



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

**“Extracto de Caléndula officinalis, NAD y Extracto de levadura
como sustituto de suero fetal bovino en dos líneas celulares:
VERO y RK-13”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIOLÓGO

P R E S E N T A :

MARIO ALBERTO AGUILERA CRUZ

ASESORES: M.V.Z GERARDO CRUZ JIMÉNEZ
M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA VEGA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

AGRADECIMIENTOS:

A la universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido ser parte de esta institución que me enseñó que no importa tener grandes recursos económicos lo importante son las personas que laboran en esta y que hacen su máximo esfuerzo por formar a mejores personas en bien de este país.

Al Dr. Andrés Romero Rojas y el personal de su laboratorio por todas las atenciones y facilidades prestadas para la realización de este proyecto.

A la Dra. Reina y todo el Laboratorio de Biología Celular y Veterinaria de campo 4 por su apoyo en la realización de esta tesis.

Al Prof. Gerardo ya que lo consideró la mayor parte de mi formación como profesionista y que con sus consejos, la mayoría de las veces nos hace ver la vida de otra manera y que en el encontramos un apoyo no solo en lo académico sino en lo personal y por su amistad.

A todo el laboratorio de Microbiología 10 (Sra. Erica, Tania, Zaida, Lupita, Marco, Miriam Sonia) por su amistad y por darme un ambiente de trabajo tan agradable. GRACIAS POR SU APOYO

A Sara, Nelly, Ulises (terror), Liz Tapia, Moni, Liza, Karina, Denise por su amistad, compañía y consejos que me ayudaron mucho en los momentos más difíciles en los que quería tirar todo por la borda me daban su apoyo y me alentaban a salir adelante. LOS QUIERO MUCHO.

A Karina Chávez, Lupe, Mario, Dulce, Beto, Jannet, Alicia por su amistad y aunque nos conocimos poco tiempo su amistad dejó una gran marca en mi siempre los recordare.

A todos mis compañeros de la generación 28 (Ananí, Alejandro, Juan, Polo, Elvin, Carolina, Daniela, Yuriana) por su amistad, paciencia, compañía y consejos ya que en ellos siempre encontraban la forma de apoyarme y muchas veces regañarme cuando hacía cosas que no eran buenas. MUCHAS GRACIAS.

A todo el personal de Banquetes Jimmys por haberme enseñado un oficio, las cosas malas y buenas de la vida, su amistad, compañerismo y que no porque una persona sea superior a ti tanto en conocimientos como económicamente le da derecho a humillarte a todos ellos. GRACIAS.

A MEMO DAVID Y VICTOR por siempre estar conmigo tanto en las buenas malas y muy malas, su apoyo siempre a significado mucho ya que muchas veces aunque estemos peleando siempre procuramos el bien de todos. MUCHAS GRACIAS.

DEDICATORIAS:

A MI PAPA:

Te dedico este trabajo a ti por quererme cuidarme, educarme, aguantarme. Tú eres mi modelo a seguir y la persona que mas quiero y respeto, gracias por ser como eres y aunque muchas veces no pensemos de la misma manera eso no quiere decir que no me importes gracias por haberme apoyado sin ti nunca lo hubiera logrado.

A MI MAMA:

Te lo dedico a ti por ser y una excelente madre, educarme, cuidarme cuando estoy enfermo, apoyarme cuando estoy triste, por aguantarme, siempre serás junto con mi papa la razón para ser mejor y salir adelante.

A MI HERMANO CESAR:

Tu por ser un excelente hermano y un apoyo muy grande para mi. Muchos de tus consejos los sigo ya que aunque eres más joven que yo tienes una forma de pensar que admiro y me hace respetarte mucho.

A MI HERMANO MIGUEL:

Por ayudarme, apoyarme, cuidarme y aguantarme eres una persona a la que admiro mucho y aunque muchas veces no te entiendo, eso me hace quererte MUCHAS GRACIAS POR TODO.

INDICE

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS.....	IV
INDICE DE TABLAS.....	V
INDICE DE GRAFICAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.1 Antecedentes	
1.2. Cultivo celular.....	3
1.3. Medios de cultivo y suplementos.....	3
1.4. PRIONES.....	4
1.4.1. Antecedentes históricos.....	4
1.4.2. Estructura.....	5
1.4.3. Medidas de prevención.....	5
1.4.4. Un caso de (CCJ).....	6
1.4.5. Nueva alternativa para el diagnostico.....	6
1.4.6. Nuevo método de detección.....	7
1.4.7. Nuevo Método de inactivación.....	8
1.8. Suero fetal Bovino.....	8
1.9. MEDIOS NUEVOS LIBRES DE SUERO FETAL BOVINO.....	9
1.10. NAD (Nicotinamida adenina Dinucleótido).....	9
1.11. Extracto de levadura.....	10
1.12. <i>Caléndula officinalis</i>	12
1.12.1 Fitoquímica.....	12
1.13. Células VERO.....	13
1.14. Células RK-13.....	13
1.15 MTT o 3-[4,5-dimetiltiazol-II]-2,5-difeniltetrazolio.....	14

1.16. HIPOTESIS.....	15
1.17. JUSTIFICACIÓN.....	15
2.0 OBJETIVOS.....	16
3.0 METODOLOGIA.....	17
3.1 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS.....	17
3.1.1 Extracto etanólico de caléndula.	
3.1.2 Extracto acuoso de levadura de pan.	
3.1.3 NAD.	
3.1.4 Mezclas entre extracto de levadura NAD y extracto de caléndula.	
3.1.5 CULTIVO CELULAR.....	18
3.1.6 ENFRENTAMIENTO DE LAS CELULAS -SUSTITUTOS.....	18
4.0 DIAGRAMA DE TRABAJO.....	20
5. RESULTADOS.....	21
6. ANALISIS ESTADISTICO.....	38
7. DISCUSIÓN.....	42
8. CONCLUSIONES.....	48
9. SUGERENCIAS.....	48
10. APENDICE.....	49
11. GLOSARIO.....	53
12. REFERENCIAS.....	56

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura del NAD.	10
Fig. 2. Ciclo celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	11
Fig. 3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	11
Fig. 4. Flor de <i>Caléndula Officinalis</i> .	12
Fig. 5. Monocapa de células VERO.	13
Fig. 6. Célula RK-13.	13
Fig. 7. Placa de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular.	19
Fig. 8. Células VERO en MEM S/SFB sustituido con NAD.	35
Fig. 9. Células VERO en MEM S/SFB sustituido con extracto de levadura.	35
Fig.10. Células RK-13 en MEM S/SFB sustituido con extracto de levadura.	35
Fig.11. Células RK-13 en MEM S/SFB sustituido con NAD.	35
Fig. 12. Células VERO en MEM S/SFB sustituido con extracto de levadura y Extracto de caléndula.	35
Fig. 13. Células VERO en MEM S/SFB sustituido con NAD y extracto de caléndula	35
Fig. 14. Células VERO en MEM S/SFB sustituido con NAD y extracto de levadura	36
Fig. 15. Células VERO en MEM S/SFB sustituido con extracto de levadura, NAD y Extracto de caléndula.	36
Fig. 16. Células RK-13 en MEM S/SFB sustituido con extracto de levadura, NAD y Extracto de caléndula a concentraciones de 0.81/375/1500 µg.	36
Fig. 17. Células RK-13 en MEM S/SFB sustituido con extracto de levadura, NAD y Extracto de caléndula a concentraciones de 6.51/3000/12000 µg.	36

INDICE DE TABLAS

Tabla.1. Comparación y valores estándar del suero fetal bovino.	8
Tabla.2. Células VERO en MEM S/SFB sustituido por NAD.	21
Tabla.3. Células VERO en MEM S/SFB sustituido por extracto de levadura.	22
Tabla.4. Células VERO en MEM S/SFB sustituido por las diferentes mezclas de Extractos y NAD.	23
Tabla.5. Células VERO en MEM S/SFB sustituido por las mezclas de extractos y NAD.	24
Tabla.6. Células VERO en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra absorbancia.	25
Tabla .7. Células VERO en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de extracto de caléndula.	26
Tabla .8. Células VERO en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg extracto de levadura	27
Tabla .9. Células VERO en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de NAD	28
Tabla.10. Células RK-13 en MEM sustituido por NAD	29
Tabla.11. Células RK-13 en MEM sustituido por extracto de levadura.	30
.	
Tabla.12. Células RK-13 en MEM S/SFB sustituido por la mezcla de extractos y NAD.	31
Tabla.13. Células RK-13 en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra absorbancia.	32
Tabla.14. Células RK-13 en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de extracto de caléndula.	33

Tabla.15. Células RK-13 en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de extracto de levadura.	34
Tabla.16. Células RK-13 en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de NAD.	35
Tabla.17. Correlación entre la concentración en μg de NAD contra Absorbancias de células VERO y RK-13	38
Tabla.18. Correlación entre la concentración en μg de extracto de levadura contra absorbancias de células VERO y RK-13	39
Tabla.19. Correlación entre la concentración en μg de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células RK-13.	40
Tabla.20. Correlación entre la concentración en μg de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células VERO.	41

INDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico.1. Absorbancias de células VERO en MEM con respecto a Concentraciones de NAD.	21
Gráfico.2. Absorbancias de células VERO en MEM con respecto a Concentraciones de extracto de levadura.	22
Gráfico.3. Absorbancias de células VERO en MEM con respecto a Concentraciones de las diferentes mezclas extracto de Levadura, caléndula y NAD.	23
Gráfico.4. Absorbancias de células VERO en MEM con respecto a Concentraciones de la mezcla de extracto de Levadura, NAD y extracto de levadura.	24
Gráfico.5. Porcentaje de crecimiento de células VERO vs a Absorbancia	25
Gráfico.6. Porcentaje de crecimiento de células VERO vs a μg de extracto de caléndula.	26
Gráfico.7. Porcentaje de crecimiento de células VERO vs a μg de extracto de levadura.	27
Gráfico.8. Porcentaje de crecimiento de células VERO vs a μg de extracto de NAD.	28
Gráfico.9. Absorbancias de células RK-13 en MEM con respecto a Concentraciones de NAD.	29
Gráfico.10. Absorbancias de células RK-13 en MEM con respecto a Concentraciones de extracto de levadura.	30
Gráfico.11. Absorbancias de células RK-13 en MEM con respecto a Concentraciones de la mezcla de extracto de Levadura, NAD y extracto de levadura.	31
Gráfico.12. Porcentaje de crecimiento de células RK-13 vs a Absorbancia	32
Gráfico.13. Porcentaje de crecimiento de células RK-13 vs a μg de extracto de caléndula.	33
Gráfico.14. Porcentaje de crecimiento de células RK-13 vs a μg de extracto de levadura.	34
Gráfico.15. Porcentaje de crecimiento de células RK-13 vs a μg de extracto de NAD.	35

Gráfico.16. Correlación de concentración de NAD contra absorbancias de células VERO y RK-13	38
Gráfico.17. Correlación de concentración de extracto de levadura contra absorbancias de células VERO y RK-13	39
Gráfico.18. Correlación de concentración de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células RK-13.	40
Gráfico.19. Correlación de concentración de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células VERO.	41

LISTA DE ABREVIATURAS.

abs.	absorbancia
ATCC	Colección de Cultivos Tipo Americano (American Type Culture Collection)
ATP	Adenosin Trifosfato
c.b.p.	Cuanto baste para
°C	grados centígrados
CDK	ciclo dependiente de ciclinas
CHO	carbohidrato
cm ²	centímetro cuadrado
BVD	Virus de la diarrea bovina
D-MEM	Medio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	ácido desoxiribonucleico
dl.	decilitro
DMSO	Dimetil sulfóxido
Hrs.	horas
IBR	Rinotraquiitis infecciosa bovina
IgG	inmunoglobulina G
Kg.	Kilogramo
NAD	Nicotinamida adenina Dinucleótido
NADP	Nicotinamida adenina Dinucleótido (reducido)
g.	gramos
lb.	Libras
MDBK	Madin-Daby-Bovine-Kidney
MEM	Medio Esencial Mínimo
Mg.	miligramos
μl	microlitros
μm	micrómetros
ml.	minilitros
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-II]-2,5-difeniltetrazolio
nm	nanómetros
lag	fase de latencia
PBS	solución buffer de fosfatos
rpm	revoluciones por minuto
RPMI 1640	Medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute
RK-13	células de riñón de conejo (kidney Rabbit)
SFB	suero fetal bovino
TD	tiempo de duplicación
VSV	virus de la estomatitis vesicular
VERO	células de riñón de mono verde africano

RESUMEN.

Este estudio se realizó en dos líneas celulares: VERO y RK-13, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Biología Celular de la FESC-Cuautitlán Campo 4. Los ensayos consistieron en enfrentar a las células a diferentes concentraciones de los extractos por separado, así como en la mezcla de dos o tres de ellos, y obtener confluencias celulares semejantes o superiores al control positivo suplementado con SFB al 10%.

Al concluir la fase experimental observamos que en las células VERO si se sustituyen con la mezcla de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula tiene efectos estimulantes de la división celular, pero no superiores al control positivo, en cambio si se sustituye solo con NAD el efecto promotor de la división celular es superior al del control positivo.

Sin embargo con lo que respecta a las células RK-13 si son suplementadas con solo NAD o extracto de levadura su efecto promotor es menor al control positivo, pero si se enfrentan con la mezcla de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula la proliferación celular es mayor que en el control positivo.

La determinación de los efectos de proliferación celular se observaron y cuantificaron mediante el método colorimétrico de Mosmann el cual utiliza bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-II]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que determina las células viables a partir de la reducción de este por la acción de una deshidrogenasa producida por dichas células y midiendo sus absorbancias en un elisómetro comparándose con las del control positivo.

Con el fin de facilitar la discusión y el análisis de los resultados se presentaron gráficos imágenes y tablas.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Antecedentes

El cultivo de tejidos se desarrolló a finales del siglo pasado como un método de estudio de células animales libres de variaciones en su sistema y manteniendo un medio controlado. Primero se observó si la célula era capaz de migrar fuera del tejido cultivado, después con el desarrollo de técnicas de disgregación celular y de selección de distintos tipos celulares específicos fue posible obtener células aisladas.

A partir de ese momento los cultivos tomaron nombres distintos dependiendo del origen del tejido como lo fueron los cultivos organotípicos que provenían de un trozo de órgano que guardaba ciertas características en sus tipos celulares, el cultivo histotípico, era característico debido a la reasociación de las células de alguna manera para asemejar la estructura del tejido original y el cultivo de células conocido en ese tiempo por mantener a las células en la superficie del recipiente del cultivo.^[1]

A finales del siglo pasado el biólogo francés, Claude Bernard con sus investigaciones realizadas en un sistema en el que las células o tejidos sobrevivieron independientemente del organismo del cual fueron extraídos, estableciendo las bases teóricas para el estudio de los cultivos celulares.

En 1866 F. Von Recklinghausen^[2] logra, mantener vivas por más de treinta días células de anfibios, dando como resultado, el primer cultivo celular.

El cultivo celular como se conoce hoy en día se le atribuye al zoólogo americano R.G. Harrison el cual fue el primero en establecer un cultivo de tejidos animales empleando técnicas *in vitro*.

M. Burrows discípulo de Harrison,^[2] incorpora plasma a cultivos de embrión de pollo siendo el primero en observar y describir los procesos de duplicación celular, llamado en la actualidad mitosis y dando el nombre de cultivo de tejidos.

Carrel en 1930^[3] mantiene un cultivo de células de embrión de pollo durante un tiempo de vida mayor, estableciendo el cultivo por un periodo de 34 años, el éxito de su investigación fue gracias a un frasco.

En 1916 Rous y Jones^[3] emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embrión de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los principales problemas que describían eran las múltiples contaminaciones por lo que se tuvieron que desarrollar métodos de asepsia que en la actualidad se siguen empleando.

Entre los años 1920 y 1940 se implementaron diversas estrategias para el mantenimiento de cultivos en condiciones estériles pero sin gran éxito. En los años 40 con el aislamiento de los primeros antibióticos se establecieron numerosas aplicaciones con las cuales se disminuyó la contaminación de los cultivos.

En 1955 Eagle^[3] realiza la primera investigación de los requerimientos nutritivos de las células en cultivos describe la necesidad de agregar soluciones corporales complejas (suero) pueden ser satisfechas por el uso de 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas (aminoácidos, azúcares)

En 1976 Sato y col.^[3] Publicaron sus trabajos que demuestran que las líneas celulares requieren de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero.

Las áreas de investigación fuertemente dependientes de las técnicas de cultivo celular son: virología, inmunología ingeniería de proteínas, estudios de interacción, señalización celular, en la diferenciación y aplicaciones diagnosticas, medicas, industriales y agronómicas.

Lo que vino a revolucionar los cultivos celulares *in vitro* fue a partir de 1970 con la obtención de vacunas para humanos con una pureza alta y muy inmunogénicas desapareciendo el riesgo de contagio por otros microorganismos y previniendo enfermedades dando como resultado la vacunación preventiva y la erradicación de algunas enfermedades virales.^[4]

1.2 CULTIVO CELULAR

Un cultivo celular es el conjunto de células que provienen de un tejido el cual es disgregado por métodos mecánicos o enzimáticos. Puede cultivarse en forma de monocapa de tejidos sobre una superficie sólida (botellas de vidrio o plástico) o en forma de suspensión.

Como cultivo de células se conoce a la serie de técnicas que nos permiten el mantenimiento de las mismas *in vitro* manteniendo sus características fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Esto abarca el cultivo de órganos como el cultivo de células en suspensión o en Monocapa, sobre superficies de cristal o plástico. ^[5]

1.3 MEDIOS DE CULTIVO Y SUPLEMENTOS

Un medio de cultivo es una solución de nutrientes necesarios para el mantenimiento de las células por un periodo de tiempo en el caso de las células animales *in vitro* son usadas soluciones de numerosos componentes de bajo peso molecular tales como aminoácidos, sales y vitaminas. A estos medios es necesario agregar un suplemento proteico como lo es el suero.

Con el tiempo se han desarrollado medios bien definidos químicamente con casi todos los requerimientos para el desarrollo de las células uno de ellos es el medio de cultivo Eagle este medio consta de una solución isotónica de sales, glucosa, vitaminas, coenzimas y aminoácidos y amortiguada a un pH de 7.2 al cual se le agrega antibióticos para evitar la contaminación por bacterias u hongos. Solo el medio proporciona las condiciones de mantenimiento pero, para que crezcan las células se les agrega un suplemento como es suero fetal bovino. Estos medios son utilizados en cultivo de células adherentes (monocapa) como es el caso de las células Hela, VERO, MDBK.

Otro medio de cultivo es el MEM (medio esencial mínimo) en el que crecen células formadoras de monocapa como líneas celulares establecidas y células primarias de mamífero.

El RPMI 1640 (medio 1640 del Roswell Park Memorial Institute) el cual se utiliza para el cultivo de leucocitos humanos o murinos normales y neoplásicos, creciendo en suspensión y no necesitan calcio. ^[6]

1.4. PRIONES

Agente infeccioso el cual esta constituido por una proteína codificada por un gen celular, presenta dos isoformas (PrPc) y anormal PrPsc) o infecciosa. La isoforma normal a sido encontrada en mamíferos, entre ellos: ovinos, bovinos, hámster ratón y en seres humanos con un 80% de homología entre las secuencias de PrPc en las diferentes especies. ^[7]

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades degenerativas del sistema nerviosos central (SNC) de varias especies de animales y el hombre caracterizadas por un largo periodo de incubación, un periodo un curso clínico relativamente corto y una mortalidad del 100%, causadas por los priones. Las encefalopatías que afectan al humano se clasifican en dos esporádicas y genéticas, las primeras incluyen la enfermedad de Creutzfeldt Jacob (ECJ) y Kuru, las genéticas insomnio fatal Familiar, (ECJ) y síndrome de Gerstman-Straussler-Scheinker (GSS). La Encefalopatía Espongiforme Bovina (EBB) es una forma de EET que afecta al ganado vacuno. ^[8,9]

1.4.1. ANTECEDENTES HISTORICOS:

La primera descripción de las encefalopatías del tipo espongiforme se remota al siglo XVIII, y hace referencia a los temblores del carnero (“Scrapie”). Las ovejas y cabras afectadas mostraban fuertes temblores y prurito. Al realizar el análisis post-mortem del cerebro de los animales con estos síntomas encontraron espongiosis, es decir, la presencia de vacuolas ópticamente vacías en el tejido nervioso. A principios de 1920, Creutzfeldt y Jacob describieron los primeros casos de una encefalopatía subaguda espongiforme que después recibió el nombre de enfermedad de Creutzfeldt Jacob (CJD) en honor a sus descubridores. ^[10] A continuación se presenta una breve cronología relacionadas con las EET. ^[11]

1920. Creutzfeldt describe por primera vez un caso de CJD.

1921. Jacob describe en tres pacientes.

1938. J. Cuillé y P.L. Chelle demuestran que el Scrapie es transmisible.

1957. C. Gajdusek y V. Zigas describen por primera vez el Kuru. El primero propone que el Kuru se transmite a través del canibalismo.

1959. Hadlow pone de manifiesto la similitud entre el Kuru y el Scrapie.

1967. T Alper comprueba la resistencia del agente infeccioso a la radiación ultravioleta 2540°A.

1968. C. Gajdusek transmite la CJD a Chimpancés.

1976. Carleton Gajdusek recibe el premio Nobel de Medicina.

1982. S. Prusiner pública su hipótesis del agente infeccioso de naturaleza exclusivamente proteica. Creación del concepto de prion.

1985. se halla el gen PrP en todas las especies afectadas por el prion

1997. Stanley Prusiner recibe el premio Nobel de Medicina.

1.4.2. ESTRUCTURA.

La proteína PrP^c esta constituida por cuatro regiones de estructura secundaria llamada H1, H2, 3 y H4, en estas regiones se identifican tres zonas de hélice α llamadas A,B,C y dos de hoja β llamadas S1 y S2. ^[12] Esta compuesta de 250 residuos de aminoácidos tiene un enlace disulfuro y una cubierta de 142 residuos resistentes a la proteólisis suficientes para su infectividad. La isoforma PrP^{sc} se deposita en humanos y animales facilitando la neurodegeneración y puede transmitirse a través de las barreras interespecie. ^[13] Es por ello que la regulación que la regulación europea exige se analice el tejido cerebral de animales mayores de 30 meses, antes de que puedan comercializarse como carne. ^[14]

1.4.3. MEDIDAS DE PREVENCIÓN.

La Comisión Europea, ^[15] ha desarrollado una serie de medidas encaminadas a proteger a la comunidad del riesgo relacionado con la EEB, estas son:

1. Prohibición de la alimentación de mamíferos y otros animales de granja con carne, huesos y derivados proteicos de rumiantes.

2. Establecimiento de elevados estándares para el procesamiento y tratamiento de los desechos animales.

3. Medidas de vigilancia para detección, control y erradicación de la EEB desde mayo de 1988.

4. Eliminación de todos los tejidos animales de riesgo de la cadena de alimentación animal y humana.

5. Introducción de test de EEB a los animales que presenten algún trastorno neurológico, así como a todo el ganado mayor de 30 meses de edad usado para el Consumo humano.

6. Prohibición del uso carne recuperada mecánicamente en la alimentación del ganado o en la producción de alimentos de consumo humano.

7. Control de las importaciones de materiales de origen animal rumiante.

1.4.4. CASO CLINICO DE LA (CCJ).

Es un caso presentado en el 2001 ^[16] de un hombre de 50 años originario de Saltillo Coahuila, contador público, casado ingresado en el hospital por incapacidad para deambular e incontinencia anal y vesical. Su historia clínica reveló una evolución de 15 meses hasta llegar al mutismo, 10 meses con movimientos anormales de la mano y pie izquierdo, cuatro meses con dificultad al caminar, impotencia sexual y pérdida y control de esfínteres. Se realizó biopsia de lóbulo frontal derecho. El corte histológico teñido con hematoxilina y eosina mostró degeneración espongiiforme cortical con vacuolación fina de la sustancia gris, especialmente en las capas profundas corticales.

Se ha publicado que se encontraron partículas proteicas que causan Scrapie, Esto sugiere que la leche puede estar infectada por priones, el líder de la investigación en el hospital de Zurich, Adriano Aguzzi comento que se esta trabajando en la búsqueda de estos agentes infecciosos en la leche, esto como consecuencia levantaría una alerta mundial comenzando con nuevas normas en base a la comercialización de este producto de Europa hacia América. ^[17]

1.4.5. NUEVA ALTERNATIVA PARA EL DIAGNOSTICO.

Los últimos resultados, publicados en Journal of Virology, muestran importantes avances en los ensayos realizados con vacunas ADN en modelos animales, con las que han logrado retrasar notablemente la aparición de los síntomas a largo plazo, estas investigaciones podrían dar pie a la elaboración de tratamientos para los humanos.

El trabajo de los investigadores está enfocado a la elaboración de una vacuna que proporcione una respuesta inmune lo más completa posible, comprendiendo ésta tanto una respuesta humoral, como una respuesta celular.

El principal obstáculo en conseguir este propósito consiste en que los priones no producen respuesta inmune, puesto que el metabolismo del animal afectado lo reconoce como un antígeno propio. Así pues, el reto consiste en conseguir superar la barrera de la tolerancia.

Lo anterior se ha conseguido utilizando una vacuna de DNA basada en un plásmido que expresa el gen del prion, fusionado a una pequeña secuencia que actúa como señal de transporte a unos compartimentos celulares. Tras la vacunación, el prion expresado se degrada rápidamente en los lisosomas, permitiendo así mejorar su presentación a las células del sistema inmunológico e induciendo una respuesta tanto humoral como celular.

En paralelo con esta investigación se pueden tener avances en el desarrollo de reactivos para el diagnóstico de las enfermedades producidas por el prion, que hasta ahora sólo se puede realizar post mortem. ^[18]

1.4.6. NUEVO MÉTODO DE DETECCIÓN.

En el Journal of General Virology en Mayo de 2006 ^[19] presentan un estudio el cual se basa en la detección de la proteína del prion en sangre que proviene de ensayos de muestreo de enfermedades por priones en humanos y animales. Esta aplicado a la electroforesis inmunocapilar (ICE) método desarrollado para el Scrapie en cerebro de ovejas y en sangre de pacientes humanos con la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Este ensayo se desarrolla con la extracción en disolventes orgánicos, usando inmunofluorescencia de competencia y anticuerpos policlonales específicos para la secuencia de las proteínas del prion y analizando por electroforesis capilar utilizando un láser inducido por detección fluorescente.

1.4.7 NUEVO METODO DE INACTIVACIÓN.

El peligro de adquirir una EET por la contaminación con priones, ha orillado a buscar métodos con los que se busque eliminar el prion. Un artículo en el 2006 ^[20] indica la inactivación fotocatalítica de los priones por dióxido de titanio. Esta basado en la formación de radicales hidroxilo de los cuales se conocen sus altos potenciales reductivos. La inactivación se lleva acabo por procesos fotocatalíticos heterogéneos. Inicialmente los experimentos fueron *in vitro* y después realizados en la cepa de Hámster 263K. Los resultados demuestran que si se tratan cerebros infectados con Scrapie se reduce homogéneamente la infectividad.

1.8. SUERO FETAL BOVINO

Se utiliza en los cultivos celulares como suplemento de los medios ya que por su composición y su bajo contenido de inmunoglobulinas le proporciona al medio sustancias para el desarrollo de las células. El suero esta compuesto por proteínas hormonas y factores de crecimiento que permiten la proliferación celular, pero también por esta razón tiene la desventaja de contaminarse por agentes biológicos como es el caso de los priones sustancias de origen proteico las cuales son causa de diversas enfermedades tanto en animales como en humanos. ^[21]

SUERO FETAL BOVINO	VALORES ESTANDAR
Proteínas Totales	3.5 g %
Albúmina	1.8 g/dl
α Globulina	0.1 g/dl
β Globulina	1.3 g/dl
μ Globulina	0.3 g/dl
Glucosa	66 mg/dl
Urea	36 mg/dl
Creatinina	2.9 mg/dl
Hemoglobulina	<10 mg %
pH (25oC)	7,20
Osmolaridad	322 mOsm/Kg.H2O
Esterilidad	Ausencia de Agentes Adventicios (Sabourad e Tioglicolato)
Mycoplasma	No detectada (Medios: Líquido-U9, sólido A-7)
Anticuerpos IgG	No detectada (Inmunodifusión radial)
Anticuerpos Anti-VIA	No detectada (Técnica de Seroneutralización)
Anticuerpos Anti-IBR	No detectada (Técnica de Seroneutralización)
Anticuerpos Anti-BVD	No detectada (Técnica de Seroneutralización)
Anticuerpos Anti-BTV	No detectada (Técnica de Seroneutralización)
Endotoxinas	<- 1ng/ml (Teste LAL)
No. de Células Primarias	19 (Cel. de Líquido Amniótico)
No. de Repiques	10 (Cel. de Líquido Amniótico)
Curva de Crecimiento	CHO = 4.6. ¹⁰ 4 e 0.7 ^x
Curva de Crecimiento	VERO = 3.10 4 e 0.54x

Tabla No 1 composición y valores estándar del suero fetal bovino ^[22]

El desarrollo de un medio libre de suero o de proteínas humanas es importante debido a la producción de productos biológicos seguros usados en la terapia de vacunación. Se han modificado medios libres de suero con muy buena eficiencia para la producción de nuevas vacunas experimentales usando diferentes líneas celulares reemplazando los productos animales por extractos de plantas.^[21]

1.9. MEDIOS LIBRES DE SUERO FETAL BOVINO

Desarrollado para el uso en vacunas contra la rabia, se utilizaron células VERO adheridas, cultivadas en un bioreactor sin suero fetal bovino e infectado con el virus mencionado anteriormente, ya teniendo esta suspensión viral se concentró, inactivó, filtró y purificó por cromatografía e inactivó con β -propiolactona y se prueba su capacidad para producir inmunidad contra la rabia antes de liberar el lote.^[23]

Otro medio de cultivo libre de suero fetal bovino es el realizado por vías metabólicas el cual le proporciona el cual es suplemento de múltiples cultivos celulares. Este medio es característico por inducir el crecimiento en cultivos de células como MDCK, MDBK y VERO. Las ventajas que provee este medio es la eliminación de posibles contaminaciones, simplifica la regulación de la documentación y reduce los métodos de purificación. Es utilizado en el cultivo de hibridomas de insectos, terapia génica y vacunas virales.^[24]

1.10. NAD (Nicotinamida adenina Dinucleótido)

Todos los organismos producen su energía a través de la degradación de moléculas comestibles como los son la glucosa y los ácidos grasos. En organismos aerobios el ultimo aceptor de electrones es el oxígeno pero para que sean transportados a moléculas combustibles es necesario tener una sustancia que los transporte los productos se degraden para formar oxígeno. El NAD es el principal aceptor de electrones de las moléculas comestibles para que se lleve a cabo la formación de O_2 .^[25]

El anillo del NAD se sintetiza a partir del triptófano y la glutamina le proporciona el grupo amida a la nicotinamida (también conocida como Niacinamida interviniendo en el funcionamiento del NAD en reacciones de oxidación y reducción reversibles, jugando un papel importante en el metabolismo.

La función de la niacina en el metabolismo, explica su importancia en la nutrición humana y al uso que hacen de ella las bacterias y las levaduras. ^[26]

El NAD y el NADP, las formas de ácido nicotínico con actividad fisiológica, tienen una función vital en el metabolismo como coenzimas para una amplia variedad de proteínas que catalizan reacciones de oxidación-reducción esenciales para la respiración de los tejidos. Las coenzimas, unidas a deshidrogenasas apropiadas, funcionan como oxidantes al aceptar electrones e hidrógeno provenientes de sustratos y, así, quedar reducidas. Los nucleótidos de piridina reducidos, a su vez, se reoxidan mediante las flavoproteínas. El dinucleótido de nicotinamida y adenina también participa como sustrato en la transferencia de mitades ADP-ribosil a proteínas. ^[27]

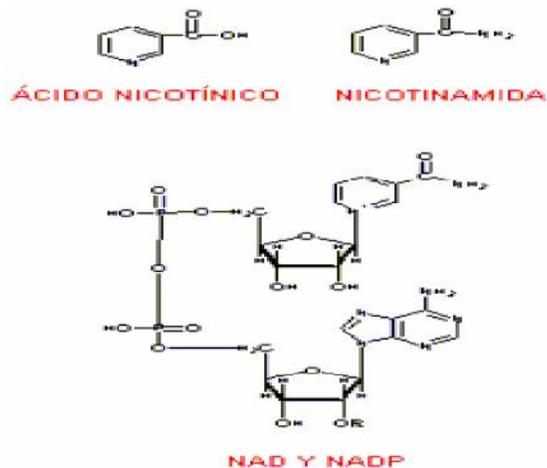


Fig. No 1 estructura del NAD ^[28]

1.11. EXTRACTO DE LEVADURA

Saccharomyces cerevisiae es un hongo unicelular del cual se obtiene la levadura de pan. Todos los estudios sobre el ciclo celular se han basado en este microorganismo, debido a sus tiempos de generación cortos que consta de 90 minutos en comparación con los de 24 horas que dura el de las células animales y su genoma 100 veces menos complejo que el de un mamífero, pero mantiene la misma organización celular que los eucariotas multicelulares. Los fundamentos del conocimiento actual del ciclo celular en levaduras vienen de la búsqueda sistemática de mutaciones en genes que codifican para componentes de la maquinaria del ciclo celular realizada por Hartwell, Culotti y Reid en 1970.

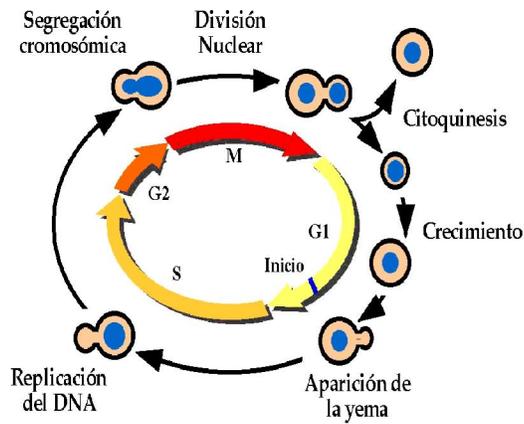


FIG: No 2 ciclo celular de *Sacharomyces cerevisiaea* ^[29]

En 1996, se realizaron los primeros estudios génicos, en la actualidad se conoce el genoma completo y se hace referencia al genoma humano, por la semejanza en sus genes.

Dentro de la composición de la levadura se encuentra una serie de 9 proteínas quinasas dependientes de ciclinas (Cyclin Dependet Kinases) que intervienen en procesos claves del ciclo celular: la entrada al ciclo, la síntesis de DNA y la regulación de la mitosis. ^[29]



FIG. No 3 *Saccharomyces cerevisiaea* ^[29]

1.12. *Caléndula officinalis*.

Planta anual o perenne originaria del sur de Europa y en México, cultivada como planta de ornato, se encuentra presente en clima semiseco y templado desde los 20 hasta 200m sobre el nivel del mar. ^[30]

Es considerada en la medicina tradicional por sus ya conocidas propiedades antiinflamatorias, antitumorales diuréticas bactericidas, antivirales, favorece la aparición de la menstruación, la cicatrización de las úlceras en el estómago, alivia la gastritis, útil en las afecciones de la piel como llagas, verrugas y callos y como cicatrizante de la piel entre otras. ^[31]

1.12.1. FITOQUIMICA.

Las flores de caléndula contienen carotenoides, flavonoides, saponinas resinas, aceites esenciales y pequeñas cantidades de ácido salicílico. ^[32]

Hay otras especies de caléndula en las que se han realizado estudios, encontrado actividad antiviral en saponinas triterpenoides estos estudios fueron realizados en el año de 1991^[33] en el Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV) en cultivos celulares.

En el año de 2006 se publican estudios realizados por Barajas Frías y Pérez Carreón sobre el efecto dual de *Caléndula Officinalis* en cultivos primarios de hepatocitos de rata. A diferentes concentraciones tiene efecto citotóxico y quimioprotector dependiente de la dosis. ^[34]

Gardea y Vera en 2006 ^[35] logran sustituir hasta un 96% el suero fetal bovino en cultivos celulares por una concentración de extracto de caléndula 4.9×10^{-4} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. dándonos la pauta para la total eliminación del suero fetal bovino.



FIG No 4 Flor de caléndula officinalis

1.13. CÉLULAS VERO.

Fue obtenida a partir de un mono verde africano adulto normal (ATCC-CCL-81) (*Cercopithecus aethiops*) el 27 de marzo de 1952 por Yasumura, Y. Kawakita. Esta línea es sensible al poliovirus 3, herpes virus 3 y 7. El medio de cultivo empleado es 199 con 5% de SFB y el medio de postinoculación es 199 con 2% de SBF y antibiótico 0,1% (concentración final Penicilina 100U/ml Estreptomina 100mg/ml).^[36]

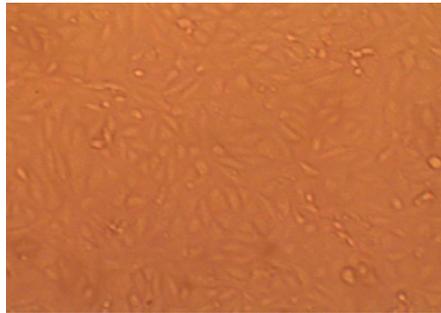


FIG. No 5 monocapa de células VERO

1.14. CÉLULAS RK-13

Obtenidas de riñón de conejo cultivadas en medio esencial mínimo (MEM) suplementado con suero fetal bovino. En el 2004 un estudio presentado demuestra que esta línea celular a concentraciones de suero fetal bovino del 5 crecen mejor que al 7%. Mediante una curva de crecimiento y conteo de células, analizando el tiempo de duplicación (TD) y la fase de latencia (lag).^[37]

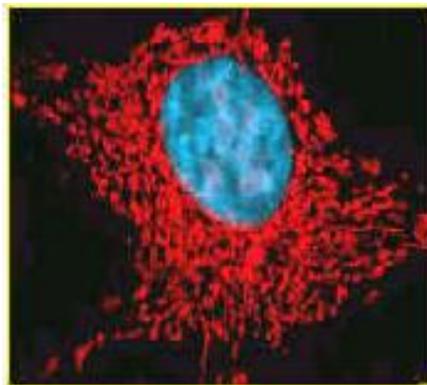


FIG. No 6 célula RK-13

1.15. MTT o 3-[4,5-dimetiltiazol-II]-2,5-difeniltetrazolio

Mosmann en 1983 desarrolla este método siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang. Conocido como Azul de tiazol, tiene una coloración cuando se encuentra oxidado (amarillo) y otra al reducirse (azul).

La prueba de MTT se basa en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa (compuesto de color azul) formado por las células viables. La intensidad del color azul será proporcional al número de células vivas presentes.^[38]

1.16. HIPOTESIS:

Si se sustituye el suero fetal bovino de cultivos celulares por extracto de caléndula, levadura, NAD o sus posibles mezclas y se obtienen confluencias iguales o superiores que con SFB, entonces se habrá encontrado un sustituto.

1.17. JUSTIFICACIÓN:

La mayor parte de la investigación que se ha realizado en busca de sustituir el suero fetal bovino de los cultivos celulares, es debido a la posible contaminación por un agente infeccioso denominado prion que es causante de enfermedades tanto en animales como en humanos como es el caso de la enfermedad de Creusfeldt y Jacob y de las encefalopatías espongiformes bovinas. En la actualidad México esta libre del prion pero siempre existe el peligro de que las vacunas puedan contenerlo. Otro motivo es el alto costo del suero, si se tiene otra alternativa más económica se podrían reducir costos en investigación y en producción de biológicos.

2.0. OBJETIVOS:

2.1. General:

Evaluar la sustitución del SFB en dos líneas celulares, utilizando NAD, extractos de *Caléndula officinalis* y levadura de pan o sus posibles combinaciones.

2.2 Particulares:

- Realizar un extracto etanólico de caléndula y determinar su concentración
- Preparar una solución de NAD a una concentración de 120µg/µl
- Obtener un extracto acuoso de levadura de pan (estéril).
- Hacer pruebas individuales con cada uno de los sustitutos.
- Realizar la mezcla de los tres sustitutos anteriormente mencionados.
- Establecer el rango de concentración a las que mejor funcionen.

3.0. METODOLOGIA.

3.1 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS.

3.1.1 Extracto etanólico de caléndula.

Se colocaron 20 ml del extracto en un tubo, esterilizando por filtración con membranas de 0.22 μm (millipore), la caléndula ya estéril se lleva a sequedad a 56 °C, con una espátula se retira la materia seca y se pesaron 1.4 mg se disuelven en 1.4 ml de DMSO y se aforan a 20 ml para una concentración final de 0.0651mg/ml. Esta solución se esterilizo por filtración con membrana de 0.22 μm (millipore) y se conserva a 4 °C para su uso. ^[35]

3.1.2 Extracto acuoso de levadura de pan.

Se colocó una barra de 400 g de levadura de panadería en una palangana con 2250 ml de agua destilada, se macera hasta disolución completa, se tomó 1000 ml y se calentó a 80 °C por 20 minutos, se deja sedimentar y se utiliza solo el sobrenadante y se centrifuga a 3000 rpm por 5 minutos. Colocar 100 ml del sobrenadante y filtrar con membrana millipore de 0.22 μm y conservar a 4° C hasta su uso. Para conocer la concentración del extracto se pesaron tres viales secos y estériles, se registraron los pesos en una balanza analítica, después se agregó 1 ml del extracto y se llevaron a sequedad a 56° C. ya seco el extracto se pesaron los viales restando los pesos finales, sacando una media obteniendo una concentración de 30 mg/ml.

3.1.3 NAD.

Se colocaron 3 gr. de NAD en un vaso de precipitado de 20 ml se disolvió en agua destilada y se aforo a 25 ml, se filtro en membrana millipore 0.22 μm y se conservo a 4 ° C hasta su uso, con una concentración final de 120 $\mu\text{g/ml}$.

3.1.4 Mezclas entre extracto de levadura NAD y extracto de caléndula.

Se realizaron mezclas 50:50 de la siguiente manera: 5 ml de NAD y 5 ml de extracto de caléndula, 5ml de extracto de levadura y 5 ml de caléndula, 5 ml de extracto de levadura y NAD y finalmente 5 ml de NAD, 5 ml de extracto de levadura y 5 ml de caléndula. (Ver diagrama de trabajo)

3.1.5 CULTIVO CELULAR.

Las células VERO y RK- 13 fueron donadas por el laboratorio de Biología celular de la FES Cuautitlán campo 4.

Los cultivos y la preparación de los reactivos (ver anexo preparación de reactivos) fueron realizados en cámara de flujo laminar.

Las células VERO y RK-13 antes del enfrentamiento con los sustitutos eran cultivadas en cajas Petri de 20 ml con D-MEM y SFB al 10% e incubadas en estufa de CO₂ a 37 ° C y monitoreadas diariamente en microscopio de luz invertido hasta tener un 100% de confluencia celular.

3.1.6 ENFRENTAMIENTO DE LAS CELULAS -SUSTITUTOS.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, utilizándose cajas Petri de 20 ml con células al 100 % de confluencia. Se tripzinizaron (ver anexo de técnicas) para desprender la monocapa de células, se transfirieron a un tubo de vidrio para centrifuga de 50 ml estéril y se le adicionó D-MEM sin SFB hasta un volumen final de 20 ml. En esta suspensión de células se colocaron 200 µl y se colocaron en un vial eppendorf que contenían un volumen igual de colorante Azul de tripán para realizar un conteo celular en la cámara de Neubauer. (Ver anexo de técnicas).

En 5 viales estériles, se prepararon los sustitutos tal y como se menciona en la metodología, al control positivo se le adicionaron 10 ml de D-MEM y 1 ml de SFB, el blanco contiene solo D-MEM y el control negativo consiste de células y medio. Posteriormente en una microplaca estéril de 96 pozos se colocaron en la columna 1; 200 µl del sustituto o la mezcla de ellos, de la 2 a la 9 se colocan 100 µl de D-MEM, para tomarse de la columna que contiene el extracto 100 µl para después realizar las diluciones dobles hasta la columna 9. De la columna 1 a la 9 se adicionan 100 µl de células. Cada 2 filas de la microplaca corresponden a cada una de las concentraciones que se prueban. El volumen final de cada uno de los pozos es de 200 µl.

Los pozos de la columna 10 corresponden al blanco, la 11 al control positivo y la 12 al negativo. Los pozos de la columna blanco solo contienen 200 μ l de D-MEM, los del control positivo 100 μ l D-MEM con SFB al 10% y células cambiando con respecto al negativo es que este no contiene SFB.

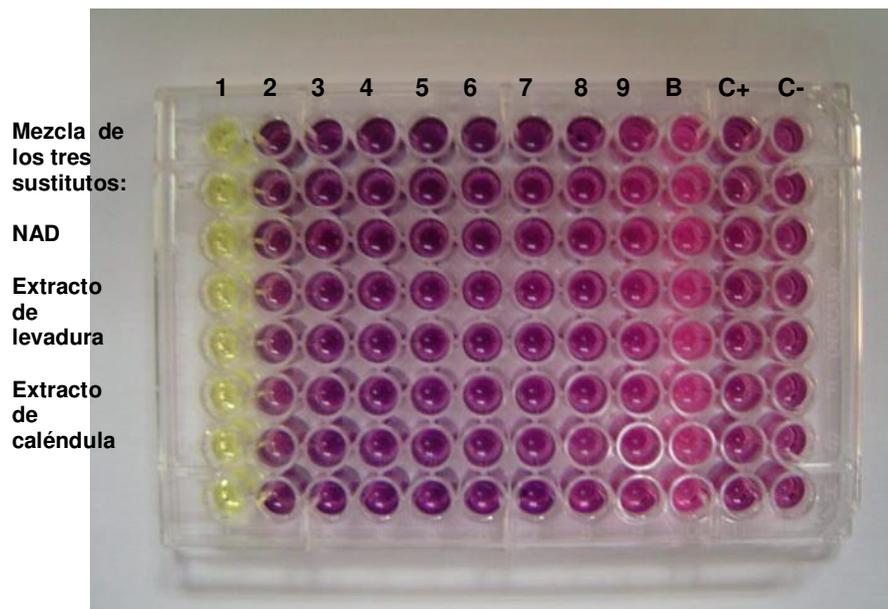
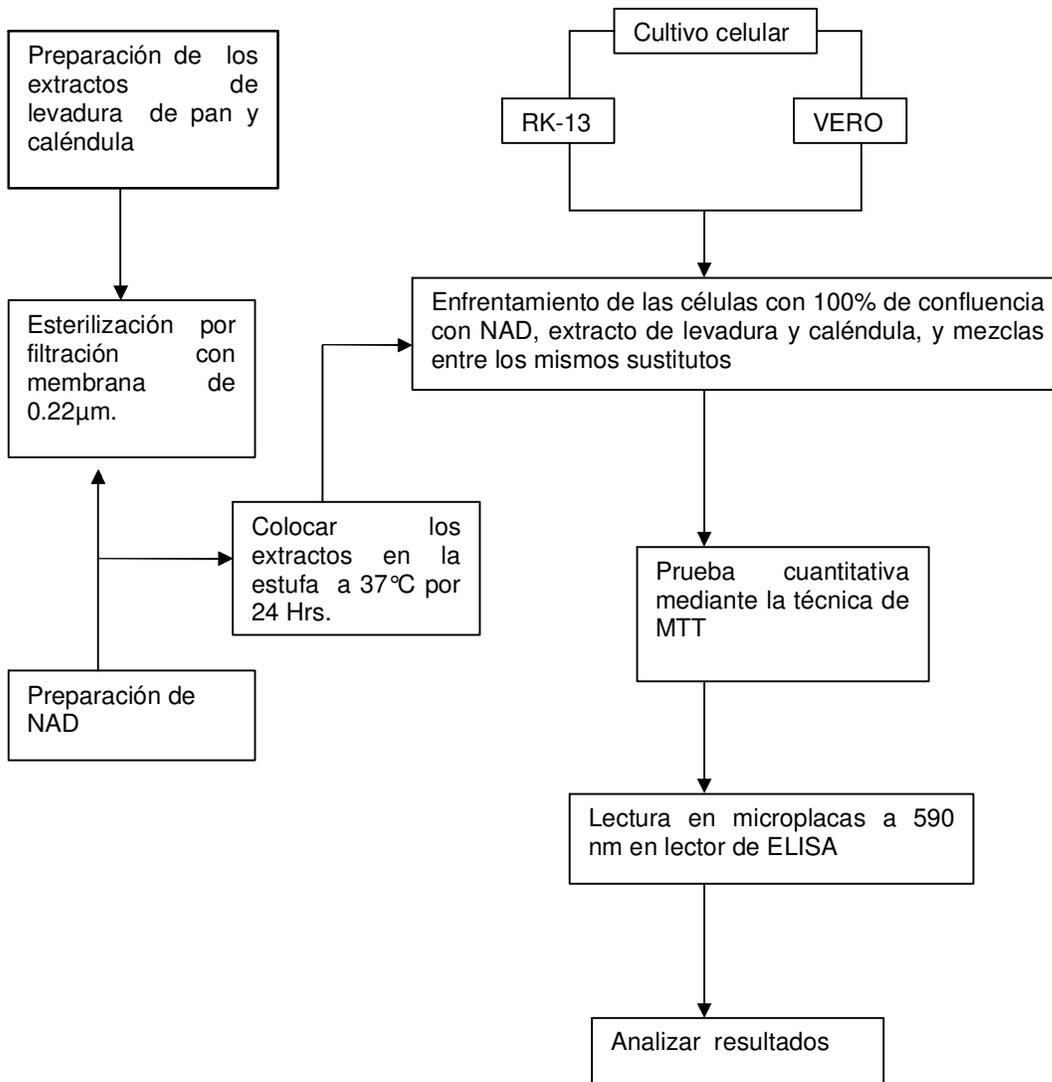


FIG. No 7 Placa de 96 pozos de fondo plano para cultivo celular

4.0. DIAGRAMA DE TRABAJO



5.0. RESULTADOS

5.1. RESULTADOS CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB SUSTITUYENDO CON NAD

Tabla No 2 Células VERO en MEM s/SFB sustituido por NAD

En esta tabla se observan las diferentes absorbancias obtenidas en la prueba cuantitativa de MTT. En la fila 5, 6, 7, 8 y 9 se observa que sobrepasan la absorbancia del control positivo, en este ensayo se adicionaron 10,000 células por pozo y se incubaron a 37 °C en CO₂ por 24 hrs.

	Absorbancias a 590 nm								
Células vero/ NAD	0,076	0,076	0,3859	0,94	1,122	1,179	1,137	1,084	1,07
Blanco	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
Control+	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049
Control-	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956

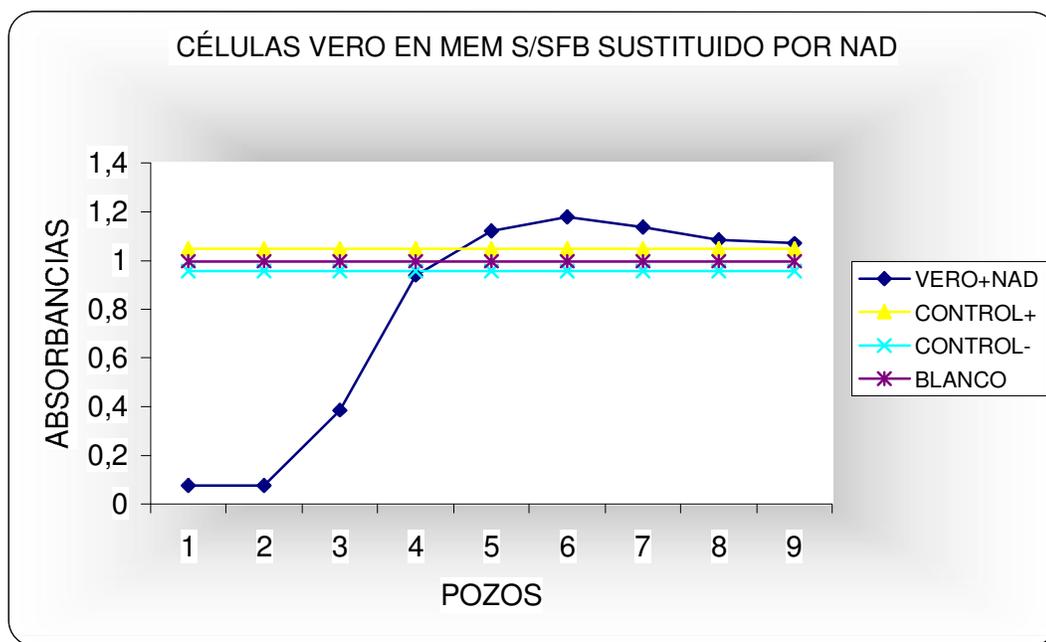


Gráfico No 1 Absorbancias de células VERO en MEM con respecto a las concentraciones de NAD

Se observa el comportamiento de las células VERO en MEM sin suero, suplementando con NAD. Los primeros 4 pozos presentan efecto citotóxico esto es a las concentraciones mas altas de NAD y el pozo No 5, 6, 7, 8 y 9 presenta un crecimiento mayor que el control positivo.

5.2. RESULTADOS CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB SUSTITUYENDO CON EXTRACTO DE LEVADURA.

Tabla No 3 Células VERO en MEM s/SFB sustituido por Extracto de Levadura.

En esta tabla se presentan resultados al enfrentar las células VERO sin suero fetal bovino con extracto de levadura teniendo absorbancias por debajo del control positivo incubándose a la misma temperatura, por el mismo tiempo y con la misma cantidad de células que el grafico anterior.

	Absorbancias a 590 nm								
Células vero/ Ex.L	0,748	0,9285	0,964	0,9775	0,996	0,9755	1	0,984	0,967
Blanco	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997	0,997
Control+	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049	1,049
Control-	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956	0,956

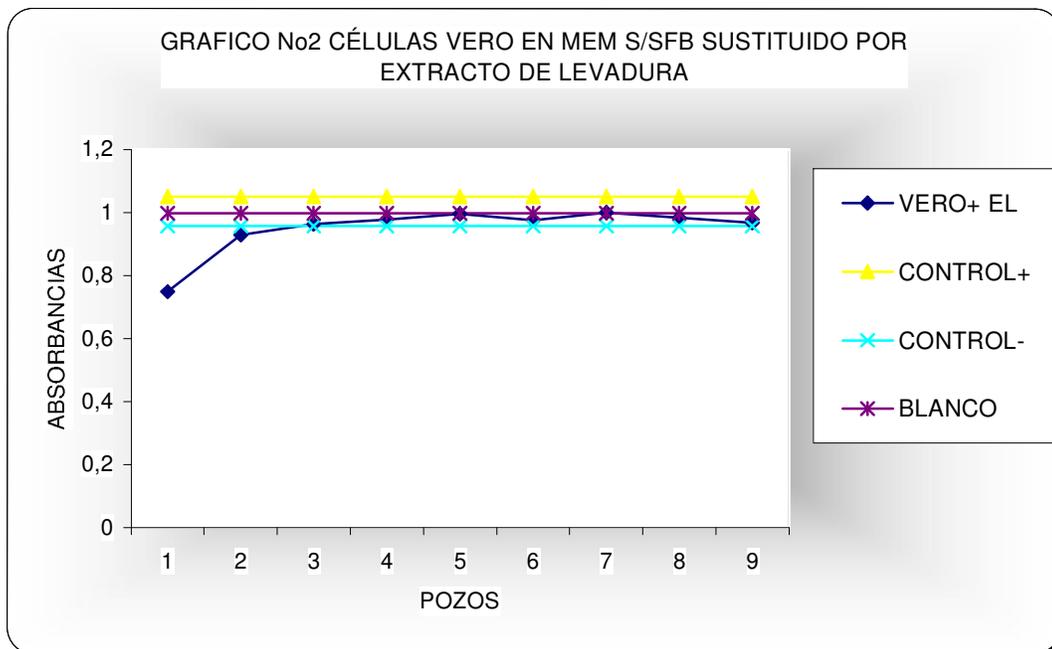


Gráfico No 2 Absorbancias de células VERO en MEM con respecto a las concentraciones de Extracto de levadura

En el caso del extracto de levadura las células no sobre pasan al control positivo, se observa efecto citotóxico en los pozos 1 y 2 permaneciendo con un mismo comportamiento durante todo el ensayo.

5.3. RESULTADOS CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB SUSTITUYENDO CON LAS DIFERENTES MEZCLAS DE EXTRACTOS Y NAD.

Tabla No 4 Células VERO en MEM S/SFB sustituido por las diferentes mezclas de extractos y NAD.

En esta tabla se observan las diferentes absorbancias al enfrentar a las células VERO con la mezcla de los diferentes extractos y NAD observándose que en la fila 1 que corresponde a la mezcla de levadura y caléndula y a la fila 5 en la que se encuentran los tres se sobrepasa la absorbancia del control positivo, pero en cambio la fila 2 y tres las absorbancias son mas bajas que el blanco. En este ensayo se adicionaron 38 000 células por pozos y se incubaron a 37°C en CO₂ por 72 horas.

ABSORNABCIAS a 590 nm									
LEV+CAL	0,5631	0,54	0,500	0,49085	0,5143	0,529	0,5228	0,5114	0,5034
NAD+LEV	0,0741	0,1659	0,483	0,51385	0,5447	0,502	0,5071	0,4912	0,5041
NAD+CAL	0,0804	0,2039	0,4488	0,4864	0,4821	0,497	0,4769	0,4956	0,4990
C+N+L	0,3037	0,4036	0,5172	0,5364	0,576	0,5420	0,5217	0,5170	0,5089
C+	0,5504	0,5504	0,5504	0,5504	0,5504	0,5504	0,5504	0,5504	0,5504
BLA	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246
NCO	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246	0,3246
C-	0,3688	0,3688	0,3688	0,3688	0,3688	0,3688	0,3688	0,3688	0,3688

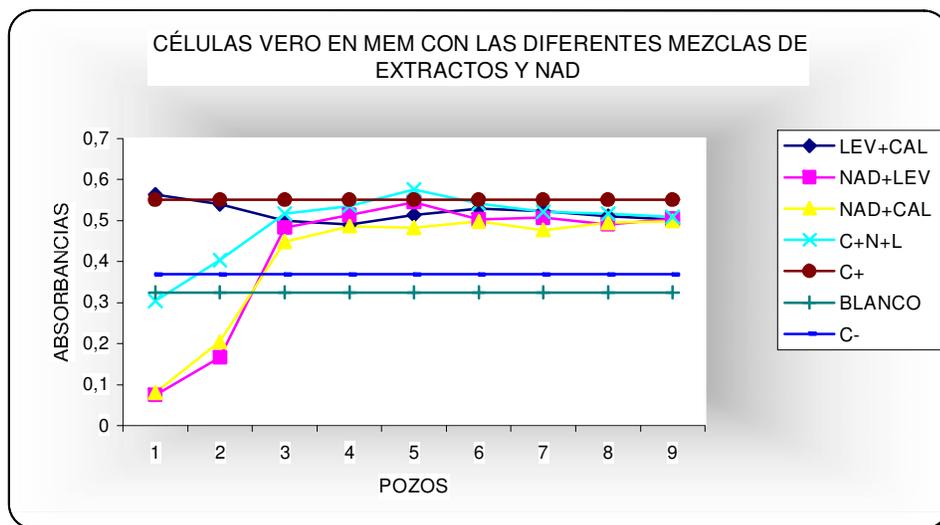


Gráfico No 3 Absorbancias de células en MEM con respecto a las concentraciones de las diferentes mezclas de extractos y NAD

5.4. RESULTADOS CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB SUSTITUYENDO CON LA MEZCLA DE EXTRACTOS DE CALENDULA, NAD Y EXTRACTO DE LEVADURA.

Tabla No 5 Células VERO en MEM s/SFB sustituido por la mezcla de extractos y NAD.

En comparación con las tablas anteriores se observa que en esta tabla no hay absorbancias que superen las del control negativo y solo la absorbancia del pozo 1 y 2 son menores que el control negativo. En este ensayo se adicionaron 8 000 células por pozos y se incubaron a 37 °C en CO₂ por 24 hrs.

Absorbancias a 590 nm									
NAD+ C+E L	0,068	0,842	1,095	1,193	1,239	1,265	1,261	1,241	1,218
Blanco	1,082	1,082	1,082	1,082	1,082	1,082	1,082	1,082	1,082
Control+	1,298								
Control-	1,075	1,075	1,075	1,075	1,075	1,075	1,075	1,075	1,075

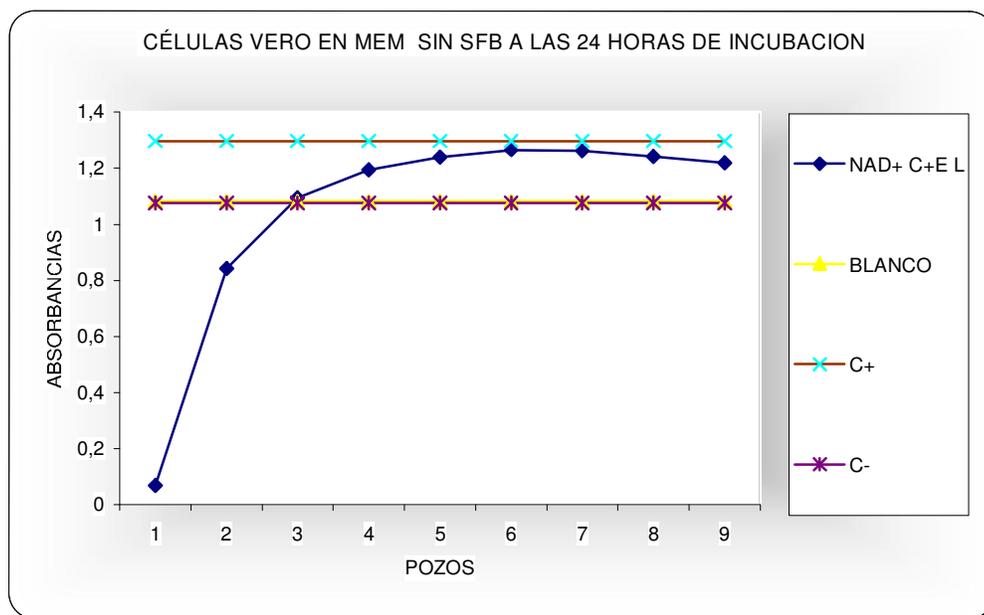


Gráfico No 4 Absorbancias de células VERO en MEM con respecto a las concentraciones de la mezcla de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula

Comparando la mezcla de los extractos y NAD contra el control positivo se observa que no sobrepasa al control positivo pero presenta un mejor comportamiento esto es solo se presenta efecto citotóxico en los dos primeros pozos y del 3 al 9 permanece entre valores del control positivo y negativo.

5.5. RESULTADOS CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB, PORCENTAJE DE CRECIMIENTO vs ABSORBANCIA.

Tabla No 6 Células VERO en MEM s/SFB, porcentaje de crecimiento contra absorbancias.

En esta tabla se encuentran los porcentajes de crecimiento de células vero esto es en base al control positivo a una confluencia del 100% comparando con los pozos problema encontrando que el mas cercano es el 97.5% correspondiente a la absorbancia 1,265.

ABSORBANCIA	% DE CRECIMIENTO
0,068	5,2
0,842	6,5
1,095	84,4
1,193	91,9
1,265	97,5
1,261	97,1
1,241	95,6
1,218	93,8
1,298	100

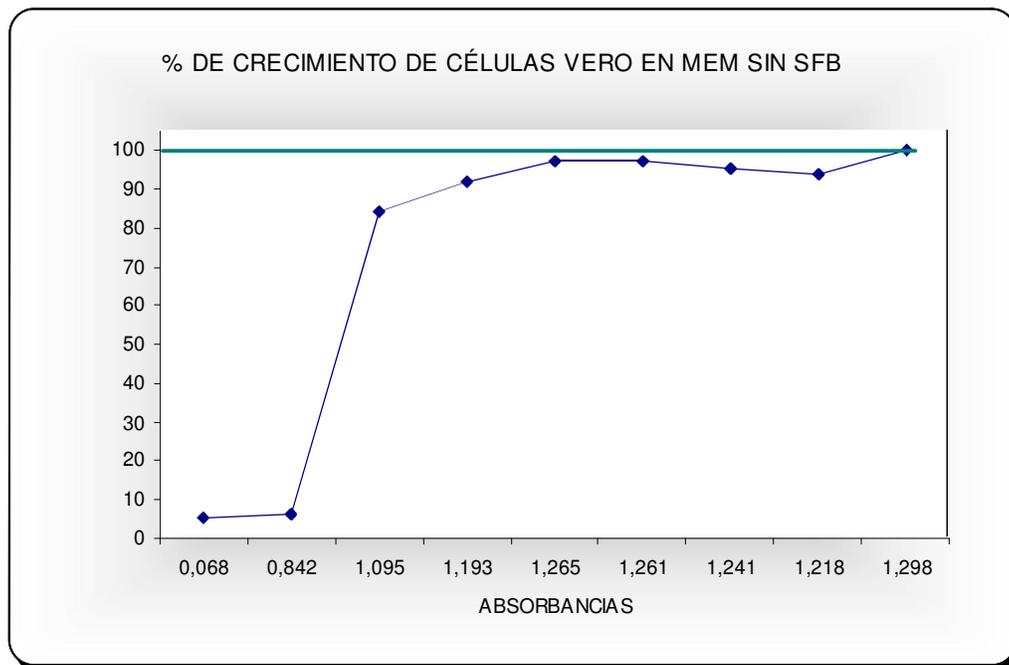


Gráfico No 5 Porcentaje de crecimiento de células VERO vs absorbancia

Comparando los porcentajes basándose en el control positivo se observa en las dos primeras absorbancias que el crecimiento no alcanza el 10 % pero de la absorbancia de 1,193 a la 1,218 se encuentra entre valores del 90 a 97%.

5.6. RESULTADOS CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB, PORCENTAJE DE CRECIMIENTO VS μg DE EXTRACTO DE CALÉNDULA.

Tabla No 7 Células VERO en MEM S/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de extracto de caléndula.

En esta tabla se observa que el rango de concentración de extracto de caléndula en la que se encuentra un porcentaje aproximado al 100% es 0,406 y 0,203 μg .

μg DE EXTRACTO DE CALÉNDULA	% DE CRECIMIENTO
13,02	5,2
6,51	6,5
3,25	84,4
1,62	91,9
0,81	95,5
0,406	97,5
0,203	97,1
0,102	95,6
0,051	93,8

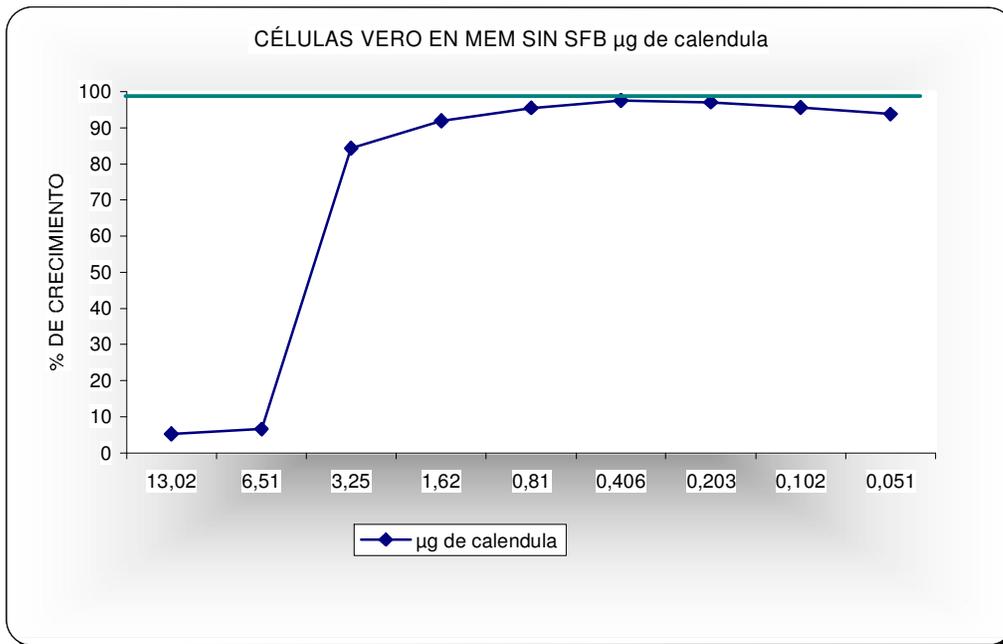


Gráfico No 6 Porcentaje de crecimiento de células VERO vs μg de extracto de caléndula

En este gráfico se observa que a concentraciones de caléndula de 13,02 y 6,51 μg de extracto de caléndula tiene un efecto citotóxico en las células y el rango en el que alcanza un valor aproximado al 100% de crecimiento es de 0,406 a 0,203 μg de extracto de caléndula.

5.7. RESULTADOS CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB, PORCENTAJE DE CRECIMIENTO VS μg DE EXTRACTO DE LEVADURA.

Tabla No 8 Células VERO en MEM s/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de extracto de levadura.

En esta tabla se observa que el rango de concentración de concentración a la que se encuentra un valor aproximado al 100% de crecimiento es 187,5 y 93,75 μg .

μg DE EXTRACTO DE LEVADURA	% DE CRECIMIENTO
6000	5,2
3000	6,5
1500	84,4
750	91,9
375	95,5
187,5	97,5
93,75	97,1
46,87	95,6
23,44	93,8

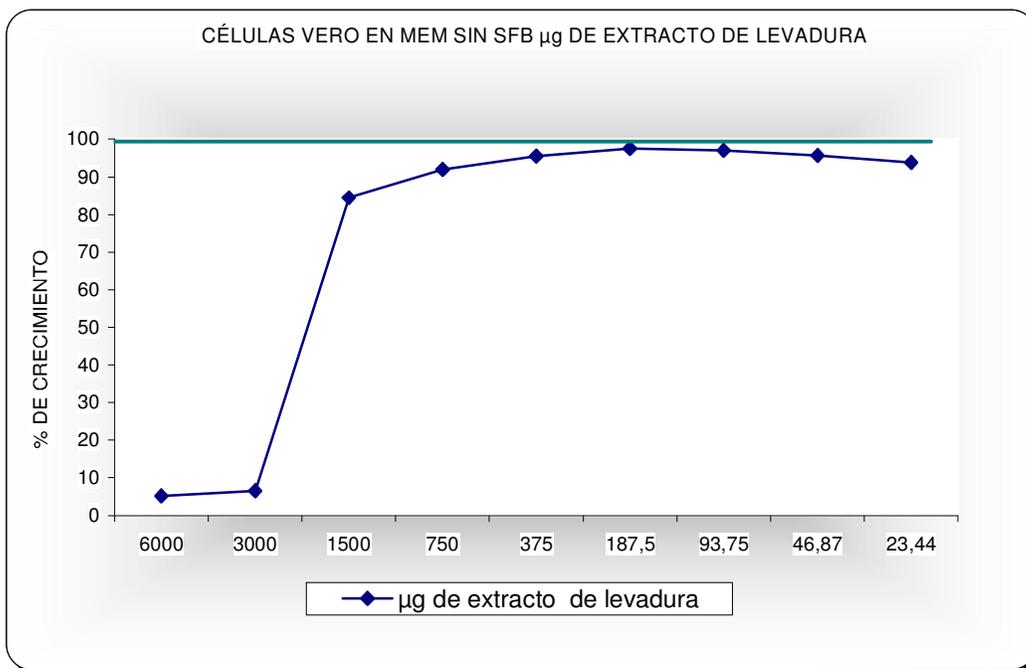


Gráfico No 7 Porcentaje de crecimiento de células VERO vs μg de extracto de levadura

En comparación con el gráfico anterior se observa que las concentraciones de extracto de levadura de 6000 y 3000 μg son mas altas dando efectos citotóxicos y de 187,5 y 93,75 μg se encuentra un valor aproximado al 100% de crecimiento.

5.8. RESULTADOS CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB, PORCENTAJE DE CRECIMIENTO VS μg NAD.

Tabla No 9 Células VERO en MEM s/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de NAD. Comparando con la tabla anterior las concentraciones a la que alcanzan un crecimiento aproximado al 100% son 750 y 375 μg de NAD.

μg DE NAD	% DE CRECIMIENTO
24000	5,2
12000	6,5
6000	84,4
3000	91,9
1500	95,5
750	97,5
375	97,1
187,5	95,6
93,75	93,8

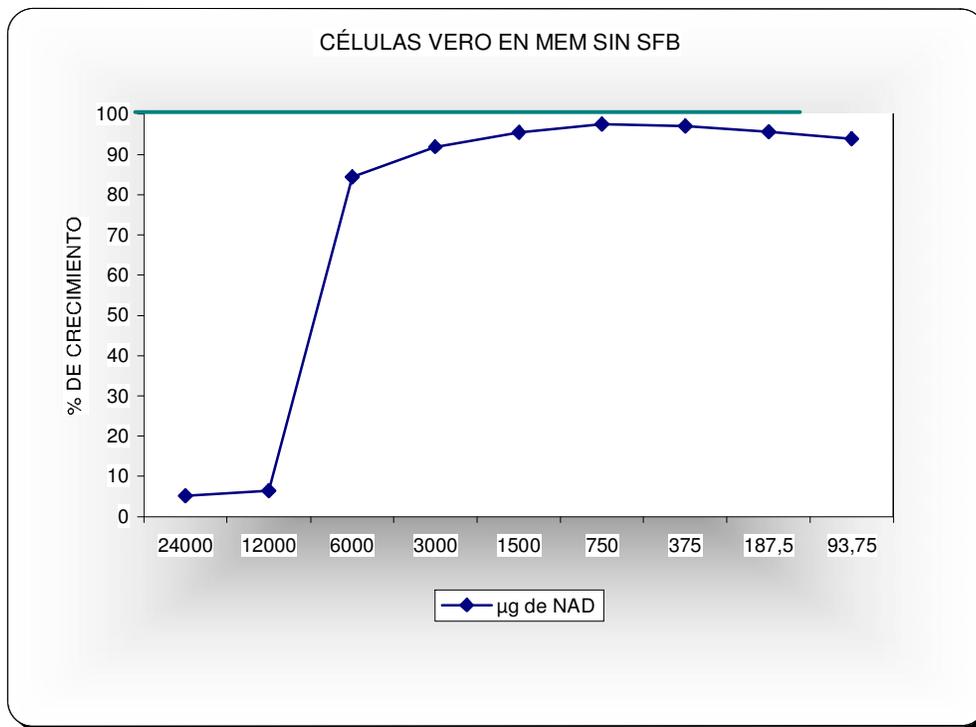


Gráfico No 8 Porcentaje de crecimiento de células VERO vs μg de NAD

En este gráfico se observa que las concentraciones de 24000 y 12000 μg de NAD hay un efecto citotóxico. Siendo las de 750 y 375 μg en las que se alcanzan un porcentaje de crecimiento de 97,5 y 97,1 respectivamente.

5.9. RESULTADOS CÉLULAS RK-13 EN MEM S/SFB SUSTITUYENDO CON NAD

Tabla No 10 Células RK-13 en MEM s/SFB sustituido por NAD.

En esta tabla se observa que ninguna absorbancia supera al control positivo es mas se encuentra por debajo del blanco. En este ensayo se adicionaron 6 000 células por pozo y se incubaron a 37 °C en CO₂ por 24 horas.

Absorbancias a 590 nm									
RK-13/NAD	0,06	0,06	0,477	0,977	0,996	0,971	1	0,984	0,96
Blanco	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02
Control +	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089
Control -	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001

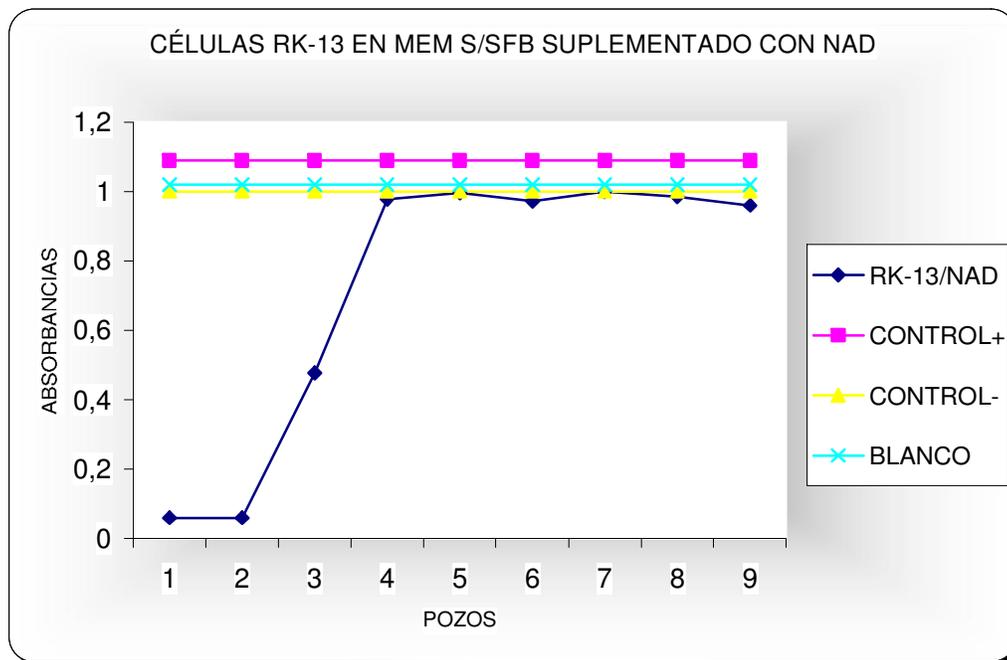


Gráfico No 9 Absorbancias de células RK-13 en MEM con respecto a las concentraciones de NAD

En este gráfico se observa el comportamiento de las células RK-13 suplementado con NAD dando como resultado que en todo el ensayo hay un efecto citotóxico en las células ya que no sobrepasan por lo menos al blanco.

5.10. RESULTADOS CÉLULAS RK-13 SUSTITUYENDO CON EXTRACTO DE LEVADURA.

Tabla No 11 Células RK-13 en MEM s/SFB sustituido por extracto de levadura.

En comparación con la tabla anterior se observa que de la fila 5 a la 9 presentan absorbancias mayores al control negativo pero menores al control positivo, se adicionaron la misma cantidad de células, a la misma temperatura y por el mismo tiempo.

Absorbancias a 590 nm									
RK-13/NAD	0,64	0,863	0,934	0,917	1,02	1,024	1,03	1,02	1,03
Blanco	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02	1,02
Control +	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089	1,089
Control -	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001	1,001

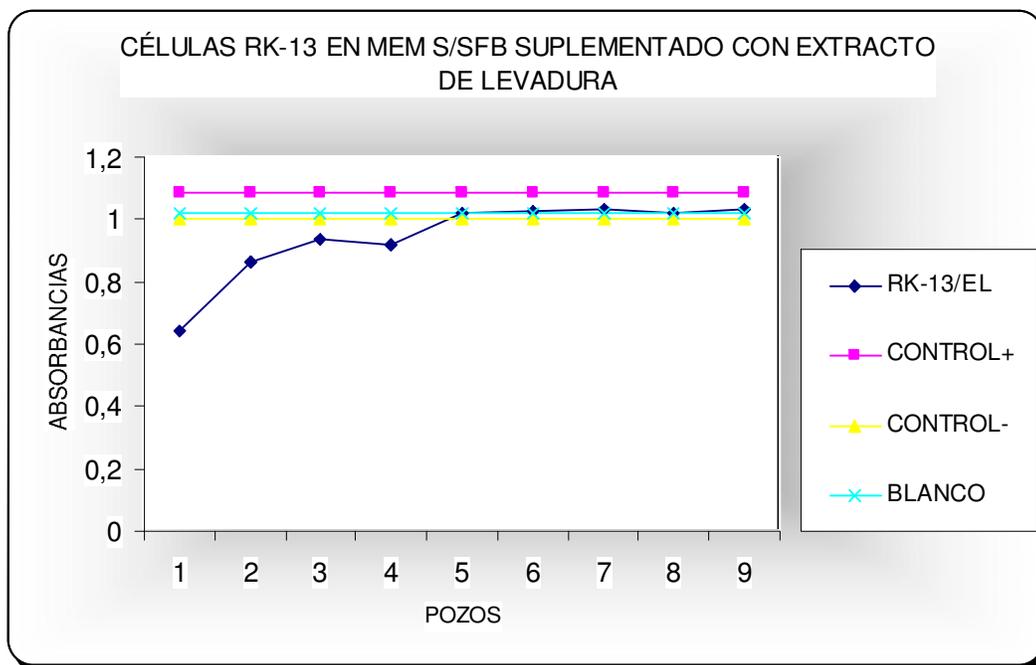


Gráfico No 10 Absorbancias de células RK-13 en MEM con respecto a las concentraciones de extracto de levadura.

En comparación con el gráfico anterior el extracto de levadura solo presenta efecto citotóxico del pozo 1 al 4 y manteniéndose por arriba del control positivo del 5 al 9 pero no superando al control positivo.

5.11. RESULTADOS CÉLULAS RK-13 EN MEM S/SFB SUSTITUYENDO CON LA MEZCLA DE EXTRACTOS DE CALENDULA, NAD Y EXTRACTO DE LEVADURA.

Tabla No 12 Células RK-13 en MEM s/SFB sustituido por la mezcla de extractos y NAD.

En esta tabla se observan absorbancias superiores al control positivo desde la fila 3 a la 8, solo se presentaron absorbancias menores en la fila 1 y 2. En este ensayo se adicionaron 19 000 células por pozo y se incubaron a 37 °C en CO₂ por 24 horas.

Absorbancias a 590 nm									
NAD + C + E L	0,101	1,0493	1,2809	1,3536	1,3814	1,3505	1,3135	1,2235	1,1353
Blanco	0,964	0,9645	0,9645	0,9645	0,9645	0,9645	0,9645	0,9645	0,9645
Control +	1,178	1,1789							
Control-	1,067	1,0675	1,0675	1,0675	1,0675	1,0675	1,0675	1,0675	1,0675

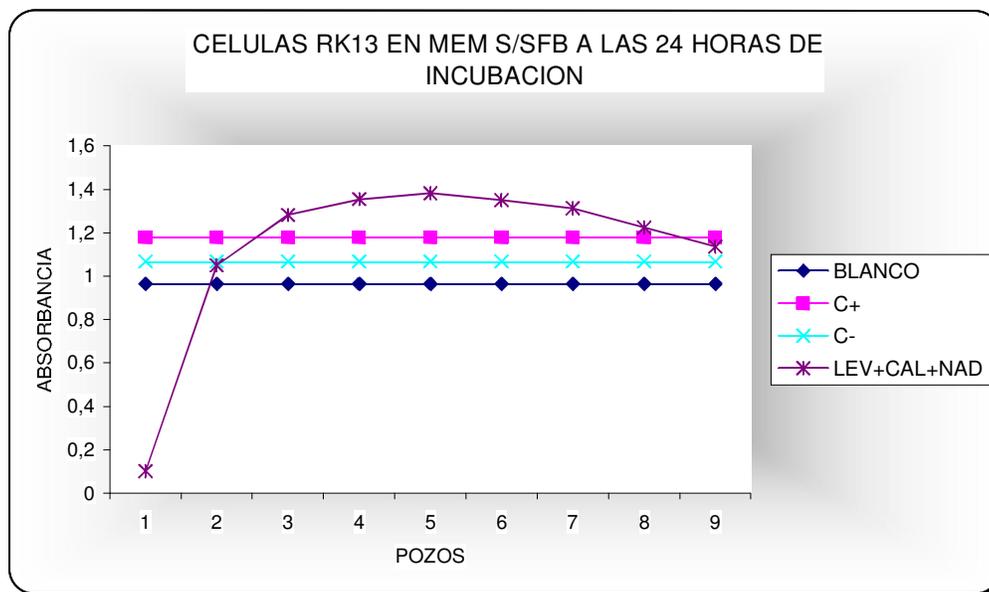


Gráfico No 11 Absorbancias de células RK-13 con respecto a las concentraciones de la mezcla de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula

En este gráfico se observa efecto citotóxico solo en el primer pozo pero del 3 al 9 se ve claramente como es superado por la mezcla de los extractos y NAD.

5.12. RESULTADOS CÉLULAS RK-13 EN MEM S/SFB, PORCENTAJE DE CRECIMIENTO vs ABSORBANCIA.

Tabla No 13 Células RK-13 en MEM s/SFB, porcentaje de crecimiento contra absorbancias.

En esta tabla se observan absorbancias superiores desde la fila 3 a la 8 comparado con una confluencia del 100% del control positivo, en el que el valor más alto es de 117%.

ABSORBANCIA	% DE CRECIMIENTO
0,1011	8,57
1,0493	89
1,2809	108,65
1,3536	114,82
1,3814	117,18
1,3505	114,55
1,3135	111,42
1,2235	103,78
1,1353	96,3
1,1789	100

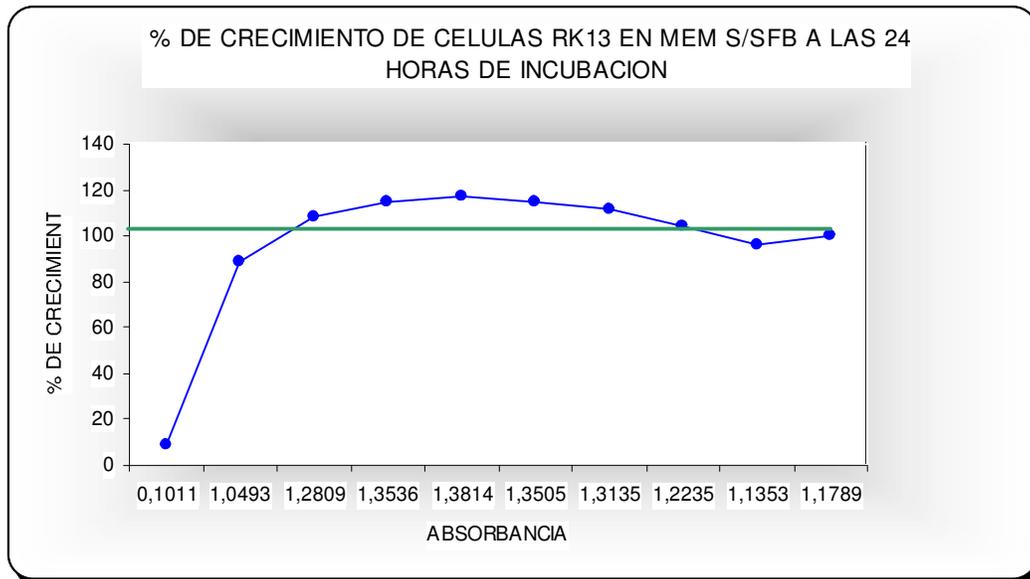


Gráfico No 12 Porcentaje de crecimiento de células RK-13 vs absorbancia

En este gráfico se observa el crecimiento de las células RK-13 con respecto a las absorbancia dando en la primera un efecto citotóxico, obteniéndose un rango de absorbancias de 1,2809 a 1,2235 en los cuales superan al control positivo

5.13. RESULTADOS CÉLULAS RK-13 EN MEM S/SFB, PORCENTAJE DE CRECIMIENTO VS μg DE EXTRACTO DE CALÉNDULA.

Tabla No 14 Células RK-13 en MEM s/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de extracto de caléndula.

En esta tabla se muestra el porcentaje de crecimiento a determinadas concentraciones de extracto de caléndula, dando un rango de 3,25 a 0,102 μg de extracto de caléndula en el cual supera al control positivo.

μg DE EXTRACTO DE CALÉNDULA	% DE CRECIMIENTO
13,02	8,57
6,51	89
3,25	108,65
1,62	114,82
0,81	117,18
0,406	114,55
0,203	111,42
0,102	103,78
0,051	96,3

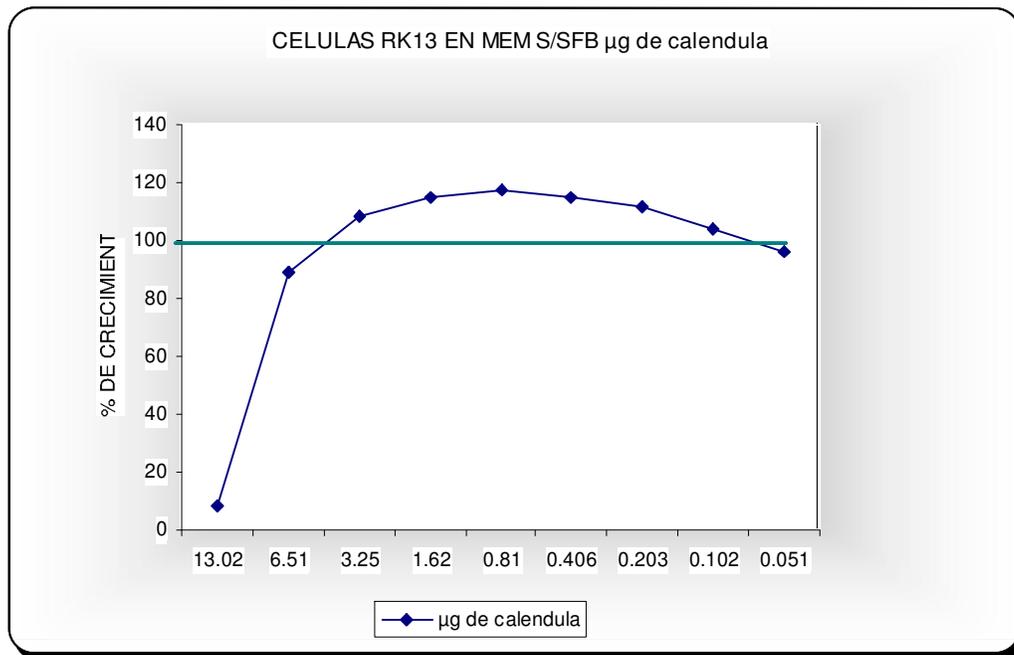


Gráfico No 13 Porcentaje de crecimiento de células RK-13 vs μg de extracto de caléndula

En este gráfico se observa que la concentración de 13,02 μg de extracto de caléndula presenta un efecto citotóxico pero en el rango de 3,25 a 0,102 presenta un efecto promotor del crecimiento, mayor que el control positivo.

5.14. RESULTADOS CÉLULAS RK-13 EN MEM S/SFB, PORCENTAJE DE CRECIMIENTO VS μg DE EXTRACTO DE LEVADURA.

Tabla No 15 Células RK-13 en MEM s/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de extracto de levadura.

En esta tabla se presentan datos de concentraciones de extracto de levadura en los cuales presentan un crecimiento superior al control positivo. Estas son de 1500 a 46.78 μg de extracto de levadura.

μg DE EXTRACTO DE LEVADURA	% DE CRECIMIENTO
6000	8,57
3000	89
1500	108,65
750	114,82
375	117,18
187,5	114,55
93,75	111,42
46,87	103,78
23,44	96,3

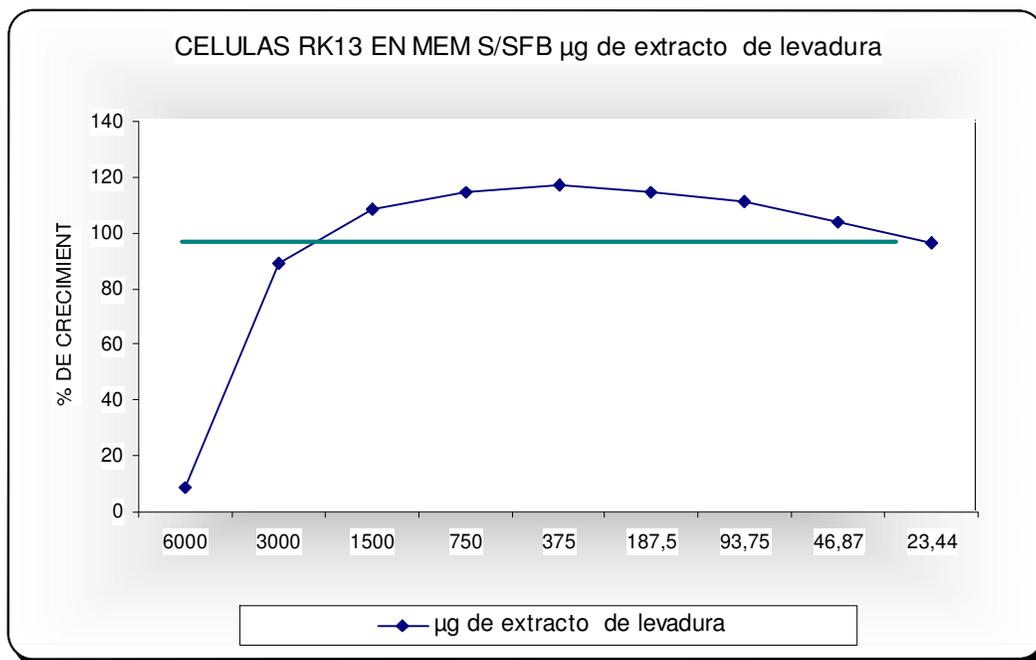


Gráfico No 14 Porcentaje de crecimiento de células RK-13 vs μg de extracto de levadura

En este gráfico se observa que la concentración de extracto de levadura en la cual hay un efecto citotóxico es la de 6000 μg y el rango en el cual hay un efecto promotor del crecimiento es de 1500 a 46.87 μg .

5.15. RESULTADOS CÉLULAS RK-13 EN MEM S/SFB, PORCENTAJE DE CRECIMIENTO VS μg DE NAD.

Tabla No 16 Células RK-13 en MEM s/SFB, porcentaje de crecimiento contra μg de NAD.

En la tabla que se presenta a continuación encontramos concentraciones de NAD en las cuales hay porcentajes de crecimiento superiores al 100%, en un rango de 6000 a 187.5 μg de NAD.

μg DE EXTRACTO DE NAD	% DE CRECIMIENTO
24000	8,57
12000	89
6000	108,65
3000	114,82
1500	117,18
750	114,55
375	111,42
187,5	103,78
93,75	96,3

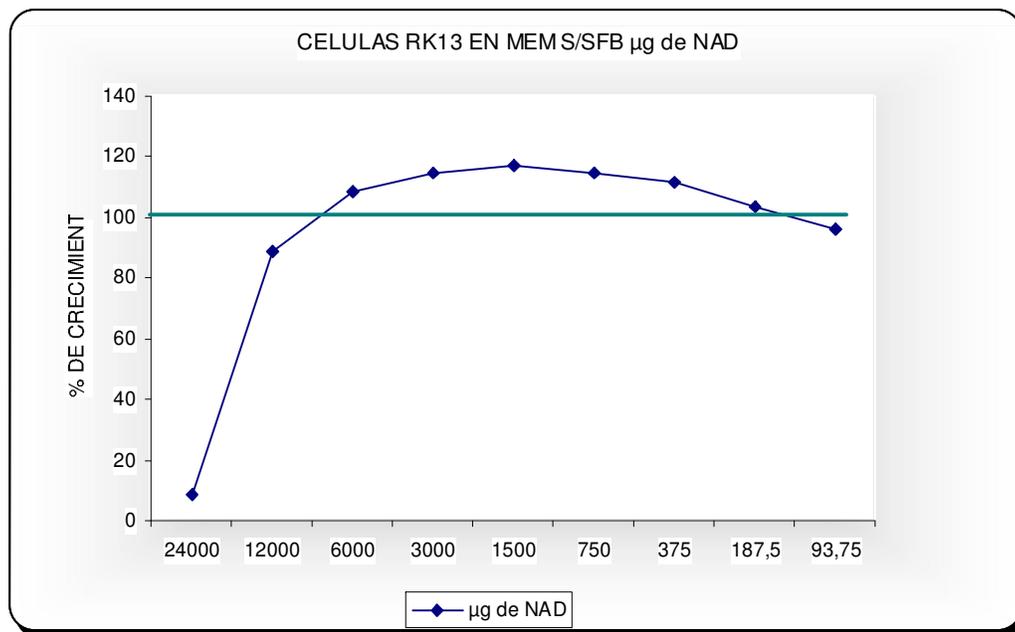


Gráfico No 15 Porcentaje de crecimiento de células RK-13 vs μg de NAD.

Este gráfico representa el efecto que hay a diferentes concentraciones de NAD. A 24000 μg de NAD se presenta efectos citotóxicos en las células y de 6000 a 187.5 μg promotor del crecimiento.

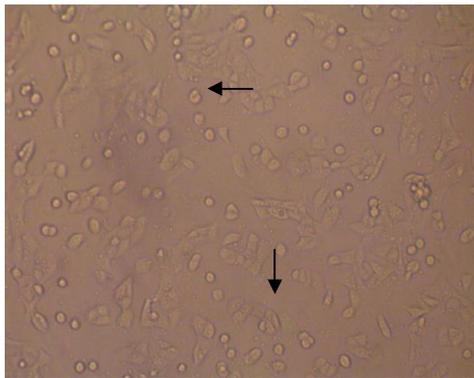


FIG. No 8 células VERO en MEM S/SFB sustituido con Con extracto de levadura a una concentración de 1500 µg. Nótese el daño de las células

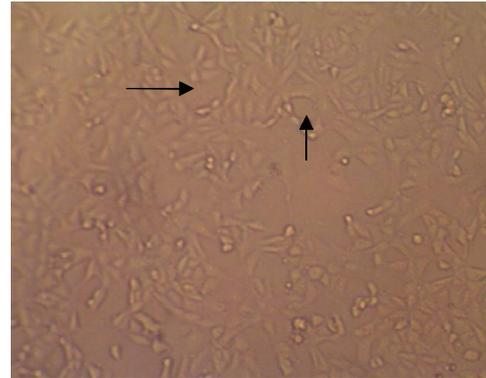


FIG. No 9 células VERO en MEM S/SFB sustituido con NAD a una concentración de 1500 µg nótese el buen estado de las células, comparable con el control positivo como en confluencia y morfología.

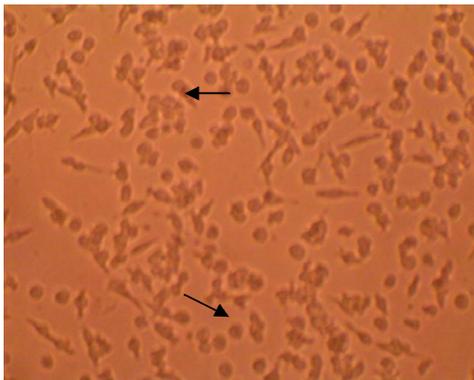


FIG. No 10 células RK-13 en MEM S/SFB sustituido con Con extracto de levadura a una concentración de 1500 µg. Nótese el daño de las células

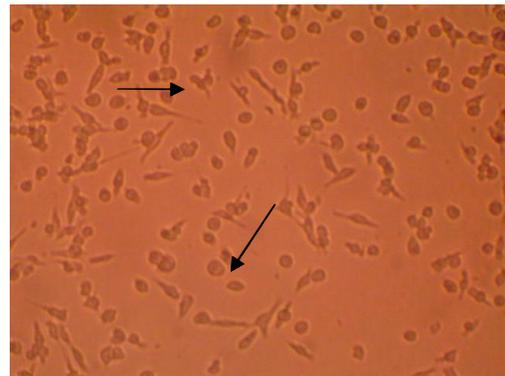


FIG. No 11 células RK-13 en MEM S/SFB sustituido con NAD a una concentración de 1500 µg nótese el daño celular

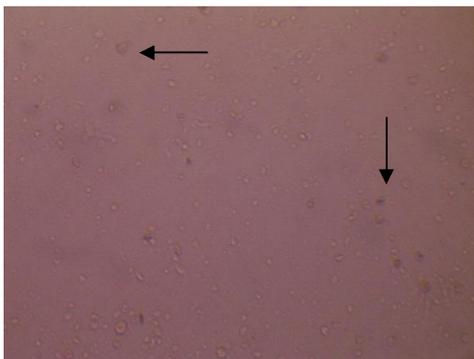


FIG. No 12 células VERO en MEM S/SFB sustituido con Extracto de levadura y caléndula a una concentración De 3.25/ 1500 µg. Se observa poca confluencia y un Efecto citotóxico en las células



FIG. No 13 células VERO en MEM S/SFB sustituido con extracto de caléndula y NAD a una concentración de 3.25/ 6000 µg. Nótese una buena confluencia celular pero una mala morfología de las células

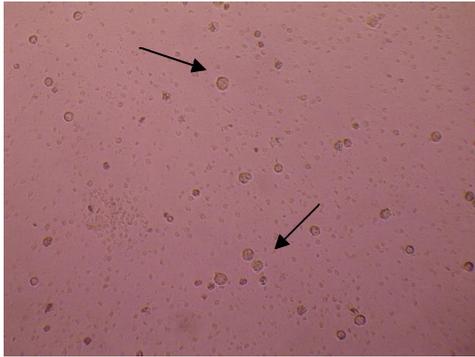


FIG. No 14 células VERO en MEM S/SFB sustituido con Extracto de levadura y NAD a una concentración de 3.25/ 6000 μg . En esta figura se observan las células En apoptosis

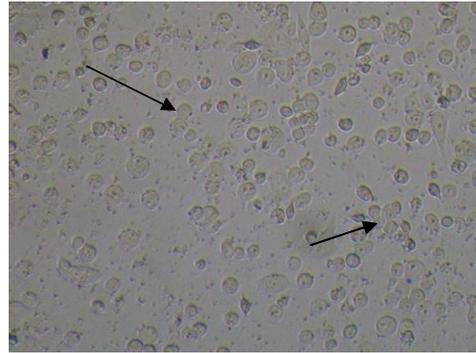


FIG. No 15 células VERO en MEM S/SFB sustituido con extracto de caléndula, levadura y NAD a una concentración de 3.25/1500/6000 μg . hay una buena confluencia pero empiezan las células a perder su Morfología

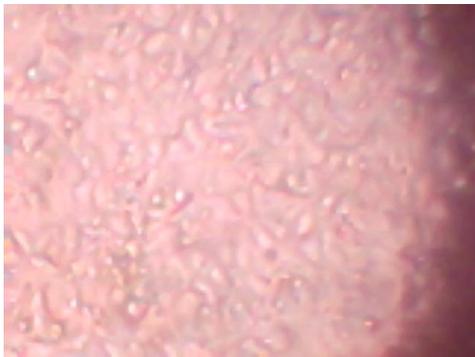


FIG. No 16 células RK-13 en MEM S/SFB sustituido con Extracto de levadura, caléndula y NAD a una concentración De 0.81/375/1500 μg . Nótese una confluencia superior al 100%



FIG. No 17 células RK-13 en MEM S/SFB sustituido con extracto de caléndula, levadura y NAD a una concentración de 6.51/3000/12000 μg .

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

6.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE LA CONCENTRACIÓN EN μg DE NAD CONTRA LAS ABSORBANCIAS DE CÉLULAS VERO Y RK-13 EN MEM S/SFB. (Ver gráfico 16 y tabla 17).

CONCENTRACIÓN de NAD (μg)	CÉLULAS VERO/NAD	CÉLULAS RK-13/NAD
24000	0.076	0.06
12000	0.076	0.06
6000	0.3859	0.477
3000	0.94	0.977
1500	1.122	0.996
750	1.179	0.971
375	1.137	1
187.5	1.084	0.984
93.75	1.07	0.96

En esta tabla (17) se muestran las concentraciones en μg de NAD contra las absorbancias obtenidas en células VERO y RK-13 dando un coeficiente de correlación de -0.88273382 y una R^2 de 0.779219 para las primeras y -0.90332995 y una R^2 de 0.816005 para RK-13.

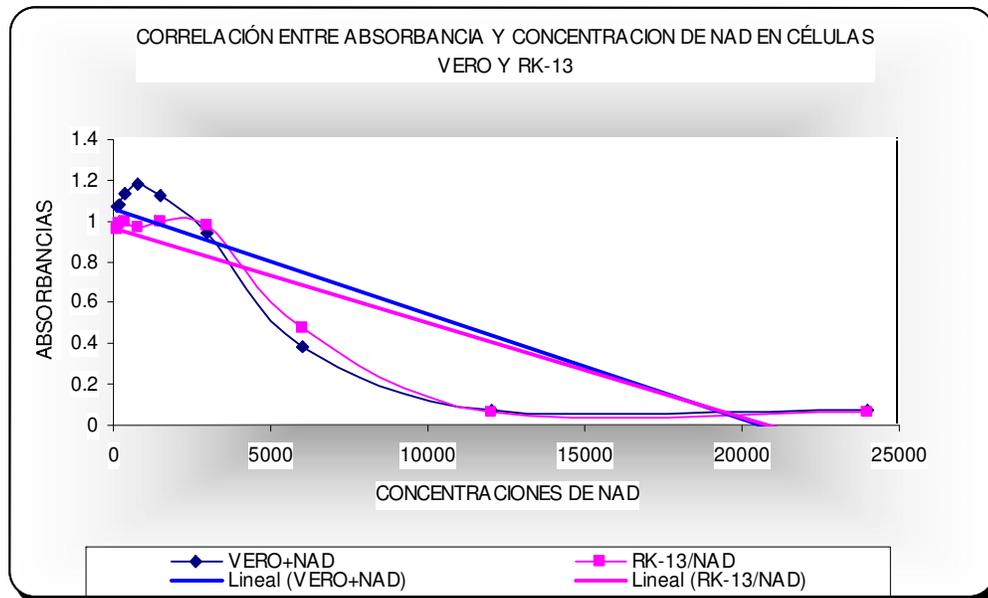


Gráfico No 16 Correlación de concentración de NAD contra absorbancias de células VERO y RK-13

En este gráfico mostramos que no siguen tanto las células VERO como RK-13 una linealidad y que a concentraciones altas de NAD hay citotoxicidad en ambas células pero a concentraciones más bajas en células VERO el NAD contiene mayores absorbancias que en RK-13.

6.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE LA CONCENTRACIÓN EN μg DE EXTRACTO DE LEVADURA CONTRA LAS ABSORBANCIAS DE CÉLULAS VERO Y RK-13 EN MEM S/SFB. (Ver gráfico 17 y tabla 18)

CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA (μg)	CÉLULAS VERO+ EL	CÉLULAS RK-13/EL
6000	0.748	0.64
3000	0.9285	0.863
1500	0.964	0.934
750	0.9775	0.917
375	0.996	1.02
187.5	0.9755	1.024
93.75	1	1.03
46.87	0.984	1.02
23.44	0.967	1.03

En esta tabla (18) se muestra la concentración en μg de extracto de levadura y absorbancias de las células VERO y RK-13, con un coeficiente de correlación de -0.95299682 y una R^2 de 0.90820295 para VERO y para RK-13 de -0.98055501 y una R^2 de 0.96148813.

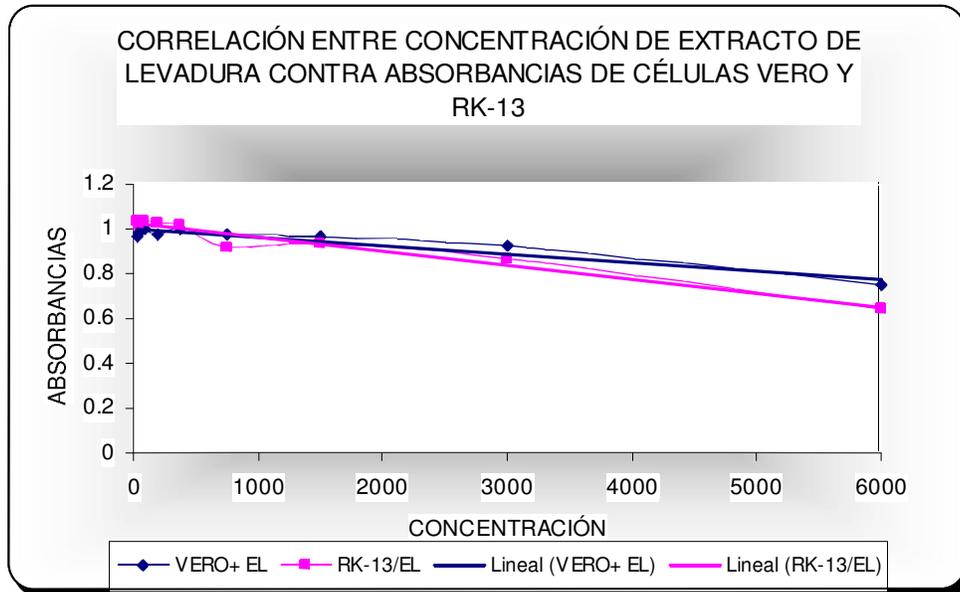


Gráfico No 17 Correlación de concentración de extracto de levadura contra absorbancias de células VERO y RK-13.

En el gráfico No 17 se observa una buena linealidad para células VERO y RK-13 y buena correlación, a una concentración de NAD presenta absorbancias parecidas para ambas células.

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE LA CONCENTRACIÓN EN µg DE EXTRACTO DE LEVADURA, NAD Y EXTRACTO DE CALÉNDULA CONTRA LAS ABSORBANCIAS EN CÉLULAS RK-13 EN MEM S/SFB. (Ver gráfico 18 y tabla 19)

CONCENTRACIÓN DE NAD (µg)	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA (µg)	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE CALÉNDULA (µg)	ABSORBANCIAS DE CÉLULAS RK-13
24000	6000	13.02	0.1011
12000	3000	6.51	1.0493
6000	1500	3.25	1.2809
3000	750	1.62	1.3536
1500	375	0.81	1.3814
750	187.5	0.406	1.3505
375	93.75	0.203	1.3135
187.5	46.87	0.102	1.2235
93.75	23.44	0.051	1.1353

En esta tabla (19) se muestran las concentraciones en µg de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células RK-13, obteniendo un coeficiente de correlación para la concentración de NAD de -0.91501761 y una R^2 de 0.83725722, para extracto de levadura -0.91501759 y una R^2 de 0.83725718 y para extracto de caléndula -0.91516761 y una R^2 de 0.83753176.

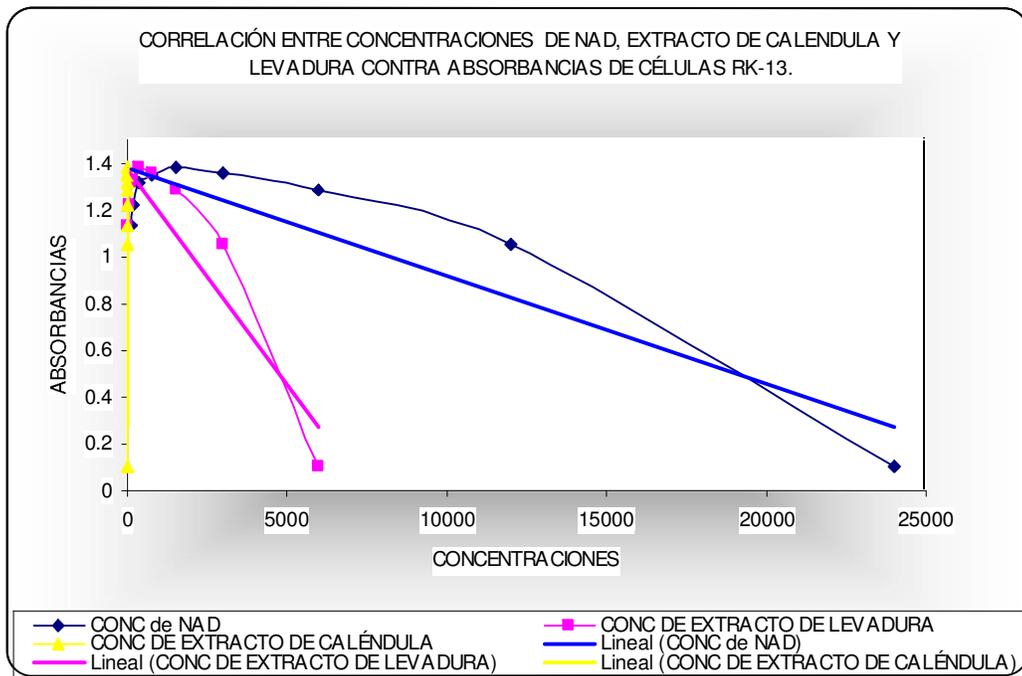


Gráfico No 18 Correlación de concentración de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células RK-13.

En este gráfico solo se observa buena linealidad para extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula pero solo en este último se observa buena correlación. 40

6.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE LA CONCENTRACIÓN EN μg DE EXTRACTO DE LEVADURA, NAD Y EXTRACTO DE CALÉNDULA CONTRA LAS ABSORBANCIAS EN CÉLULAS VERO EN MEM S/SFB. (Ver gráfico 19 y tabla 20)

CONCENTRACIÓN DE NAD (μg)	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE LEVADURA (μg)	CONCENTRACIÓN DE EXTRACTO DE CALÉNDULA (μg)	ABSORBANCIAS DE CÉLULAS RK-13
24000	6000	13.02	0.068125
12000	3000	6.51	0.842625
6000	1500	3.25	1.09525
3000	750	1.62	1.19375
1500	375	0.81	1.239625
750	187.5	0.406	1.265375
375	93.75	0.203	1.261
187.5	46.87	0.102	1.24175
93.75	23.44	0.051	1.2185

En esta tabla (20) se muestran las concentraciones en μg de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células VERO, obteniendo un coeficiente de correlación para la concentración de NAD de -0.98446425 y una R^2 de 0.96916986 , para extracto de levadura -0.98446424 y una R^2 de 0.96916984 y para extracto de caléndula -0.9845163 y una R^2 de 0.96927234 .

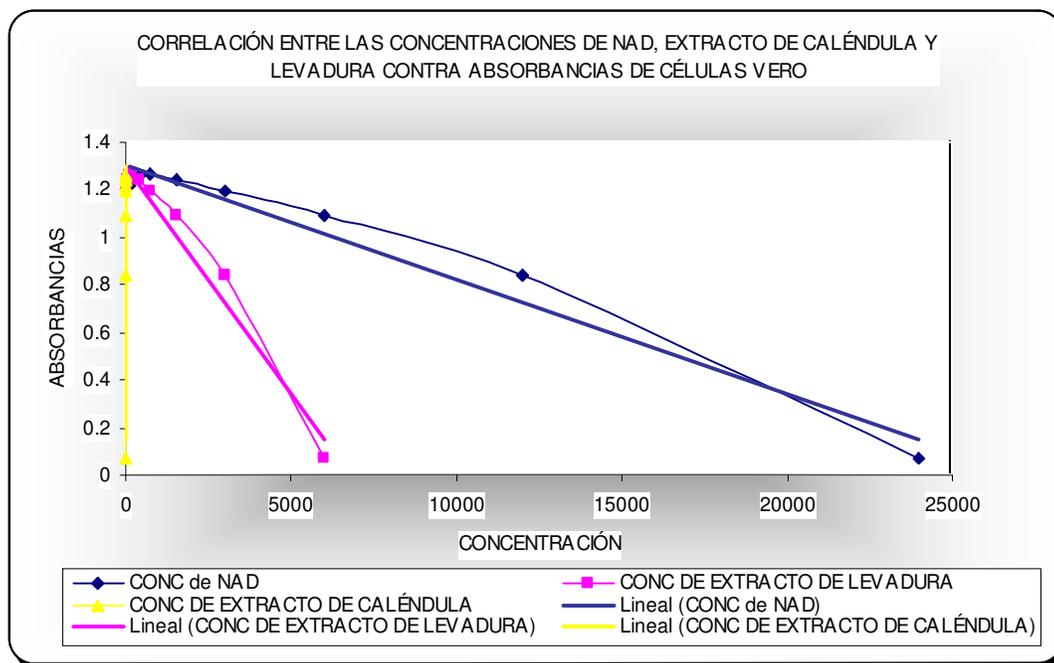


Gráfico No 19 Correlación de concentración de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células VERO.

En este gráfico se observa buena linealidad y correlación para extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula.

7. DISCUSIÓN

En los últimos años se amplió en gran medida la investigación en base a la producción de vacunas, esto es buscando nuevas alternativas de sustitución de componentes que pueden contener altos riesgos de contaminación. Algunos ejemplos de los medicamentos que son usados en la terapéutica son vacunas, y anticuerpos monoclonales, los cuales utilizan técnicas especializadas como las empleadas en los cultivos celulares.

El riesgo que implica el uso de productos biológicos en el tratamiento de humanos y animales, esta en la contaminación por virus, bacterias, hongos y el más peligroso los priones los cuales son capaces de multiplicarse y producir enfermedades infecciosas transmisibles. Si se encuentran las vacunas contaminadas con alguno de estos agentes infecciosos su uso en la terapéutica es inaceptable.

Los cultivos celulares al suplementarse con suero fetal bovino (SFB), representan un alto riesgo de contaminación por proteínas exógenas y enfermedades transmitidas por priones, por lo que la industria farmacéutica a desarrollado medios libres de suero estos buscando una alternativa, ya en Latinoamérica siendo el caso de México están exentos del prion lo que representaría un peligro si este llegara a entrar al nuestro proveniente de países como son: Inglaterra, Bélgica, Francia, Irlanda y Suiza.

Tras la búsqueda de nuevas alternativas para la sustitución del suero fetal bovino en un 100% de los cultivos celulares para la producción de biológicos, y basándonos en trabajos anteriormente realizados, en los cuales se lograba la sustitución hasta un 96%. En este trabajo se realizaron ensayos sustituyendo primero con solo extracto de *Caléndula officinalis*, NAD extracto de levadura o la mezcla ya fuese de dos o tres de los sustitutos, para esto se preparo un extracto etanólico de caléndula, uno acuoso de extracto de levadura y una solución de NAD con una concentración de 120 µg/µl establecida después de varios ensayos.

En el gráfico No 1 se observa que del pozo 5 al 9 el NAD tiene un efecto estimulante de la división celular ya que supera al control positivo que consta de MEM y SFB al 10% y apoyado de la figura No 7 se nota que la confluencia celular es aproximada al 100% en el pozo No 5 teniendo una morfología excelente. En la microplaca al realizar la prueba de MTT en los pozos en los cuales se encontraban las concentraciones más altas de NAD se observa un color amarillo lo cuál nos dice que no hay células vivas en esos

pozos y observando las absorbancias que se muestran en la tabla No 1 se establece un rango de 0.076 a 0.94nm en el cual hay un efecto citotóxico en las células, según Goodman y Gidman^[28] de las bases farmacológicas de la terapéutica el NAD a concentraciones altas tiene efectos tóxicos en el cuerpo humano, esto es enfermedades gastrointestinales y hepatotoxicidad; pero a concentraciones normales es utilizado por tejidos y células como los eritrocitos para la biosíntesis de vitaminas y proteínas.

Cuando el medio es suplementado solo con extracto de levadura el efecto es totalmente diferente al gráfico anterior. En este ensayo se observa que en los tres primeros pozos se encuentran absorbancias por debajo del blanco y el resto de ellos no sobrepasan al control negativo, esto nos indica que no estimula la división celular en las células VERO. Tal y como se muestra en la figura No 8, se observa una confluencia celular baja y una morfología anormal. Con este extracto durante todo el ensayo notamos un comportamiento semejante al de las células RK-13 al suplementarse con extracto de levadura aunque no supera al control positivo.

Al realizar las diferentes mezclas de los extractos y NAD se observa en el gráfico No 3 que al mezclar el NAD/Extracto de levadura y NAD/extracto de caléndula, el comportamiento es semejante durante todo el ensayo pero la mezcla de NAD/extracto de levadura con una absorbancia de 0.5447 nm. Se aproxima más a 0.5504 nm del control positivo. En el caso de la mezcla de los extractos de levadura y caléndula en el pozo No1 con una absorbancia de 0.5631 supera al control positivo pero cae al continuar los pozos; sin llegar a valores de 0.3651nm del control negativo. Al mezclar Extracto de levadura, Caléndula y NAD se observa un efecto de sinergismo entre los tres sustitutos ya que en el pozo 5 con una absorbancia de 0.576 nm supera al control positivo. Este ensayo se leyó a las 72 horas buscando la estabilidad celular y como se muestra de la figura 10 a la 13 hay buenas confluencias pero mala morfología celular lo cual nos indica que los ensayos deben de leerse a las 24 hrs.

En el gráfico No 4 se observa que la mezcla de los tres sustitutos no supera la absorbancia de 1.298 nm del control positivo siendo la del pozo No 6 la que se aproximó mas con 1.265 nm, presentando efectos citotóxicos en los pozos 1 y 2 con 0.068 y 0.842 nm respectivamente. Con ayuda del gráfico No 5 el cual representa el porcentaje de crecimiento celular basándose en un control positivo con SFB al 10% y una confluencia celular del 100% donde la absorbancia de 1.265 nm tiene un 97.5%

En los gráficos 6,7 y 8 establecimos las concentraciones en la que los extractos de caléndula NAD y extracto de levadura tienen un efecto promotor del crecimiento celular en un 97.5 %. Estas son: 0.406 µg de extracto de caléndula, 187.5 µg de extracto de levadura y 750 µg para NAD.

En lo que respecta al gráfico No 9 observamos que las células RK-13 al sustituir el SFB con NAD presenta durante todo el ensayo un efecto citotóxico, que pueden ser vistos con ayuda de la figura No 9 en la que se observan células amorfas con vacuolas esto es debido a que el NAD no le proporciona al medio sustancias que promuevan la división celular. La máxima absorbancia que se observa en la tabla No 9 es de 1.00 nm que corresponde a la fila No 7 de NAD, la cual no supera el 1.089 nm del control positivo con SFB al 10% y 100% de confluencia.

En lo que corresponde a este gráfico el comportamiento de las células al sustituir el SFB con extracto de levadura es mejor pero no lo suficiente para superar la absorbancia de 1.089 nm del control positivo el valor más alto del extracto de levadura es en el pozo No 7 con un valor de 1.03 nm y los valores en el que el sustituto tiene efectos citotóxicos en las células son de los pozos 1 al 4 con 0.64, 0.863, 0.934 y 0.934 nm, esto nos indica que en la dilución del pozo No 7 tiene un efecto promotor de la división celular pero sin superar o igualar al control positivo con SFB.

En el 2006 un estudio realizado por Valdivieso Ugarte ^[39] de la Universidad de Granada con *Saccharomyces cerevisiae* productor de glutatión el cual actúa en la regulación del estrés oxidativo, siendo este el responsable muchas veces del envejecimiento y la muerte celular. Esta levadura responde ante los diferentes agentes como lo son la temperatura, falta de nutrientes, metales pesados, pH, etc, detectando el estrés oxidativo, produciendo una respuesta a nivel molecular induciendo los mecanismos de defensa de antioxidantes primarios y secundarios, originando la activación en la célula de rutas de transmisión y de señales de factores de transcripción que aumentan la expresión de genes que codifican para las proteínas antioxidantes.

Por lo que suponemos que las células RK-13 y VERO presentan una estabilidad durante todo el ensayo, pero se necesitaría un agente promotor de la división celular para que las células presentaran un crecimiento ya sea superior o igual al control positivo con SFB. Recordando que el suero está compuesto por proteínas, hormonas y factores de crecimiento que permiten la proliferación celular y con el que se comparó el comportamiento del extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula.

En el gráfico No 11 observamos que las células RK-13 en el pozo No1 y 2 con las absorbancias de 0.101 y 0.042 nm presentan efectos de toxicidad celular, siendo que del pozo 3 al 8 con un rango de 1.208 a 1.2235 nm superan el 1.1789 nm del control positivo con SFB al 10% y 100% de confluencia.

Lo anterior nos indica que el NAD por si solo no promueve la división celular, la levadura de pan le proporciona estabilidad a las células en el medio y al mezclarlos con *Caléndula officinalis* la cual se a demostrado por Gardea y Viviano en el 2006 ^[35] que promueve la división celular mejora el comportamiento y división de las células RK-13 lo cual nos da una perspectiva para la sustitución total del SFB.

Para conocer el porcentaje de crecimiento de las células RK-13 en base a un control positivo con SFB al 10 % y una confluencia del 100% tenemos al gráfico No 12 en el cual se observa un rango de absorbancias de 1.2809 a 1.235 nm que superan al 1.178 nm del control positivo cabe mencionar que la absorbancia de 1.3814 nm tiene un porcentaje de crecimiento de 117.18% en donde se presenta un efecto promotor de la división celular y comparando con la figura No 14 se observan las células con una morfología buena pero con una sobreproducción celular.

En los gráficos No 13, 14 y 15 se observa las concentraciones de cada uno de los extractos y NAD contra el porcentaje de crecimiento teniendo así la concentración a la cual estos promueven la división celular superando el 100% del control positivo. Estas concentraciones son: 0.81 µg de caléndula, 375 µg de extracto de levadura y 1500 µg de NAD en donde se obtiene un porcentaje de crecimiento celular de 117.18%.

En 2004 ^[37] un estudio que se basa en la concentración de SFB en el tiempo de duplicación menciona que a concentraciones de 5 y 7% del mismo en la ultima concentración tardan más las células RK-13 en su crecimiento esto es que mientras menos suero contengan crecerán más rápido ya que esta línea celular tarda en promedio 48 hrs. en presentar confluencias del 100% con lo que si comparamos la mezcla del extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula estos promueven la división celular en un tiempo menor.

En el caso de las células VERO, la mezcla de los extractos de levadura, caléndula y NAD proporciona un efecto promotor de la división celular pero no suficiente para superar al control positivo, si se sustituye el SFB con extracto de levadura se obtiene confluencia celulares bajas pero una estabilidad celular en todas las concentraciones, excepto en la más concentrada que es en la que se obtiene un efecto citotóxico. En cambio al adicionar solo NAD se obtiene un efecto promotor del crecimiento superior al 100% esto

Nos dice que el mejor sustituto para las células VERO no es la mezcla sino utilizar solo el NAD como suplemento.

Sin embargo, si se compara el comportamiento de la mezcla de los extractos de levadura, caléndula y NAD con su sustitución por separado tenemos resultados totalmente distintos en las células RK-13. Si se sustituye el SFB por NAD tenemos efectos de toxicidad celular a las concentraciones de 24,000 y 12,000 μ g. Con extracto de levadura se tiene un efecto promotor del crecimiento celular pero no es capaz de superar al control positivo.

Si se sustituye por la mezcla de los tres, se obtiene un efecto mitógeno en las células que es superado en crecimiento y confluencia celular. El mejor sustituto para las células RK-13 es la mezcla de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula.

Se realizaron ensayos en los cuales se hicieron lecturas a las 72 hrs. Para conocer la estabilidad de las células al enfrentarse con los extractos ya fuera por si solos o en mezclas dando como resultado, que son estables solo a las 24 hrs. Esto nos hace suponer que en futuros proyectos se buscaría adicionar al medio alguna sustancia ya sea una hormona o alguna proteína que les proporcione la estabilidad necesaria para poder utilizarlas en proyectos que requieren un tiempo mayor de incubación.

A la caléndula se le atribuyen efectos antivirales por una saponina, ^[33] en proyectos futuros se podrían realizar ensayos para las células RK-13 infectándolas con virus y así conocer si la caléndula tiene un efecto antiviral en el cultivo celular.

En lo que respecta al análisis estadístico la correlación nos mostró que tan relacionadas están la concentración en μ g de NAD con las absorbancias en células VERO y RK-13 encontramos que en las primeras tienen un coeficiente de correlación menor que las RK-13 con -0.88273382 y -0.90332995 , encontrando una diferencia aunque no muy grande pero si clave para las células VERO. Para que dos variables tengan buena correlación el coeficiente debe ser aproximadamente 1, en el caso de las correlaciones de nuestros ensayos son negativas porque se esta partiendo de una concentración más alta a una diluida. Para las células VERO el coeficiente es bajo debido que a concentraciones más bajas de NAD las absorbancias son mayores que en RK-13 y estas se observan con ayuda del gráfico No 16. Para considerar que presentan buena linealidad se deben tener valores de R^2 cercanos o iguales a 1 en el caso de las células VERO es de 0.779219 y para RK-13 de 0.816005 considerándose estos dos valores como valores de R^2 malos ya que si lo observamos en el gráfico antes mencionado se ve que las dos líneas celulares no presentan una buena linealidad.

En el caso de las concentraciones en μg de extracto de levadura contra las absorbancias de células VERO y RK-13 encontramos valores de coeficiente de correlación para las primeras de -0.95299682 y -0.98055501 para RK-13 considerándose estos buenos ya que se acercan a 1, sin una diferencia significativa entre ellos y con valores de R^2 de 0.90820295 y 0.96148813 respectivamente, considerando estos valores como aceptables y con ayuda del gráfico No 17 se observa que siguen una buena linealidad y correlación entre sus valores.

Para las concentraciones en μg de extracto de levadura, NAD y extracto de caléndula contra absorbancias de células RK-13, tenemos valores de correlación para la concentración de NAD de -0.91501761, para extracto de levadura -0.91501759 y para extracto de caléndula -0.91516761 considerados como buenos pero si se comparan con los valores de correlación en células VERO para la concentración de NAD con -0.98446425, extracto de levadura -0.98446424 y extracto de caléndula -0.9845163 encontramos que en células RK-13 son menores debido que a la mitad de las concentraciones hay un incremento en las absorbancias en esta línea celular siendo esta una diferencia que al compararse con el crecimiento de las células VERO resulta significativa.

El único sustituto que no presenta una diferencia significativa en ambas líneas celulares es el extracto de levadura por lo que es recomendable solo usar NAD para células VERO y la mezcla de NAD y extracto de caléndula para RK-13.

Analizando el costo que implicaría sustituir el suero fetal bovino de los cultivos celulares encontramos que si la preparación de NAD, extracto de caléndula y extracto de levadura podría resultar en equipo, costos y pruebas con valores menores a los del suero debido a que este contiene gastos de exportación y en pruebas que se le realizan para su venta como lo mostramos en la tabla No1; sin embargo si lo más importante es evitar la entrada del prión a México tenemos una buena opción en nuestros extractos como sustitutos de SFB.

En el caso de el extracto de caléndula no se probó por si solo en las líneas celulares ya que en el 2006 Gardea y Viviano ^[35] comprueban que solo se puede sustituir hasta un 98% del SFB con este extracto por lo que en sus sugerencias presentan la posibilidad de poder buscar algún otro sustituto o sustancia que pudiera combinarse, con la cual lograr la total sustitución.

8. CONCLUSIONES.

- Logramos sustituir el suero fetal bovino en su totalidad en células VERO y RK13 por extracto de levadura, NAD y extracto de Caléndula y/o sus posibles combinaciones.
- NAD tiene un mejor efecto promotor de la división celular en células VERO que con la mezcla de los sustitutos.
- Si se sustituye solo con NAD o extracto de levadura no se tiene un efecto mitógeno en células RK-13
- Existe un sinergismo en la mezcla de los sustitutos sobre las células RK-13 promoviendo el crecimiento de las mismas.
- Los sustitutos no proporcionan estabilidad a las células por más de 48 hrs.
- Determinamos las concentraciones óptimas a las que hay un efecto inductor de la mitosis gracias al método colorimétrico de Mosmman.
- Con la sustitución del SFB de los cultivos celulares se reducen costos y la posibilidad de la contaminación por bacterias virus y especialmente por priones.
- El extracto de levadura por si solo no es un buen promotor de la división celular para células VERO y RK-13.

9. SUGERENCIAS.

- Probar los extractos en otras líneas celulares,
- Buscar una sustancia con la cual las células tengan una estabilidad por un tiempo mayor
- Investigar si existe replica viral en los cultivos celulares sin suero fetal bovino, sustituidos por NAD y extracto de Caléndula

10. APENDICE

10.1. MATERIAL

- Mechero bunsen y mangueras de látex
- Botellas Falcon de 25 cm²
- Micropipeta de 40 a 200 µl (Oxford)
- Micropipeta de 200 a 1000 µl (Oxford)
- Micropipeta fija de 200 µl (Clinipette)
- Micropipeta fija de 20 µl (Wilson)
- Botellas de vidrio de 1000ml (PIREX)
- Microplacas de fondo plano estériles de 96 pozos (EVERGREEN)
- Puntas desechables para micropipetas
- Membranas nylon Blanco (0.45 y 0.22 µm) (MILLIPORE).
- Cámara de Neubauer (MARIENFIELD)
- Frascos de vidrio estériles
- Viales ámbar de 20ml
- Viales Eppendorf
- Matraz aforado de 20ml (KIMAX)
- Matraces Erlenmeyer de 100, 250, 500, 1000 y 5000ml (KIMAX)
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 1000 (PIREX)
- Cajas Petri (KIMAX)
- Embudo de vidrio (PIREX)
- Papel filtro de acetato de celulosa No 3 (WHATMAN)
- Soporte universal, pinzas con nuez
- Papel aluminio (WEZER)

10.2. MATERIAL BIOLÓGICO.

- Línea celular VERO
- Línea celular RK-13
- *Calendula officinalis*
- Levadura de panadería (La florida)
- NAD (Research Organics Inc).

10.3. EQUIPO

- Autoclave (ALL American Modelo 1925X)
- Parrilla con agitador (Nuova II Stir Plate)
- Microscopio de luz Invertido (AMERICAN OPTICAL CORPORATION)
- Microscopio Óptico (OLYMPUS)
- Lector de ELISA (BIORAD)
- Estufa con CO₂ (LAB-LINE)
- Bomba de vacío (G.E-Hoffman-Pinthe, modelo 0210)
- Balanza analítica (ADVENTURE PRO)
- Cabina de flujo laminar (LABCOMCO)
- Centrifuga (DAMON/ EC DIVISIÓN)
- Destilador de Agua (Milli-Q Plus)
- pHmetro (HANNA)

10.4. REACTIVOS

- Agua desionizada
- Agua destilada
- MTT (MP Biomédicals, MPI)
- Extracto etanólico de Caléndula officinalis
- SFB (THE CELL CULTURE COMPANY)
- Fungi-bact solution (IRVINE SCIENTIFIC)
- Tripsina-verseno 0.25:0.25%
- Bicarbonato de sodio (MONTERREY)
- PBS 1X
- D-MEM (GIBCO)
- Colorante Azul de tripan (SIGMA)
- Buffer HEPES (IRVINE SCIENTIFIC)
- Alcohol Isopropilico (Baker analized)

10.5. PREPARACIÓN DE REACTIVOS

PBS 1X	
Na Cl (REPROQUIFIN)	8.0 g
KCl (J.T. BAKER)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ (MONTERREY)	1.15 g
KH ₂ PO ₄ (MALLINCKRODT)	0.2 g
Agua desionizada	c.b.p.1000 ml.

Ajustar pH a 7.0 y esterilizar en autoclave (ALL AMERICAN Modelo No 1925X) a 15 lb. De presión por 15 minutos. Conservar a 4 °C.

D-MEM	
D-MEM (GIBCO)	13.38 g
NaHCO ₃	3.7 g
Solución fungi-Bact (Irving Scientific)	10 ml
Agua desionizada	c.b.p. 1000 ml.

Se ajusta pH a 7.0 con HEPES y se esteriliza con membrana de 0.22 µm (millipore). Conservar a 4 °C.

AZUL DE TRIPÁN

Azul de tripán (SIGMA)	0.4 g
Agua desionizada	c.b.p. 100 ml.

TRIPSINA-VERSENO 0.25%:0.25%

Solución 1	
Tripsina	0.25 g
PBS	c.b.p. 100 ml.

Solución 2

EDTA (Verseno) (J.T. BAKER)	0.05 g
PBS	c.b.p. 100 ml.

Se toman 50 ml de la solución 1 y 50 ml de la solución 2 y se homogenizan. La solución restante se esteriliza con membrana de 0.22 µm (millipore). Conservar en congelación

MTT (5mg/ml)
MTT (MP biommedicals, INC) 250 mg
RPMI-1640 sin rojo de fenol (SIGMA) c.p.b. 100 ml.

Se esteriliza con membrana de 0.22 µm (millipore). Conservar a 4°C

10.6. TECNICAS UTILIZADAS.

10.6.1. Pase celular Tripsinización.

- Retirar el medio de cultivo de la botella confluyente.
- Se lavan las células con PBS.
- Adicionar 3 ml de PBS y dejar reposar 3 minutos.
- Retirar el PBS y adicionar 2 ml de Tripsina-Verseno y 1 ml de PBS y dejar reposar por 2 minutos.
- Tomar los 3 ml y adicionarlos a otra botella falcón o en tubos para centrifuga estéril en el caso de realizar una suspensión celular.

10.6.2. Conteo celular.

- Desechar el medio de cultivo y lavar con PBS.
- Tripsinizar para tener células despegadas de la botella.
- Colocar las células desprendidas en tubo para centrifuga estéril y aforar a 20 ml con D-MEM y homogenizar.
- Tomar 200 µl de la suspensión y colocarlos en un tubo eppendorf y a esta solución adicionar 200 µl del colorante azul de tripán.
- Llenar una cámara de Neubauer y realizar el conteo celular.
- Se enfoca la cuadrícula de la cámara empleando el objetivo de 10X y se localizan los cuadrantes a contar (los mismos que se utilizan en el conteo de leucocitos).
- Se pueden contar dos cuadrantes pero de preferencia se den contar los 4 para disminuir el rango de error:

$$\text{Cel/ml} = \frac{(\# \text{ de células contadas})}{(\# \text{ de cuadrantes contados})} \times \text{Factor de dilución} \times 10^4$$

Para esta técnica el factor de dilución es 1.

11. GLOSARIO:

Apoptosis: Serie de procesos en el que las células mueren. “muerte celular programada”

Absorbancia: Propiedad física que tiene una sustancia dentro de ciertos límites puede ser directamente proporcional a su concentración. En una medida de la cantidad de la radiación electromagnética, habitualmente que la luz absorbe. Esta propiedad se utiliza en la espectrofotometría.

Antitumoral: Sustancia capaz de disminuir la división celular no controlada causante de tumores ya sea benignos o malignos.

Antiviral: Agente el cual es capaz de eliminar los virus.

Asepsia: Eliminación o destrucción de los productores de enfermedades de un material infectante. Ausencia de gérmenes.

Bactericida: Agente que es capaz de destruir por completo a las bacterias.

Coenzima: sustancia orgánica no proteica capaz de llevar a cabo reacciones de oxidación-reducción o descarboxilación de proteína (NAD y NADP).

Célula: Elemento fundamental de los tejidos organizados.

Célula somática: Cualquiera de las células del tejido corporal que tienen un número diploide de cromosomas, para distinguirlas de las células germinales, que contienen un número haploide.

Ciclo celular: Proceso en el que las células se dividen para producir dos células hijas idénticas, el ADN se duplica, se segrega y finalmente la célula original se divide para dar lugar a dos células nuevas independientes, cada una con una dotación genética idéntica a la de su hermana.

Citotóxico: Agente capaz de causar daño a las células.

Confluencia celular: Cantidad de células presentes en un cultivo de celular.

Extracto natural: Producto que se obtiene de un fármaco de origen vegetal sometiéndolo a la acción de un disolvente y evaporando el líquido resultante.

Deshidrogenasa: Enzima que cataliza una reacción de oxidación-reducción en la cual se extraen los hidrógenos.

Diurético: Agente o medicamento que aumenta la secreción de orina.

Flavoproteínas: Proteínas conjugadas que tienen como grupo prostético derivados de la isoaloxacina que les da color amarillo.

Globulina: Miembro de una familia de proteínas que se caracterizan por ser insolubles en agua pura pero no son solubles en soluciones diluidas de cloruro de sodio, se distingue de la albúmina por su menor solubilidad, mayor peso molecular, sedimentación más rápida y movilidad electroforética más lenta.

Meiosis: División de una célula sexual cuando es madura, en dos y después de 4 gametos, recibiendo el núcleo de cada uno la mitad del número de cromosomas que poseen las células somáticas de la especie.

Mitógeno: Agente que desencadena la mitosis.

Prion: Partícula proteica la cual carece de genoma responsable de enfermedades neurodegenerativas transmisibles.

Quimioprotector: Agente que le proporciona por medio de su composición ya sea a las células u otros organismos protección contra posibles daños que se le puedan causar.

Saponina: Sustancia glucosídica de muchos vegetales soluble en agua, en muchas ocasiones con actividad química.

Tripsina: Enzima proteolítica derivada del jugo pancreático, la cual cataliza la hidrólisis de las uniones peptídicas de las proteínas.

Vacuna: Suspensión de microorganismos muertos o atenuados administrados por vía intramuscular, intradérmica, oral o sublingual, para inducir inmunidad a enfermedades infecciosas.

Virus: Microorganismo de tamaño inferior al de las bacteria, no tiene actividad metabólica independiente y solo se puede replicar en el interior de una célula de una planta viva o un huésped animal.

12. REFERENCIAS

- (1) <http://servet.uab.es/histologia/docencia/HMA2005/Temasteoria/Tema8/complem/cultivo.doc>
- (2) <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy52/cultivos.htm>
- (3) <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/cap1.htm#4.1%20Evoluci3n%20de%20las%20lneas%20celulares>.
- (4) http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n9/arti/plaza_n2/arti/plaza_n2.htm
- (5) Paymed P. Trudel. Methods and Techinques in Virology. Marcel Dekker inc.1993. USA
- (6) Morgan, Sara J., Darling David C. Cultivo de C3lulas Animales. Editorial ACRIBA S.A. Zaragoza, Espa1a. 1995.
- (7) <http://www.medicos.sa.cr/inter3s/encefal//htm>.
- (8) Las Encefalopat3as Espongiformes Transmisibles. El "mal de las vacas locas". Bolet3n epidemiol3gico. OPS. Vol. 22. No. 1, Marzo del 2001. Disponible en: URL: http://www.paho.org/Spanish/Sabe_v22nlvacaloca.htm.
- (9) The American Veterinary Medical Association. Bovine Spongiform Encephalopathy. Informational Update. February 2001. Disponible en: URL: <http://www.avma.org/press/bse/default.asp>.
- (10) <http://www.scn.es/cursos/elementos/demencias/priones/PRIONES.htm>
- (11) <http://pmplab2.ugr.es/inge/prioncron.html>
- (12) <http://www.sciam.com/0896isuee/prion.html>
- (13) K.JW. "The environmental dependence of protein folding best explains prion and amyloid disease. Proc. Nalt. Acad Sci USA. 1998, 95:930-032.
- (14) Boneta LB. More sensitive tests for BSE needed. Natural med, 2001; 7(3):261.
- (15) Robert M, Legal Background presented by the European Commission. Proceeding of the Certification for TSE risk Products International workshop. 2001. January 11. Strasbourg. Sweden. Council of Europe; 2001. 33. Calam DH. Measures
- (16) Gaceta M3dica. M3xico DF. 2001; Vol. 137(6):589-594
- (17) <http://www.conacyt.mx/comunicacion/Agencia/his-globo/31oct-4-nov.html>

-
-
- (18) http://www.universia.es/portada/actualidad/noticia_actualidad.jsp?noticia=90728
- (19) C. Loureco, Schmerr, MacGregor." Application of a immunocapillary electrophoresis assay to the detection of abnormal prion protein in brain, spleen and blood specimens From patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease." Journal of General of Virology (2006), 87, 3119-3124.
- (20) Paspaltsis, Kotta, Lagoudaki, "Titanium dioxide photocatalytic inactivation of prions", Journal of General Virology (2006), 87, 3125-3130
- (21) http://encolombia.com/acovez24_desarrollos16.htm
- (22) <http://www.cultilab.com.br/espanhol/cultilab/paginas/meiotransf1.15.html>
- (23) Frazatti, Paoli. " VERO-cell rabies vaccine produced using serum -free medium" ELSEVIER (2004) 511-517
- (24) <http://www.perbio.com/site/ProductLine/Products.asp?show=e&var=hyclone&poll=hyclone&stats=Serum-free%20media&cat=3&table=New Product>
- (25) Stryer Lubert. Bioquímica. Editorial Reventé S.A. España 1985
- (26) Harper A. Harold. Manual de Química Fisiológica.7ª Edición, Editorial El manual Moderno S.A. México 1980
- (27) http://www.biopsicologia.net/fichas/page_1041.html
- (28) Goodman and Gildman. "las Bases de la Farmacología y la Terapéutica." Editorial Mc Graw Hill, 10ª edición Vol. II, México 2001, Págs. 1778-1780.
- (29) Saccharomyces cerevisiae. The Journal of Biological Chemistry 274: 9092-9097
- (30) Juscafresca, Baudllo. Guía de la flora medicinal, Editorial AEDOS, Barcelona, España. 1995.
- (31) Instituto Nacional Indigenista. Atlas de la medicina tradicional mexicana I. México 1994.
- (32) Plantas que curan. Enciclopedia de las plantas medicinales. Editorial D angostini, Vol. 11 Barcelona España. 1999.
- (33) N De Tommasi; C Conti; M L Stein; C Pizza. Structure and in vitro antiviral activity of triterpenoid saponins from Calendula arvensis. Planta medica (0032-0943). 1991.

(34) L M Barajas-Farias; J I Pérez-Carreón, F G Cruz-Jiménez, A dual and opposite effect of Calendula officinalis flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. Planta medica (0032-0943). 2006

(35) Gardea García, Vera Viviano. Tesis de licenciatura: “Determinación del efecto citotóxico y/o inductor de proliferación celular de *Caléndula officinalis* y *Amphipterygium Adstringes* en dos líneas celulares evidenciado por el método colorimétrico de Mosmam” FESC UNAM 2006.

(36) American Type Culture Collection. Catalogue of Cell lines and Hybridomes. Maryland, 1992:4,17, 21, 48, 98, 175.

(37) Molina, Minvielle, Basualdo. Células RK13: Influencia de la concentración de suero fetal bovino en el tiempo de duplicación. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2004; 38 (4): 477-80

(38) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 1983

(39) tesis doctoral de Magdalena Valdivieso Ugarte, “Obtención y caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* superproductoras de glutatión”. Editorial de la Universidad de Granada, D.L: Gr 843- 2006.