaciones. Krusse, P.F. and Patterson, M.K. (eds.). Academic Press Inc. New York, E.U.A.. Pp. 406-408.

-Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1979). Biometría. H. Blume. Madrid, España. Pp. 205-206.

-Smith, J. A. y Martin, L. (1973). Do cells cycle?. Proc Nat Acad Sci 70(4):1263-1267.

-Stiles, C. D., Cochran B. H. y Ascher C. D. (1981). Regulation of the mamalian cell cycle by hormones. In: The cell cycle. John, P. C. L.. Soc Exp Biol. Seminar series. Pp. 119-138.

-Stites, D.P., Stobo, D.J., Fudenberg, H.H. y Wells, J.V. (1983). Inmunología básica y clínica. El manual moderno. Cuarta edición. Pp. 825.

-Trautman, A. y Fiebiger, T.J. (1950). Histología y anatomía microscópica de los animales domésticos. Labor, España. Pp. 153-156.

-Waymouth, C. (1965). Construction and use of a synthetic medium. In: Cells and tissue in culture. Willmer, E. N. (ed.) Academic Press. New York, E.U.A. Pp. 99-132.