



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**CREACIÓN DE UN BANCO CELULAR DE TRABAJO DE LA LÍNEA
MRC-5 PARA LA DETERMINACIÓN DE LA POTENCIA DE
VACUNAS CONTRA VARICELA-ZÓSTER.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A :

NARCIA SÁNCHEZ FERNANDO ENRIQUE

JURADO DE EXÁMEN

DIRECTORA: DRA. GABRIELA FIGUEROA GONZÁLEZ

ASESOR: DR. OCTAVIO DANIEL REYES HERNÁNDEZ

ASESORA: M. EN C. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

SINODAL: DRA. ROSA LINARES CULEBRO

SINODAL: MTRO. EDGAR IVAN CORIORILES TORRES



CIUDAD DE MÉXICO, ABRIL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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

De pequeño mi familia me enseñó a dar las gracias por todas las cosas que me llegaron a pasar en mi vida, sean buenas o malas. Por eso, en esta tesis quiero darles un agradecimiento.

🏛️ Quiero agradecer profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por dejarme ser parte de esta gran comunidad como estudiante ya que fue una etapa de mi vida muy bonita y decir orgullosamente que salí de la máxima casa de estudios que es la UNAM.

🏛️ Agradezco a la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura de la COFEPRIS, en especial a la ingeniera Alicia De la Rosa y al químico Edson Torres por dejarme llevar a cabo parte de este proyecto. También quiero darle las gracias al químico Fernando Cruz y al químico Luis Castillo por compartir sus conocimientos en el laboratorio, esas grandes charlas que teníamos día a día y por dejarme ser parte de su equipo de trabajo el cual me siento orgulloso de haberlos apoyado en todo momento.

🏛️ Quiero darle las gracias a toda mi familia por haberme apoyado en el transcurso de la carrera. A mi madre Irma por apoyarme y demostrarle que se pudo salir adelante en los momentos más difíciles de mi vida, a mi abuelita Tita que estuvo conmigo en todo momento. A todos mis tíos; Nicolás, Elizabeth, Yolanda, Melchor y Lorena que me dieron ese aliento de apoyo que necesite en su momento y ayudarme a ser el licenciado que soy ahora.

🏛️ A mi pareja Azucena Morales por ser mi equipo desde hace dos años, no hubiera logrado muchas cosas importantes sin su apoyo, por formar parte de esta etapa de mi vida y por no dejar de creer en mí.

🏛️ Muchas gracias a la familia Barrera Rodríguez, Sra. Guadalupe, Sr. Braulio, Monserrat y a Karina por ser parte fundamental en mis inicios como estudiante. En verdad valoro mucho el tiempo y esfuerzo que me dedicaron para salir adelante.

🏛️ Agradecimiento al proyecto PAPIIT-IA208422 por el apoyo académico y financiero durante la elaboración del presente proyecto.

🏛️ Gracias a mis sinodales: a la Dra. Rosa Linares, al M. en C. Edgar Torres, a la profesora Cristina Alvarado y en especial a la Dra. Gabriela Figueroa y al Dr. Octavio Reyes por nunca dejar de creer en mí y apoyarme en todo momento tanto académicamente como personalmente.

Índice general

Índice general	i
Índice de figuras, cuadros y tablas	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	1
Introducción	2
Marco Teórico	3
Virus de la varicela	3
Vacunas.....	4
Nuevas tecnologías en el desarrollo de vacunas.....	5
Cultivos celulares y su aportación en el desarrollo de vacunas	6
Líneas celulares para el desarrollo y producción de vacunas: banco de la línea celular MRC-5	6
Criopreservación	8
Planteamiento del problema	9
Pregunta de investigación	10
Hipótesis	10
Objetivos Específicos	11
Material y Métodos	11
Descongelación de las células.....	11
Sub-cultivo inicial.....	13
Conteo celular	14
Sub-cultivo final	17

Criopreservación	19
Resultados.....	21
Confluencia celular.....	21
Conteo celular	21
Discusión y análisis de resultados	26
Conclusiones	32
Referencias	33

Índice de figuras, cuadros y tablas

Figuras

Figura 1. Generación de un Banco Celular Maestro (BCM) y un Banco Celular de Trabajo (BCT) a partir de un cultivo inicial.	7
Figura 2. Diagrama del proceso para la descongelación de un criotubo de la línea celular MRC-5.	13
Figura 3. Representación de la colocación del cubreobjetos en la cámara de Neubauer.	15
Figura 4. Representación de la colocación del azul de tripano por capilaridad en la cámara de Neubauer.	15
Figura 5. Representación del área de cuantificación en la cámara de Neubauer.	16
Figura 6. Diagrama del proceso para la creación del banco de la línea celular MRC-5.	20
Figura 7. Confluencia de los cultivos celulares de la línea MRC-5	21

Cuadros

Cuadro 1: Sub-cultivo de una caja de cultivo de 75 cm ² a dos cajas de cultivo (75 cm ² y 150 cm ²).	18
Cuadro 2: Sub-cultivo para cultivar dos cajas de 75 cm ² y 150 cm ² a 4 cajas de cultivo de 150 cm ²	18
Cuadro 3: Sub-cultivo para cultivar las 4 cajas de 150 cm ² a 12 cajas de 150 cm ²	18

Tablas

Tabla 1. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y el pase del criotubo con 1 mL de células MRC-5 a una caja de cultivo de 25 cm ²	22
Tabla 2. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de una caja de 25 cm ² a una de 75 cm ²	23
Tabla 3. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de una caja de cultivo de 75 cm ² a dos cajas de cultivo (75 cm ² y 150 cm ²).	23
Tabla 4. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de dos cajas de 150 cm ² y 75 cm ² a 4 cajas de cultivo de 150 cm ²	24
Tabla 5. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de 4 cajas de 150 cm ² a 12 cajas de 150 cm ²	25
Tabla 6. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de 12 cajas de cultivo de 150 cm ² a 37 criotubos de 1 mL.	26

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ATCC: American Type Culture Collection.

BCT: Banco Celular de Trabajo.

BCM: Banco Celular Maestro.

CO₂: Dióxido de Carbono.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EE. UU: Estados Unidos.

HHV-3: Human herpesvirus 3.

MEM: Minimum Essential Medium.

rpm: Revoluciones Por Minuto.

SUIVE: Sistema Único de Información de Vigilancia Epidemiológica.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SI: Suspensión Intermedia.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

VVZ: Virus de la Varicela Zóster.

Resumen

El virus de la Varicela Zóster (VVZ) ha representado una problemática de salud pública a nivel global, esto se ve reflejado en que 4.2 millones de personas requieren hospitalización y 4,200 personas mueren por esta enfermedad. El síntoma principal en manifestarse es la erupción en la piel, además de estar acompañado de fiebre y malestar general.

Para tratar de solucionar este problema se ha optado por crear y desarrollar vacunas. Parte del proceso que tiene que pasar es por una prueba de calidad y eficacia. Ciertamente, una de las pruebas para evaluar la potencia de la vacuna es mediante el uso de las líneas celulares. Con la finalidad de conservar y mantener las propiedades de estas líneas, se ha optado por crear bancos de líneas celulares para asegurar la pureza, calidad y estabilidad de las mismas, que podrán ser utilizadas para futuras investigaciones.

Una de las líneas celulares para poder evaluar la eficacia de las vacunas contra la varicela zóster es la línea celular MRC-5, las cuales son células humanas diploides derivadas de tejido pulmonar con morfología fibroblástica. Cabe mencionar que varios autores han reportado que son ideales para pruebas virológicas.

Es por ello que el presente proyecto tuvo como objetivo crear un banco celular de la línea MRC-5 con el propósito de poder utilizar las células para la determinación de la potencia de las vacunas contra la varicela zóster. Para cumplir dicho objetivo se aplicaron las condiciones establecidas en el laboratorio de cultivo celular. Como resultado de este trabajo se obtuvieron confluencias entre el 93% y 99%, generando un número final de 37 criotubos de 1 mL con una cantidad de 5×10^6 cel/mL en cada criovial.

Con estos resultados se concluye que siguiendo y manteniendo las condiciones se puede crear un banco celular en un estado óptimo y por tanto viable para su uso en la determinación de la potencia de las vacunas contra la varicela zóster.

Palabras clave: Cultivo celular, banco celular, MRC-5, vacuna y varicela zóster.

Introducción

Las técnicas de cultivo celular han evolucionado a lo largo de la historia de manera exponencial, con la finalidad de mejorar las condiciones para que las células puedan crecer de forma favorable controlando ciertos factores críticos; lo que lo convierte en uno de los descubrimientos más importantes para la investigación en todo el mundo (Orta, 2013).

Para llevar a cabo estas investigaciones, se han desarrollado diferentes herramientas, una de ellas son los bancos celulares, los cuales garantizan que exista una fuente apropiada de células equivalentes para emplear a través del tiempo conservando la calidad de las células y sus propiedades fisiológicas (Farmacopea Argentina, 2003).

Estos bancos celulares pueden conformarse por diversas colecciones de células tanto procariontes como eucariontes, un ejemplo son las líneas celulares. Se entiende como línea celular a las células que se pueden dividir de manera infinita de forma *in vitro*, siempre y cuando se conserven las condiciones adecuadas para preservar el cultivo (Orta, 2013).

En cuanto a sus aplicaciones, en el sector salud, las líneas celulares han sido empleadas con fines experimentales. Tal es el caso de la línea celular MRC-5, la cual ha sido utilizada en el desarrollo de vacunas (Yang, 2021).

Particularmente, la enfermedad hacia la cual van dirigidas estas vacunas es para el VVZ, sin embargo, no se ha logrado erradicar esta enfermedad, por lo que sigue el proceso para la generación de una vacuna óptima. En algunos experimentos se ha optado por utilizar la línea MRC-5 con resultados positivos, lo que se traduce en la necesidad de propagar constantemente grandes cantidades de células de dicha línea para continuar con estos experimentos.

El presente trabajo está orientado hacia la exploración y la aplicación de los conocimientos para la propagación y conservación de la línea celular MRC-5, con la potencial generación de un banco de células que, de ser necesario, será utilizado con fines de diseño y producción de una vacuna eficaz contra el VVZ.

Marco Teórico

Virus de la varicela

El virus de la varicela zóster (VVZ) pertenece al género de los *Varicellovirus*, familia de los *herpesvirus*, siendo *Human herpesvirus 3* (HHV-3) la especie. Al ser un virus ubicuo, puede encontrarse en cualquier lugar además de que posee la capacidad de causar dos enfermedades diferentes. La primera es una infección por varicela y la segunda el herpes zóster. El síntoma principal que se manifiesta de la varicela es la erupción en la piel, y puede estar acompañado de fiebre y malestar general, resultado de una reactivación del virus latente. Este virus tiene un patrón de expresión al ser más frecuente entre las estaciones de invierno y primavera. La enfermedad por varicela es altamente infecciosa con una tasa de infección aproximadamente del 90% y se considera un virus neurotrópico que afecta exclusivamente a los seres humanos al transmitirse especialmente por contacto directo con vesículas (Galenus Med, s.f.; Warren-Gash, 2017).

El mecanismo de infección empieza con la transmisión de una persona infectada a un huésped susceptible, el VVZ prolifera en la orofaringe ubicada en la parte media de la garganta, situado atrás de la boca. Durante la fase virémica inicial; las células T que se encuentran infectadas transportan el virus a la piel, en donde da inicio la fase de replicación epidérmica del virus para que pueda producir VVZ libre de células. Una vez superadas las respuestas antivirales, aparecen las lesiones representativas de la varicela (Warren-Gash, 2017).

Es clasificada como una enfermedad de la infancia que afecta principalmente a niños entre 1 y 9 años donde el cuadro clínico está conformado por fiebre y lesiones cutáneas caracterizadas por máculas, pápulas y vesículas. Cuando se presentan complicaciones, las más frecuentes son la infección de piel y tejidos blandos, resultado del rascado constante de las lesiones; otras complicaciones son neumonía, encefalitis y cuagulopatías, que requieren hospitalización; sin embargo, existen medidas preventivas para disminuir el riesgo de contagio y complicaciones, por ejemplo, las vacunas (Porras & Bejarano, 2017; Vázquez, 2017).

Vacunas

Se define como vacuna a la sustancia o conjunto de sustancias que estimulan al sistema inmune para mandar una respuesta ante un microorganismo patógeno, como un virus o una bacteria, esto le sirve para reconocer y destruir a los sistemas biológicos que dañan al cuerpo humano (Instituto Nacional del Cáncer, s.f.).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la composición de una vacuna para asegurar la eficacia e inocuidad debe incluir:

Antígeno: Se define como la sustancia que se adquiere a partir de un fragmento de un virus o una bacteria y prepara a nuestro organismo para generar anticuerpos que sean capaces de protegernos contra cierta enfermedad en específico en el futuro (Observatorio de vacunas, s.f.).

Adyuvantes: Apoya con el incremento de respuesta al sistema inmune para facilitar la acción de la vacuna (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2021).

Conservantes: Ayuda a mantener la eficacia de la vacuna (OMS, 2021).

Estabilizantes: Sirve para proteger en el transporte y almacenamiento a la vacuna (OMS, 2021).

La creación de la primera vacuna viva atenuada contra la varicela se realizó en Japón en el año 1974 con el nombre de vOka, teniendo como objetivo disminuir las complicaciones graves o mortales que provocaba la varicela en niños inmunocomprometidos. En el transcurso del tiempo se han desarrollado varias vacunas contra la varicela, entre las más comunes están Varilix, Varivax y Zostavax (Warren-Gash, 2017).

Las vacunas han podido neutralizar varias enfermedades que provocan el deceso de millones de personas a nivel global, considerado un importante descubrimiento tanto en la medicina como en los sistemas de salud (Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores [INAPAM], 2021).

Nuevas tecnologías en el desarrollo de vacunas

El desarrollo tecnológico en vacunas creció rápidamente a partir de 1960, principalmente en cultivos celulares, gracias a sus grandes ventajas como su rápido proceso de producción (bajo costo, rápido desarrollo, un alto rendimiento y protección efectiva), se ha convertido en la principal forma de combatir una gran variedad de virus. De acuerdo con Yang y cols. (2021), en la actualidad, la línea celular MRC-5 se ha convertido en la principal fuente de varias vacunas, entre ellas, las vacunas inactivadas contra la varicela-zóster, donde su principal ventaja es la eliminación de impurezas en el ADN de las células huésped en las vacunas (Yang, 2021).

Actualmente, se ha tenido la necesidad de reintroducir una nueva generación de vacunas contra la varicela debido a que puede ser utilizada como un arma biológica potencial, amenazando a la humanidad. Desde su erradicación, gran parte de la población es vulnerable a infectarse por varicela, y, por ende, se teme que se propague rápidamente el virus. Es por ello que se han desarrollado varios métodos para probar las vacunas mencionadas, uno de ellos es la técnica de cultivo celular (Wu *et al.*, 2005).

Cultivos celulares y su aportación en el desarrollo de vacunas

El cultivo celular es el conjunto de condiciones en forma *in vitro* que sirven para la propagación de las células de mamíferos y otros tipos, con el propósito de la propagación y el mantenimiento de las propiedades bioquímicas y fisiológicas de estas. Estos cultivos pueden proveer un control, mayor reproducibilidad y coherencia a los resultados (Thermo Fisher Scientific, s.f.).

Para mantener estas propiedades de las células, es necesario realizar pases celulares, también conocidos como sub-cultivos. Este procedimiento consiste en tomar una fracción del grupo de células que se cultivaron previamente para propagarlas en otra caja de cultivo (Beltrán & González, 2016).

En el mundo de la biología molecular y celular, los cultivos celulares tienen diversas aplicaciones, como:

- Investigación y desarrollo de farmacéuticos para pruebas de toxicología y metabolismo de los fármacos.
- Desarrollo de bioprocesos/biorreactores de vacunas.
- Otras aplicaciones: cultivo de células madre, terapia celular e inmunoterapia.

Las células que son cultivadas pueden utilizarse como huéspedes para la propagación de diversos virus con fines para desarrollo de vacunas antivirales, con la condición de que estas células expresen todos sus factores que permitan el ciclo de replicación viral completo (Faisst, 1999).

Líneas celulares para el desarrollo y producción de vacunas: banco de la línea celular MRC-5

Un banco celular se define como un grupo de colecciones de diferentes células para asegurar la pureza, calidad y estabilidad en las investigaciones. El objetivo principal de un banco celular es afianzar un lote de células adecuado para aprovechar al máximo la línea celular en futuras investigaciones (Orta, 2013).

En la actualidad, existen dos tipos de bancos celulares:

Banco Celular Maestro (BCM): Se desarrolla a partir de un vial original y las células que lo constituyen, se encuentran en un número de pases temprana, es decir, una colección de células a partir de una célula o un tejido (Farmacopea Argentina, 2003).

Banco Celular de Trabajo (BCT): Se genera de un vial que pertenece a un banco celular maestro y este lote se utiliza para protocolos de rutina. Estas células están divididas en volúmenes equitativos dentro de crioviales individuales para su almacenamiento en nitrógeno líquido (Farmacopea Argentina, 2003).

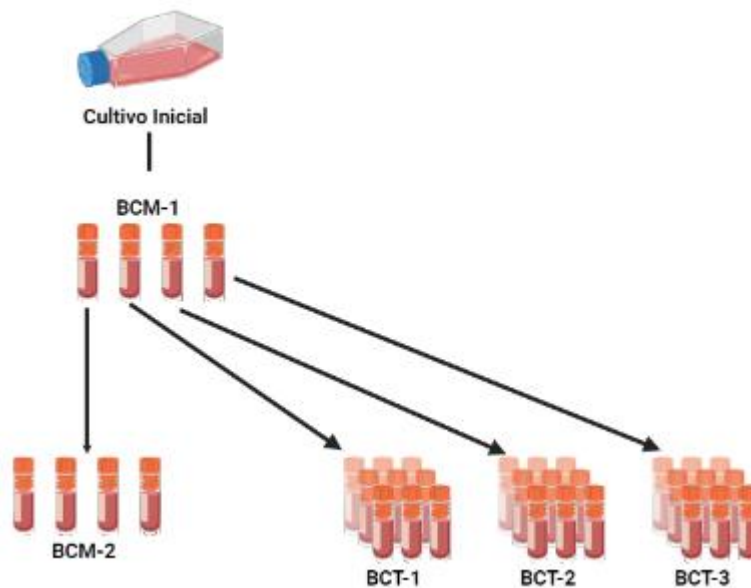


Figura 1. Generación de un Banco Celular Maestro (BCM) y un Banco Celular de Trabajo (BCT) a partir de un cultivo inicial.

Para las condiciones de almacenamiento de los BCM y BCT es necesario guardar los criotubos en ultracongeladores con una temperatura de -70°C o en criotanks de nitrógeno líquido. En ambos casos se recomienda que se tenga la ubicación y la información exacta de cada línea celular con el objetivo de prevenir la desaparición de la línea celular (Orta, 2013).

Particularmente la línea celular MRC-5 representa células humanas diploides derivadas de tejido pulmonar con morfología fibroblástica, que son capaces de duplicarse de 42 a 46 veces en población. Se utilizan para el desarrollo y producción de vacunas, en pruebas de eficacia, así como huésped de transfección en investigaciones virológicas y pruebas de citotoxicidad *in vitro* (American Type Culture Collection, 2022.; Olympus, s.f.).

La línea celular MRC-5 se puede utilizar en pruebas virológicas. Wu y cols. (2006), mencionan que se desarrolló un proceso derivado del cultivo celular MRC-5 a través de una cepa del virus vaccinia en el Instituto de Investigación Médica de Enfermedades Infecciosas del Ejército de EE. UU; esto sucedió porque a principios de la década de 1980 se terminó la producción de la vacuna (Wu *et al.*, 2005).

Actualmente existen varias organizaciones en todo el mundo consideradas como banco celular, esto por tener una extensa lista de líneas celulares. Una de ellas es el American Type Culture Collection (ATCC) fundada en 1914 y establecida en 1925, ubicado en el estado de Virginia, Estados Unidos. Hoy en día es uno de los almacenes de líneas celulares, microorganismos e hibridomas más importantes del mundo (Orta, 2013).

Criopreservación

La criopreservación tiene como objetivo principal conservar la viabilidad de las células a temperaturas bajas por lo que es de suma importancia realizar buenas prácticas de laboratorio para llevar a cabo la creación de bancos celulares. Una de las principales técnicas es preparar medio de cultivo con un agente crioprotector, agregar el medio preparado a las células para posteriormente resguardarlas en ultracongeladores o en criotanks de nitrógeno líquido (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Existen diferentes agentes crioprotectores y se dividen en dos grupos debido a la permeabilidad celular que tiene cada uno, estos grupos son:

Crioprotectores no penetrantes: Estos reactivos tienen un alto peso molecular, además de que son muy eficaces a velocidades elevadas de congelación. Dichos crioprotectores son importantes por su función ya que deshidratan las células y comúnmente este tipo de sustancias se llegan a usar con agentes penetrantes. Los más usados son la glucosa, la sacarosa, el dextrano y la dextrosa (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Crioprotectores penetrantes: En contraste con los crioprotectores no penetrantes, estas sustancias tienen un peso molecular muy bajo, sin embargo, tienen la misma función de deshidratar a la célula y evitar la formación de cristales en el interior con el objetivo de no activar un estrés osmótico. Los más utilizados son el glicerol, el dimetilsulfóxido (DMSO) y el 1-2 propanediol (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Uno de los crioprotectores más usados actualmente es el DMSO, debido a que su función principal es evitar el almacenamiento excesivo de electrolitos y otras sustancias dentro de la célula en el transcurso de la etapa de congelación y así evitar la formación de cristales de hielo que dañan la estructura de la membrana (Ávila-Portillo *et al.*, 2006).

Planteamiento del problema

El padecimiento de la varicela afecta aproximadamente a 4.2 millones de personas que requieren hospitalización y 4,200 personas mueren a causa de esta enfermedad a nivel mundial. (Asociación Española de Vacunología [AEV], 2018).

De acuerdo con el Sistema Único de Información de Vigilancia Epidemiológica (SUIVE), en México se registraron 357,878 casos que acudieron al sector salud en el año 2000. Desde el año 2013 hasta la semana 39 del año 2017 se reportaron 866,686 casos (Porrás y Bejarano, 2017).

Además, se han informado tasas de complicaciones que van del 40.7% al 83.3% y tasas de mortalidad que son de 2 a 3 personas por cada 100,000 enfermos en diferentes hospitales, principalmente pediátricos (Vázquez, 2017).

Es por ello, que se requiere producir vacunas a gran escala que puedan combatir esta enfermedad y a la vez que sean accesibles y eficaces para todas las personas afectadas (Porras y Bejarano, 2017). Para alcanzar esta meta, se necesitan diversos recursos, cabe señalar que una de las herramientas principales para la evaluación de vacunas, son los bancos de líneas celulares.

La alta demanda de líneas celulares se ha incrementado en los últimos años, por lo que se ha vuelto indispensable la generación y conservación óptima de los bancos celulares, pues se obtienen distintos beneficios, el más destacado es la preservación de las propiedades de la célula, para que posteriormente sean distribuidas a distintos institutos y laboratorios para investigaciones génicas, en el campo de la virología para la creación de vacunas, además de la medicina aplicada que se lleva a cabo en la actualidad (Perpiñá *et al.*, 2020; Yang, 2021; Somiari y Somiari, 2015).

Pregunta de investigación

¿Es posible el mantenimiento de la línea celular MRC-5 bajo las condiciones establecidas en el laboratorio de cultivo celular, para la resiembra, mantenimiento, criopreservación y posteriormente la generación de un banco celular de la línea para ser utilizada en pruebas con vacunas para el VVZ?

Hipótesis

Si se utilizan de manera adecuada las técnicas de criopreservación, resiembra y mantenimiento de la línea celular MRC-5, se conservarán las características propias de la línea, de tal forma que podrá obtenerse un banco celular de la línea MRC-5 para posteriormente ser utilizada para pruebas con vacunas para la varicela zóster.

Objetivo General

- Crear un banco celular de la línea MRC-5 para ser utilizada en pruebas con vacunas para la varicela zóster.

Objetivos Específicos

- Resembrar la línea celular MRC-5 para iniciar la expansión de las células.
- Mantener la línea celular MRC-5 en las condiciones adecuadas para incrementar el número de células y poder crear un banco celular.
- Criopreservar la línea celular MRC-5 para la creación de un banco celular.

Material y Métodos

Antes de realizar cualquier pase celular, se debe etiquetar la nueva botella de cultivo con un plumón indeleble incluyendo los siguientes datos:

1. Nombre de la línea celular.
2. Número de sub-cultivo.
3. Fecha de cultivo.
4. Iniciales del responsable de realizar el sub-cultivo.

Descongelación de las células.

Para la descongelación de las células, se retiró del nitrógeno líquido un criotubo ya existente de 1 mL que contiene $5 * 10^6$ cel/ml del banco celular MRC-5, posteriormente se descongeló en un vaso de precipitado con agua destilada a temperatura ambiente. Una vez que las células fueron descongeladas, se desinfectó el criotubo con alcohol al 70%.

A continuación, dentro de un Gabinete de Seguridad Biológica clase II en condiciones asépticas, se abrió el criotubo con el apoyo de una gasa estéril y se sustrajo lentamente el contenido celular con una pipeta de 1 mL. Se pasó la suspensión a una botella de cultivo de 25 cm² y se enjuago el criotubo con 1 mL de medio de crecimiento para permitir el arrastre total de células.

El proceso a partir de la descongelación hasta colocar la suspensión celular en una botella de cultivo, se realizó de la manera más rápida posible para evitar que las células perdieran su viabilidad.

Posteriormente, sin tocar la boquilla de la botella se agregaron 8 mL de medio de crecimiento el cual estuvo constituido por 90% de medio DMEM y 10% de SFB, por ejemplo, para preparar 40 mL de medio de crecimiento, se debería mezclar 36 mL de medio DMEM y 4 mL de SFB.

Después se dejó incubar la botella a 37°C con 5% de CO₂, con un tiempo mínimo de 6 horas y un máximo de 24 horas, con la finalidad de verificar que las células se encontraran fijas en la superficie de la botella de cultivo. Al momento de observarlas en el microscopio y posterior a este tiempo de adhesión, se hizo un cambio de medio de cultivo, de tal forma que fuera medio fresco y así eliminar residuos de dimetilsulfóxido (DMSO).

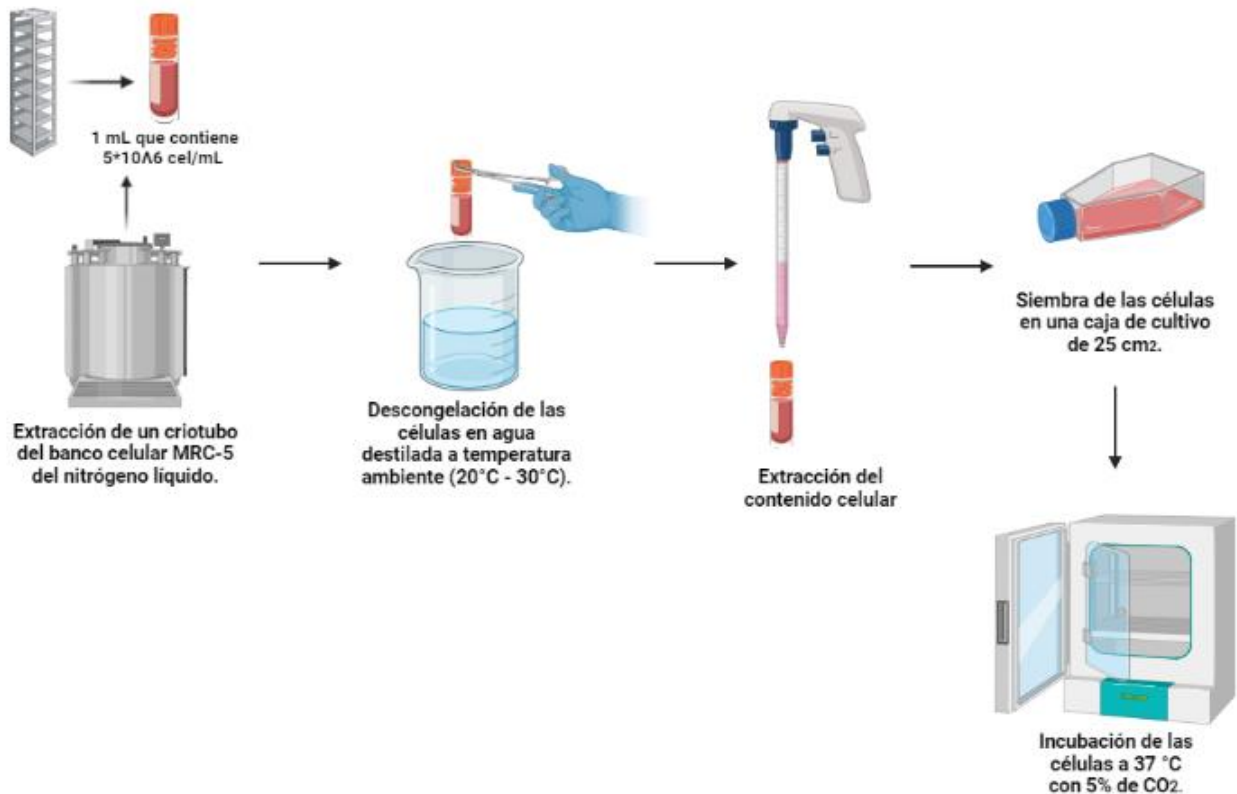


Figura 2. Diagrama del proceso para la descongelación de un criotubo de la línea celular MRC-5.

Sub-cultivo inicial

Partiendo de una botella de 25 cm^2 que se tenía que sub-cultivar, primero se observó a través del microscopio para detectar y descartar cualquier contaminación microbiana en la línea celular y que tuviera un pH aceptable, indicado por el color.

Para desprender de la botella la monocapa de células, se realizó el siguiente procedimiento:

Se eliminó el medio de cultivo de la botella por el lado opuesto al que se encuentra la monocapa celular, a continuación se agregaron 1.5 mL de versenotripsina, haciendo movimientos circulares para que se pudiera lavar la monocapa.

Posteriormente se eliminó rápidamente por vertido el exceso del medio de lavado, para este paso se realizaron dos repeticiones con el objetivo de asegurar la limpieza de las células vivas y evitar restos de células muertas.

A continuación, se agregaron 0.5 mL de verseno-tripsina, se cerró la caja de cultivo y se colocó en la incubadora con una temperatura de 37°C durante dos minutos para que diera inicio la disgregación enzimática, la cual generó el desprendimiento de la monocapa celular de la caja de cultivo.

Una vez que transcurrió el tiempo establecido, se observó a contra luz la caja de cultivo para comprobar si la monocapa se desprendió completamente. Se dieron unos ligeros golpes en las caras laterales de la caja para facilitar el desprendimiento conservándolo en posición horizontal.

Cuando finalizó la digestión enzimática, se llevó la caja de cultivo al gabinete de seguridad y se adicionaron 10 mL de medio de crecimiento y se midió el volumen total. Por último, se resuspendieron las células suavemente con ayuda de una pipeta, evitando formar espuma, a esta mezcla se le denominó Suspensión Intermedia (SI).

Se tomó 0.1 mL de la SI y se agregó en un criotubo que contenía 0.9 mL de solución de azul de tripano (dilución 1:10), el cual tiene la función de teñir las células muertas. Esta solución sirvió para hacer el conteo celular posteriormente.

Conteo celular

Para contar las células presentes en la suspensión, se utilizó la cámara de Neubauer, donde primero se colocó el cubreobjetos de la cámara sobre la parte central de esta misma (Figura 3).

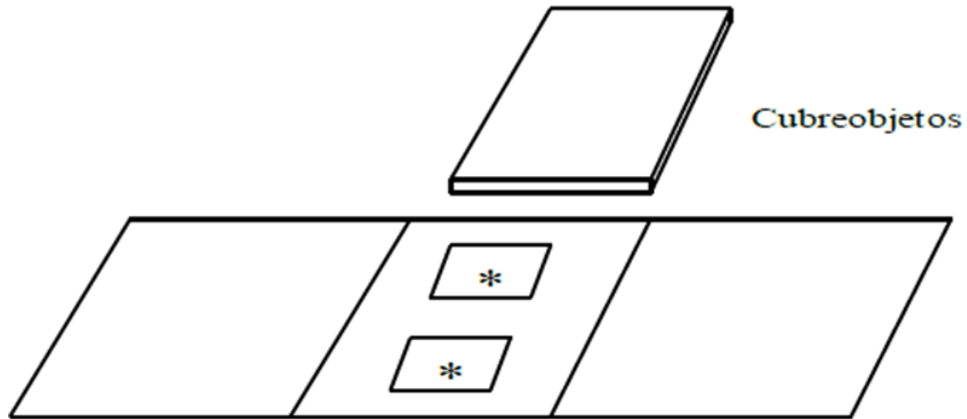


Figura 3. Representación de la colocación del cubreobjetos en la cámara de Neubauer.

Con ayuda de una pipeta Pasteur, por capilaridad se adicionó en ambos extremos una gota de la suspensión de células teñidas con azul de tripano (Figura 4).

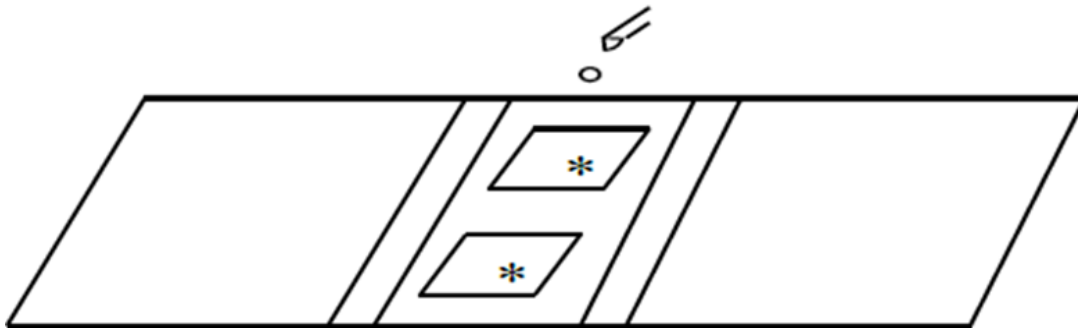


Figura 4. Representación de la colocación del azul de tripano por capilaridad en la cámara de Neubauer.

Usando el microscopio, se contabilizaron tanto las células vivas como las células muertas que aparecieron en las 8 secciones de los 16 cuadros cada una, de arriba hacia abajo, de izquierda a derecha (Figura 5).

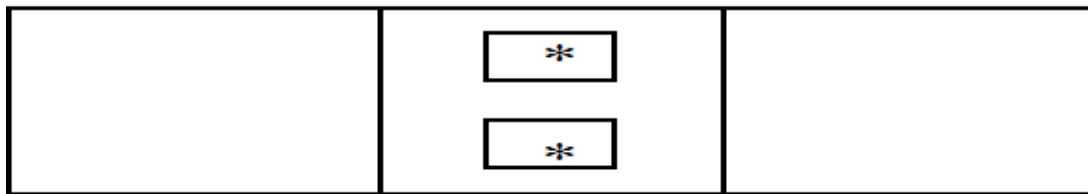
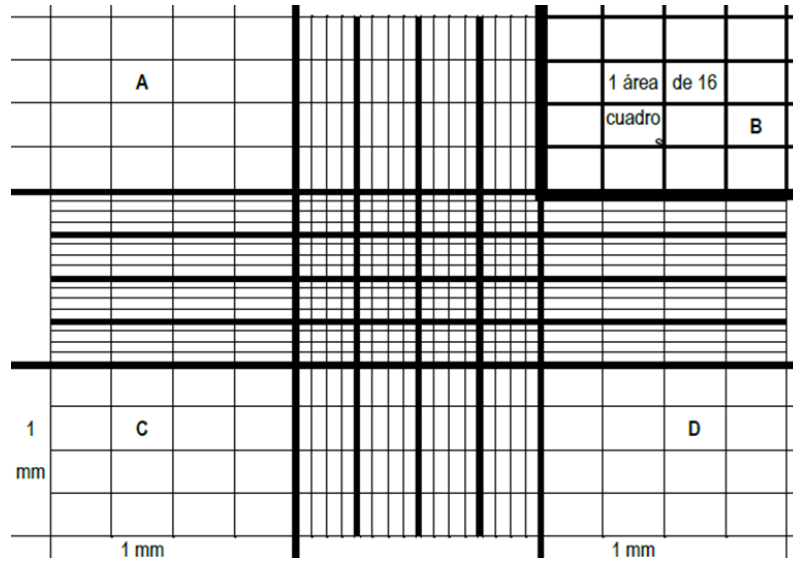


Figura 5. Representación del área de cuantificación en la cámara de Neubauer.

Al finalizar el conteo de células vivas y muertas, se hicieron los cálculos correspondientes para determinar el número de cajas de cultivo que se utilizarían para cosecharlas, porcentaje de confluencia, células viables por mililitro, células totales viables y células cosechadas por centímetro cuadrado. Las fórmulas utilizadas fueron:

- % de viabilidad

$$\% \text{ de viabilidad} = \frac{\text{Total de células vivas}}{\text{Total de células vivas} + \text{Total de células muertas}} * 100$$

- Células viables/mililitro

$$\text{Células viables/mL} = \frac{\text{Células vivas}}{8} * 10 * 10,000$$

- Células totales viables

$$\text{Células totales viables} = \text{cél/mL} * \text{Suspensión intermedia (mL)}$$

* La SI se mide al momento de disgregar las células de la caja de cultivo con el medio de cultivo indicado anteriormente.

- Células cosechadas/cm²

$$\text{Cél/cm}^2 = \frac{\text{Células totales viables}}{\text{Superficie sembrada (tamaño de la botellas en cm}^2\text{)}}$$

Por último, se añadió el volumen de medio de cultivo requerido, este volumen dependió de la cantidad de células que existían aproximadamente en la SI.

Se dejó incubar la botella a 37°C con 5% de CO₂ hasta el siguiente sub-cultivo. Se revisó cada día la confluencia celular y la morfología de la monocapa.

Sub-cultivo final

A partir de este sub-cultivo se realizó un procedimiento similar al mencionado anteriormente para lavar las células, la digestión enzimática, obtener la SI, el conteo celular, y agregar el medio de crecimiento para la incubación de las células.

Diferenciándose en el número de cajas obtenidas que se cosecharon y las concentraciones que se utilizaron para realizar cada paso a excepción del conteo celular, estas modificaciones se muestran en los siguientes cuadros.

Cuadro 1: Sub-cultivo de una caja de cultivo de 75 cm² a dos cajas de cultivo (75 cm² y 150 cm²).

Lavado de las células	Digestión enzimática	Medio de crecimiento para incubar las células	No. De cajas obtenidas
Caja de 75 cm ² = 3 mL	Caja de 75 cm ² = 1 mL	Caja de 75 cm ² = 28.8 mL Caja de 150 cm ² = 41.2 mL	1 caja de 75 cm ² 1 caja de 150 cm ²

Cuadro 2: Sub-cultivo para cultivar dos cajas de 75 cm² y 150 cm² a 4 cajas de cultivo de 150 cm².

Lavado de las células	Digestión enzimática	Medio de crecimiento para incubar las células	No. De cajas obtenidas
Caja de 75 cm ² = 3 mL Caja de 150 cm ² = 6.5 mL	Caja de 75 cm ² = 1 mL Caja de 150 cm ² = 1.5 mL	Para cada caja de 150 cm ² = 48 mL	4 cajas de 150 cm ²

Cuadro 3: Sub-cultivo para cultivar las 4 cajas de 150 cm² a 12 cajas de 150 cm².

Lavado de las células	Digestión enzimática	Medio de crecimiento para incubar las células	No. De cajas obtenidas
Para cada caja de 150 cm ² = 6.5 mL	Para cada caja de 150 cm ² = 1.5 mL	Para cada caja de 150 cm ² = 48 mL	12 cajas de 150 cm ²

Criopreservación

Se retiraron de la incubadora las cajas de cultivo en 4 series de 3 cajas y se colocaron en el gabinete de bioseguridad esterilizado previamente; al comenzar, para cada caja se eliminó el medio de cultivo para después realizar dos lavados de 6.5 mL de verseno-tripsina y se desechó por decantación el medio de lavado. A cada caja se agregaron 1.5 mL de verseno-tripsina y se colocaron en la incubadora para desprender las células, posteriormente para inhibir la solución, se añadieron 10 mL de medio de cultivo a cada una y se midió la SI.

A continuación se pasó la SI a unos tubos cónicos y se centrifugaron a 4500 rpm durante 5 min, posteriormente se llevaron al gabinete de bioseguridad, se deshecho el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 37 mL de medio de cultivo con 10% de DMSO; por último, se dispensó en crioviales de 1 mL y se colocaron en un contenedor con alcohol isopropílico absoluto en el congelador a -80°C con el objetivo de que bajara la temperatura de los viales 1°C por hora, con un periodo mínimo de 24 horas para que posteriormente se pudieran guardar en un tanque de nitrógeno líquido hasta el momento de su descongelación.

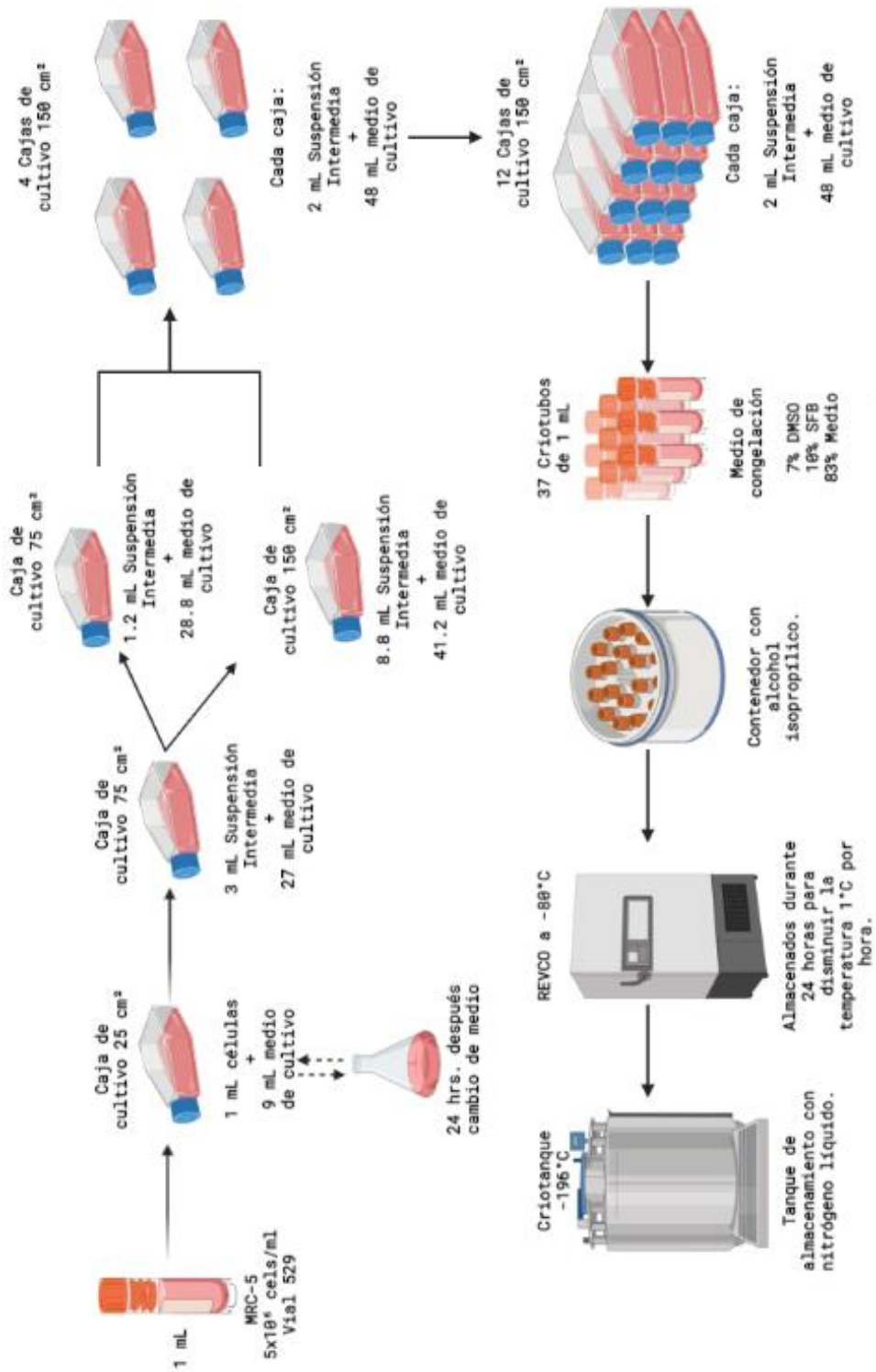


Figura 6. Diagrama del proceso para la creación del banco de la línea celular MRC-5.

Resultados

Confluencia celular

En la imagen de la izquierda, se observa el día 1 al momento de sembrarse en la caja de cultivo, teniendo una confluencia aproximada del 10%. En la imagen de la derecha se visualiza el día 7 de las células cultivadas, donde se aprecia un 90% de confluencia percibiéndose escasos huecos. Ambas imágenes fueron tomadas a través de un microscopio con un aumento de 10x. Al detectar el 90% de confluencia, se realizó el pase celular. Posteriormente, se calculó el porcentaje de confluencia, células viables por mililitro, células totales viables y células cosechadas por centímetro cuadrado con las fórmulas descritas anteriormente.

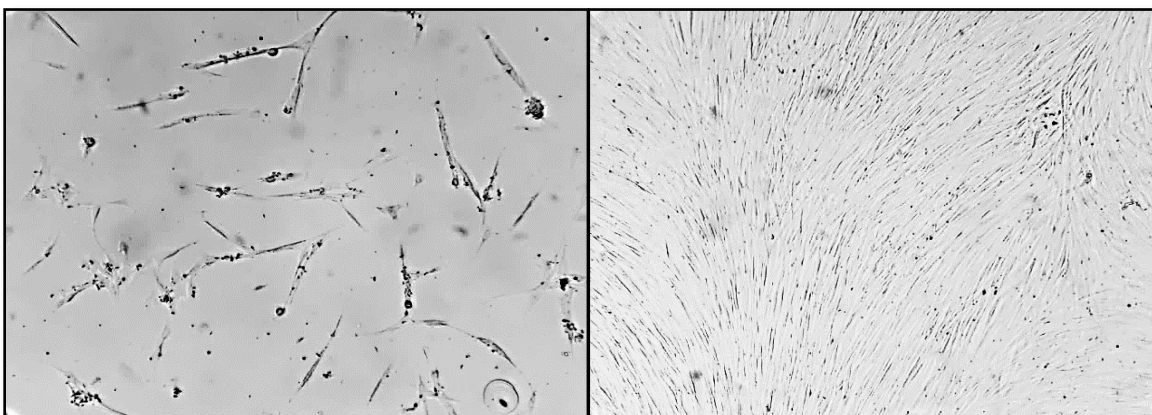


Figura 7. Confluencia de los cultivos celulares de la línea MRC-5. En la imagen de la izquierda se observa la inicial y en la imagen de la derecha la confluencia final.

Conteo celular

A continuación, se muestran las tablas y las fórmulas aplicadas con los resultados obtenidos de cada sub-cultivo que se realizó a partir de la descongelación del criotubo hasta el último realizado:

- Sub-cultivo a partir de la descongelación del criotubo de 1 mL de células MRC-5 a una caja de cultivo de 25 cm² realizado el 17 de marzo del 2022.

Se realizó el pase con 9 mL de medio de crecimiento para tener un volumen final de 10 mL. 24 horas después se le hizo un cambio de medio con otros 10 mL de medio de crecimiento.

Tabla 1. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y el pase del criotubo con 1 mL de células MRC-5 a una caja de cultivo de 25 cm².

Conteo	1	2	Promedio
Células vivas	5	12	8
Células muertas	3	9	6
Viabilidad (%)			57.14%
Volumen de Suspensión Intermedia (S.I) en mL			10 mL
Células viables / mL			100 000
Células totales viables			1 000 000
Células sembradas / cm ²			40 000
Fórmulas			
$\% \text{ de viabilidad} = \frac{8}{8+6} * 100$	$\text{Células viables/mL} = \frac{8}{8} * 10 * 10,000$		
$\text{Células totales viables} = 100\,000 * 10$	$\text{Cél/cm}^2 = \frac{1\,000\,000}{25}$		

- Sub-cultivo a partir de una caja de 25 cm² a una de 75 cm² realizado el 08 de abril del 2022.

Se elaboraron 27 mL de medio, el cual se usó 2 mL para bajar las células de la caja de cultivo y 25 mL para cultivarlas en una caja de cultivo de 25 cm².

Tabla 2. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de una caja de 25 cm² a una de 75 cm².

Conteo	1	2	Promedio
Células vivas	22	22	22
Células muertas	1	1	1
Viabilidad (%)			95.65%
Volumen de Suspensión Intermedia (S.I) en mL			3 mL
Células viables / mL			275 000
Células totales viables			825 000
Células cosechadas / cm ²			33 000
Fórmulas			
$\% \text{ de viabilidad} = \frac{22}{22 + 1} * 100$	$Células \text{ viables/mL} = \frac{22}{8} * 10 * 10,000$		
$Células \text{ totales viables} = 275\ 000 * 3$	$Cél/cm^2 = \frac{825\ 000}{25}$		

- Pase celular de una caja de cultivo de 75 cm² a dos cajas de cultivo (75 cm² y 150 cm²) realizado el 18 de abril del 2022.

Se prepararon 90 mL de medio de crecimiento donde se utilizaron 10 mL para bajar las células, 30 mL para cultivarlas en la caja de 75 cm² y 50 mL para cultivarlas en la caja de 150 cm².

Tabla 3. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de una caja de cultivo de 75 cm² a dos cajas de cultivo (75 cm² y 150 cm²).

Conteo	1	2	Promedio
Células vivas	26	28	27
Células muertas	1	3	2
Viabilidad (%)			93.10%
Volumen de Suspensión Intermedia (S.I) en mL			10 mL
Células viables / mL			337 500
Células totales viables			3 375 000
Células cosechadas / cm ²			45 000
Fórmulas			
$\% \text{ de viabilidad} = \frac{27}{27 + 2} * 100$	$Células \text{ viables/mL} = \frac{27}{8} * 10 * 10,000$		
$Células \text{ totales viables} = 337\ 500 * 10$	$Cél/cm^2 = \frac{3\ 375\ 000}{75}$		

- Pase celular a partir de dos cajas de cultivo de 150 cm² y 75 cm² para obtener 4 cajas de cultivo de 150 cm² realizado el 27 de abril del 2022.

Se preparó 220 mL de medio de crecimiento de los cuales: 20 mL se usaron para bajar las células, es decir, 10 mL para cada caja. Y para cultivarlas se usaron en cada caja 50 mL.

Tabla 4. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de dos cajas de 150 cm² y 75 cm² a 4 cajas de cultivo de 150 cm².

Conteo		1	2	Promedio
Células vivas		124	110	117
Células muertas		0	4	2
Viabilidad (%)				98.31%
Volumen de Suspensión Intermedia (S.I) en mL				21 mL
Células viables / mL				1 462 500
Células totales viables				30 712 500
Células cosechadas / cm ²				136 500
Fórmulas				
$\% \text{ de viabilidad} = \frac{117}{117 + 2} * 100$		$\text{Células viables/mL} = \frac{117}{8} * 10 * 10,000$		
$\text{Células totales viables} = 1\,462\,500 * 21$		$\text{Cél/cm}^2 = \frac{30\,712\,500}{150 + 75}$		

- Sub-cultivo a partir de 4 cajas de cultivo de 150 cm² para cosechar 12 cajas de 150 cm² realizado el 04 de mayo del 2022.

Se elaboraron 640 mL de medio de crecimiento, utilizando 40 mL para bajar las células, es decir, 10 mL para cada caja y se emplearon 50 mL en cada caja al momento de cultivarlas.

Tabla 5. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de 4 cajas de 150 cm² a 12 cajas de 150 cm².

Conteo		1	2	Promedio
Células vivas		131	106	118
Células muertas		3	2	3
Viabilidad (%)				97.52%
Volumen de Suspensión Intermedia (S.I) en mL				48.6 mL
Células viables / mL				1 475 000
Células totales viables				71 685 000
Células cosechadas / cm ²				119 475
Fórmulas				
$\% \text{ de viabilidad} = \frac{118}{118 + 3} * 100$		$\text{Células viables/mL} = \frac{118}{8} * 10 * 10,000$		
$\text{Células totales viables} = 1\,475\,000 * 48.6$		$\text{Cél/cm}^2 = \frac{1\,475\,000}{150(4)}$		

- Sub-cultivo de 12 cajas de cultivo de 150 cm² a 37 criotubos de 1 mL

En este paso se prepararon 200 mL de medio usando 120 mL para bajar las células, es decir, 10 mL en cada caja y los otros 80 mL resto se utilizó para la prueba de esterilización.

Además, se prepararon 100 mL de medio de congelación con la finalidad de emplear 1 mL en cada criotubo y los 63 mL se usaron para la prueba antes mencionada.

Con el medio que quedó de las 12 cajas, se rescataron 80 mL para la misma prueba que se mencionó anteriormente.

Tabla 6. Datos obtenidos a partir de las fórmulas y del pase de 12 cajas de cultivo de 150 cm² a 37 criotubos de 1 mL.

Conteo		1	2	Promedio
Células vivas		103	100	101
Células muertas		1	0	1
Viabilidad (%)				99%
Volumen de Suspensión Intermedia (S.I) en mL				142 mL
Células viables / Ml				1 262 500
Células totales viables				179 275 000
Células cosechadas / cm ²				99 597
Fórmulas				
$\% \text{ de viabilidad} = \frac{101}{101 + 1} * 100$		$\text{Células viables/mL} = \frac{101}{8} * 10 * 10,000$		
$\text{Células totales viables} = 1\ 262\ 500 * 142$		$\text{Cél/cm}^2 = \frac{179\ 275\ 000}{150(12)}$		

Una vez colocando las células en los criotubos, se introdujeron en contenedores con alcohol isopropílico y se guardaron en el ultracongelador a -80 °C con la finalidad de que bajara la temperatura de las células 1 °C por hora durante 24 horas.

Transcurrido el lapso antes mencionado, se transfirieron rápidamente los criotubos en cajas de plástico para posteriormente colocarlos en canastillas, se aseguraron firmemente con una varilla y por último se introdujeron en el criotank con nitrógeno líquido.

Discusión y análisis de resultados

Como se ha mencionado en el presente trabajo, la creación de un banco celular es esencial para llevar a cabo diversos proyectos, con la finalidad de tener varios lotes de diferentes líneas celulares manteniendo en condiciones óptimas sus características.

Una de las líneas celulares ampliamente trabajadas, es la línea celular MRC-5, que ha sido importante en las investigaciones para crear vacunas contra la varicela-zóster y otras aplicaciones mencionadas anteriormente, entre ellas, las investigaciones virológicas, por ejemplo, algunos autores utilizaron las células MRC-5 para inocular en ellas el VVZ y otros virus, haciendo el cultivo en tubos convencionales (Woods y Mills, 1988; Brinker y Doern, 1993). En cambio, en los últimos años se ha optado por usar botellas de cultivo celular optimizando los resultados, es por ello que en la actualidad se prefiere el uso de esta técnica para tener un mejor manejo de las células (Wu *et al.*, 2005).

Así por este motivo, se decidió utilizar botellas de cultivo con un sistema de filtro en la tapa roscada con el objetivo de que la caja se encontrara sellada y por medio del filtro se lograra el intercambio de CO₂ entre las células y el medio de cultivo, estas condiciones promovieron la usencia de microorganismos que pudieran afectar negativamente a las células como se puede observar en las imágenes de las confluencias celulares.

Para la parte de cultivo y proliferación celular, existe un protocolo estandarizado que ha cambiado en el transcurso de los años, principalmente en el tipo de medio de cultivo, el volumen y el tipo de suero y el tipo de congelación de las células.

En este proyecto, se obtuvieron resultados favorables con respecto al objetivo del mismo, esto indica que las condiciones fueron óptimas para el crecimiento y desarrollo de las células, es así que se obtuvieron confluencias celulares elevadas en cada sub-cultivo, además de presentar en su mayoría una viabilidad que variaba entre el 93% y el 99%, cabe mencionar que el único porcentaje bajo obtenido fue al momento de descongelar el criotubo y pasarlo a una caja de cultivo.

A pesar de que estos resultados pudieron verse influido por diversos factores, podemos descartar la formación de cristales por descongelación lenta debido al uso de DMSO y el daño por exposición a tiempo prolongado de este crioprotector ya que estaba dentro de los límites de tiempo recomendados. Lo que sugiere que las células se encontraban en un período de latencia y necesitaban adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo.

Dentro de las condiciones para el crecimiento de las células se consideró el medio de cultivo, los medios más comúnmente utilizados son el medio MEM y el medio DMEM. Algunos autores como Honda y Munakata (2004), y Schrader y colaboradores (2012) han seleccionado el medio DMEM en sus respectivas investigaciones con buenos resultados y otros autores como Woods y Mills, y Brinker y Doern, (1993) han optado por usar medio MEM obteniendo productos similares.

Por otra parte, Wu y cols. (2005), realizaron un estudio comparando el uso de ambos medios de crecimiento en el cultivo celular de la línea celular MRC-5 concluyendo que no se observó algún efecto significativo, sugiriendo que el uso del medio MEM en este proyecto no fue un factor determinante para la conservación y reproducción de las células.

Otro factor a considerar para la propagación adecuada de las células es el uso de suero, cabe mencionar que el SFB es un complemento del medio de cultivo ya que hay nutrimentos que el medio no puede ofrecer, pero el suero sí. Su importancia radica en que otorga los nutrimentos a las células para que puedan proliferar adecuadamente.

En la investigación presente se utilizó SFB con una concentración al 10%, obteniendo resultados positivos similares a los reportados previamente por otros autores (Brinker y Doern, 1993; Honda y Munakata, 2004; Hyun-Seok *et al.*, 1999).

Al darle los nutrimentos y factores adecuados a la línea celular MRC-5, se obtuvo una tendencia a presentar una morfología fibroblástica como se muestra en las imágenes de la confluencia celular. En donde se pueden observar ramificaciones en las células, núcleos grandes, con una buena confluencia, sugiriendo que uno de los factores que contribuyó a estos resultados fue el porcentaje utilizado de SFB, ya que se han reportado estudios en los que se menciona que la falta de este reactivo puede promover un cambio morfológico en las células cultivadas, al presentar forma de huso (Schrader *et al.*, 2012).

Además del SFB, otro elemento importante en el cultivo celular son los antibióticos, ya que su función es proteger a las células y evitar una posible contaminación. Sin embargo, Sun (2016), menciona que, para la creación de un banco celular, se puede emplear el uso de un antibiótico, pero no se recomienda ya que puede producir algún efecto inhibitor en el crecimiento de las células (Sun *et al.*, 2016).

Por otro lado, en ausencia de antibiótico, el crecimiento de microorganismos no deseados (hongos, micoplasmas, bacterias o levaduras) en el cultivo celular, puede considerarse como un indicador de contaminación; en ese caso, se recomienda desechar el cultivo y revisar los reactivos empleados para poder descartar alguna posible contaminación en ellas, por último, se debe limpiar y desinfectar el área de trabajo y el gabinete de bioseguridad para descongelar un nuevo criovial e iniciar de nuevo el proceso (Cobo *et al.*, 2005). Por consiguiente, en este proyecto se decidió no utilizar antibiótico en la creación del banco celular MRC-5 con la finalidad de evitar consecuencias negativas a largo plazo en la aplicación de futuras pruebas para la generación de vacunas contra la varicela-zóster.

Esto se ve reflejado en las imágenes de las confluencias celulares, donde se aprecian las células limpias y sanas, esto quiere decir que, las células se encontraban en ausencia de contaminantes, lo que sugiere que se llevaron a cabo buenas prácticas de laboratorio.

Otros factores que influyen para que puedan crecer diferentes líneas celulares de manera *in vitro* es la temperatura y el porcentaje de Dióxido de Carbono (CO₂), ya que, dependiendo del origen de las células, estas necesitarán diferentes condiciones de cultivo. Por lo que se han descrito varios protocolos especializados en cada una de ellas.

En cuanto a la temperatura, de acuerdo con la ATCC mencionan que la temperatura para que las células crezcan adecuadamente es de 37 °C; sin embargo, si sufren un cambio en este factor, entrarían en una condición de estrés y, por lo tanto, ocurriría la muerte celular, por ejemplo, las líneas celulares pueden vivir algunos días a 4 °C, pero si sube 2°C arriba de la temperatura óptima (37 °C), únicamente sobrevivirían unas horas (American Type Culture Collection [ATCC], s.f.).

Con respecto al CO₂ en el cultivo celular, de acuerdo con la Agencia de Seguridad de la Salud del Reino Unido, menciona que esta condición no es un requerimiento metabólico, pero si es un factor que influye en la regulación del pH, ya que hay un intercambio de CO₂ entre las células y el medio de cultivo (UK Health Security Agency, 2019).

Por otro lado, el pH puede verse afectado por la interacción entre la concentración del CO₂ con la temperatura y pueden ser considerados como factores de estrés externos (Kattiparambil Rajan *et al.*, 2017). Por consiguiente, las condiciones antes mencionadas, se tomaron en cuenta como referencias importantes para realizar el cultivo celular en esta investigación, a través del monitoreo constante de la incubadora en la que se encontraban las células de la línea celular MRC-5. Para ello se revisó la incubadora dos veces al día verificando que estuviera a una temperatura de 37 °C y a una atmosfera del 5% de CO₂.

Por otra parte, la crioconservación es importante al momento de crear un banco celular, ya que este método sirve para almacenar por un tiempo prologado órganos viables, tejidos y células en nitrógeno líquido, mismos que no se pueden resguardar con otras técnicas de conservación convencionales (Benson, 1999).

Para la congelación de las células MRC-5, se utilizó un crioprotector muy común que es el dimetilsulfóxido (DMSO) con el objetivo de mantener vivas a las células al estar congeladas en nitrógeno líquido, para ello se añadió en el medio de cultivo con una concentración al 10%.

Para realizar el proceso de crioconservación adecuadamente, de acuerdo con la investigación de Ohno y colaboradores, Stacey & Masters y con el protocolo estandarizado por la ATCC, la concentración adecuada de DMSO en el medio de cultivo es entre el 5% y 10%; dichos autores han reportado que en este rango de concentración el DMSO tiene beneficios como disminuir la pérdida de agua, el tamaño y la viabilidad de las células. No obstante, las desventajas de usar DMSO en la congelación es que puede llegar a producir efectos tóxicos si las células se exponen a este reactivo por un tiempo prolongado, lo que podría repercutir en los resultados.

Para reducir estos efectos, en este proyecto se realizaron las siguientes medidas preventivas: tener las células preparadas en el criotubo, agregar el DMSO, cerrar correctamente el envase y llevar directamente el contenido celular al ultracongelador; todo esto llevado a cabo de la manera más ágil y rápida posible (Ohno *et al.*, 1991; Stacey & Masters, 2008; ATCC, s.f.).

Por último, para proteger los crioviales en donde se encuentran resguardadas las células, es necesario contar con un contenedor para mantener la temperatura requerida y evitar la muerte celular. Stacey y Masters (2008), mencionan que para almacenar pocos crioviales, sugieren usar cajas de congelación comerciales como *Mr. Frosty* o *Invitrogen*. En caso contrario, cuando hay una gran cantidad de muestras, se opta por usar contenedores de nitrógeno líquido, sin embargo, uno de los efectos adversos es la contaminación cruzada al guardar diferentes células en el mismo criotank y podría afectar drásticamente los resultados.

Para solucionar el problema antes mencionado, en este trabajo se realizó como medida de precaución, sellar los crioviales con un material llamado crioflex, con el objetivo de evitar la contaminación cruzada y mantener las células aisladas dentro del criotank de nitrógeno líquido.

Conclusiones

Como producto de este proyecto, se logró la obtención de un banco celular de la línea MRC-5 que consta de 37 viales que se encuentran resguardados en un criotank de nitrógeno líquido a una temperatura de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Gracias a los resultados obtenidos, se puede concluir que al aplicar las buenas prácticas de laboratorio y tener los conocimientos necesarios de cultivo celular para el mantenimiento de líneas celulares, se pueden tener resultados óptimos y favorables, que pueden ir evolucionando a través del tiempo por lo que hay que mantener una actualización constante para estar a la vanguardia e innovar en nuevos procedimientos de cultivo celular. Además de adquirir una concientización de la importancia que puede llegar a tener el uso de bancos celulares en diferentes proyectos de investigación para encontrar la cura de alguna enfermedad como en el caso de la varicela-zóster.

Referencias

- American Type Culture Collection. (s.f.). ATCC Animal Cell Culture Guide. <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>
- American Type Culture Collection. MRC-5. (2022). <https://www.atcc.org/products/ccl-171>
- Asociación Española de Vacunología. (2018). Situación Mundial: Varicela. <https://www.vacunas.org/situacion-mundial-varicela/>
- Ávila-Portillo, L. M., Madero, J. I., López, C., Colinas-León, M. T., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L. G., Gómez, C. M., Lozano, J. A., & Reguero, M. T. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista colombiana de obstetricia y ginecología*, 57(4), 291-300. <https://doi.org/10.18597/rcog.468>
- Beltrán, N., & González, C. (2016). Técnicas de Cultivos Celulares e Ingeniería de Tejidos. Universidad Autónoma Metropolitana. http://www.cua.uam.mx/pdfs/conoce/libroselec/15Tecnicas_de_Cultivos_Celulares_e_Ingenieria_de_Tejidos.pdf
- Benson, E. (1999). *Plant Conservation Biotechnology*. Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9781482273038>
- Brinker, J. P., & Doern, G. V. (1993). Comparison of MRC-5 and A-549 cells in conventional culture tubes and shell vial assays for the detection of varicella-zoster virus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 17(1), 75–77. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(93\)90075-i](https://doi.org/10.1016/0732-8893(93)90075-i)
- Cobo, F., Stacey, G. N., Hunt, C., Cabrera, C., Nieto, A., Montes, R., Cortés, J. L., Catalina, P., Barnie, A., & Concha, A. (2005). Microbiological control in stem cell banks: approaches to standardisation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(4), 456–466. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0062-2>
- Faisst, S. (1999). PROPAGATION OF VIRUSES | Animal. *Encyclopedia of Virology* (pp. 1408–1413). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwvi.1999.0236>
- Farmacopea Argentina. (2003). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de la Nación. (7ª ed., Vol. 1., pp. 441-442). http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic-html/page1.html
- Galenus MED. (s.f.). VARICELA. <https://med-cmc.com/varicela-2/>

- Honda, E., & Munakata, H. (2004). Purification and characterization of decorin from the culture media of MRC-5 cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(8), 1635–1644. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.023>
- Hyun-Seok, K., Chung, Y., Jeon, Y., & Lee, S. (1998). Large-Scale Culture of Hepatitis A Virus in Human Diploid MRC-5 Cells and Partial Purification of the Viral Antigen for Use as a Vaccine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9(4), 386-392. http://www.koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=E1MBA4_1999_v9n4_386
- Instituto Nacional de las Personas Adultas Mayores. (2021). La importancia de la vacunación como medida para la prevención de enfermedades. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/inapam/es/articulos/la-importancia-de-la-vacunacion-como-medida-para-la-prevencion-de-enfermedades?idiom=es>
- Instituto Nacional del Cáncer. (s.f.). Vacuna. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/vacuna>
- Instituto Nacional del Cáncer. (s.f.). Antígeno. <https://www.cancer.gov/espanol/buscar/resultados?swKeyword=Ant%C3%ADgeno>
- Kattipparambil Rajan, D., Verho, J., Kreutzer, J., Valimaki, H., Ihalainen, H., Lekkala, J., Patrikoski, M., & Miettinen, S. (2017). Monitoring pH, temperature and humidity in long-term stem cell culture in CO₂ incubator. 2017 IEEE International Symposium on Medical Measurements and Applications (MeMeA), pp. 470-474, <https://doi.org/10.1109/memea.2017.7985922>
- Observatorio de vacunas. (s.f.) ¿Qué componentes tiene una vacuna? <https://observatoriovacunasovid19.unam.mx/ufaq/que-componentes-tiene-una-vacuna/>
- Ohno, T., Saijo-Kurita, K., Miyamoto-Eimori, N., Kurose, T., Aoki, Y., & Yosimura, S. (1991). A simple method for in situ freezing of anchorage-dependent cells including rat liver parenchymal cells. *Cytotechnology*, 5(3), 273-277. <https://doi.org/10.1007/bf00556297>
- Olympus. (s.f.). Human Fetal Lung Fibroblast Cells (MRC-5 Line). <https://www.olympus-lifescience.com/es/microscope-resource/primer/techniques/fluorescence/gallery/cells/mrc5/mrc5sb0/>

- Organización Mundial de la Salud. (30 de agosto de 2021). Vacunas e inmunización: ¿qué es la vacunación? <https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/vaccines-and-immunization-what-is-vaccination>
- Orta, M. (2013). Manejo de un banco celular. Instituto Politécnico Nacional. <https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/25341/1/ESTRADA%20ORTA%20MIGUEL%20%C3%81NGEL.pdf>
- Perpiñá, U., Herranz, C., Martín-Ibáñez, R., Boronat, A., Chiappe, F., Monforte, V., Orpella-Aceret, G., González, E., Olivé, M., Castella, M., Suñé, G., Urbano-Ispizua, L., Delgado, J., Juan, M., & Canals, J. M. (2020). Cell Banking of HEK293T cell line for clinical-grade lentiviral particles manufacturing. *Translational Medicine Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/s41231-020-00075-w>
- Porras, M. H., & Bejarano, J. I. C. (2017). Varicela: «una enfermedad benigna». *Revista latinoamericana de infectología pediátrica*, 30(3), 91-92. <https://www.medigraphic.com/pdfs/infectologia/lip-2017/lip173a.pdf>
- Schrader, S., Tuft, S. J., Beaconsfield, M., Borrelli, M., Geerling, G., & Daniels, J. T. (2012). Evaluation of human MRC-5 cells as a feeder layer in a xenobiotic-free culture system for conjunctival epithelial progenitor cells. *Current eye research*, 37(12), 1067–1074. <https://doi.org/10.3109/02713683.2012.713155>
- Somiari, S. B., & Somiari, R. I. (2015). The future of biobanking: A conceptual look at how biobanks can respond to the growing human biospecimen needs of researchers. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 864, 11–27. https://doi.org/10.1007/978-3-319-20579-3_2
- Stacey, G. N., & Masters, J. R. (2008). Cryopreservation and banking of mammalian cell lines. *Nature Protocols*, 3(12), 1981–1989. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.190>
- Sun, C., Yue, J., He, N., Liu, Y., Zhang, X., & Zhang, Y. (2016). Fundamental principles of stem cell banking. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 951, 31–45. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_3
- Thermo Fisher Scientific. (s.f.). Introduction to Cell Culture. <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/introduction-to-cell-culture.html>
- UK Health Security Agency. (abril de 2019). Culture Collections. <https://www.culturecollections.org.uk/news/ecacc-news/co2-concentration-and-ph-control-in-the-cell-culture-laboratory.aspx>

- Vázquez, M., Cravioto, P., Galván, F., Guarneros, D., & Pastor, V. H. (2017). Varicela y herpes zóster: retos para la salud pública. *Salud Pública de México*, 59(6), 650-656. <https://doi.org/10.21149/7997>
- Warren-Gash, C., Forbes, H., & Breuer, J. (2017). Varicella and herpes zoster vaccine development: lessons learned. *Expert Review of Vaccines*, 16(12), 1191–1201. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1394843>
- Woods, G. L., & Mills, R. D. (1988). Conventional tube cell culture compared with centrifugal inoculation of MRC-5 cells and staining with monoclonal antibodies for detection of herpes simplex virus in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(3), 570–572. <https://doi.org/10.1128/jcm.26.3.570-572.1988>
- Wu, F., Reddy, K., Nadeau, I., Gilly, J., Terpening, S., & Clanton, D. J. (2005). Optimization of a MRC-5 cell culture process for the production of a smallpox vaccine. *Cytotechnology*, 49(2–3), 95–107. <https://doi.org/10.1007/s10616-005-4022-6>
- Yang, X., Wan, M., Cai, L., Hou, A., Sun, B., Zhou, Y., Gao, F., Su, W., & Jiang, C. (2021). Interferon inhibition enhances the pilot-scale production of rabies virus in human diploid MRC-5 cells. *Viruses*, 14(1), 49. <https://doi.org/10.3390/v14010049>