

DISEÑO DE UN MEDIO DE CULTIVO PARA CÉLULAS DE MAMÍFERO UTILIZANDO FUENTES ALTERNATIVAS DE NITRÓGENO Y VITAMINAS

CELL CULTURE MEDIA DESIGN FOR MAMMALIAN CELLS BY USING ALTERNATIVE SOURCES OF NITROGEN AND VITAMINS

G.E. Espinosa-Ayala^{1,2,3}, C. Rivas-Morales², K. Arévalo-Niño¹, A. Oranday-Cárdenas², D.E. Cruz-Vega³, J. Castro-Garza³ y P. Carranza-Rosales^{3*}

¹Laboratorio de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba s/n Ciudad Universitaria, CP 66451. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

²Laboratorio de Química Analítica. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pedro de Alba s/n Ciudad Universitaria, CP 66451. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

³Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS. 2 de Abril y San Luis Potosí. Col. Independencia. CP 64720. Monterrey, Nuevo León, México.

Recibido 12 de Mayo 2006; Aceptado 26 de Septiembre 2007

Resumen

La composición de los medios de cultivo celular influye en la proliferación, morfología y fisiología de las células que se propagan en ellos. En el presente trabajo se diseñó un medio de cultivo a base de peptona y extracto de levadura grado industrial para adaptar las líneas celulares OK, CHANG y LLCPK-1. Las tres líneas celulares se cultivaron exitosamente en una mezcla 25:75 de MEM:MD (MEM = medio testigo; MD = medio diseñado) determinado por la comparación de los parámetros de crecimiento, morfología celular y susceptibilidad a HgCl₂ con el medio testigo MEM. Una proporción mayor de MD en la mezcla 5:95 produjo alteraciones morfológicas del núcleo, en la relación núcleo-citoplasma y una disminución en el crecimiento que no permitió la evaluación de los otros parámetros. La falta de crecimiento de las células cultivadas en la mezcla 5:95 y las alteraciones morfológicas observadas posiblemente se debieron a la concentración de metales en niveles tóxicos en el extracto de levadura y la peptona, así como a una baja concentración de zinc en el extracto de levadura.

Palabras clave: medios de cultivo, adaptación celular, peptona, extracto de levadura.

Abstract

Culture media formulation has a direct influence on growth, morphology and physiology of cells. In this work, a mammalian cell culture medium was formulated based on peptone and yeast extract with an industrial reagent level. Three different mammalian cell lines, OK, CHANG and LLCPK-1 were successfully grown in a 25:75 mix of MEM:MD (MEM = control medium; MD = house medium) as determined by comparing cell growth parameters, cellular morphology and susceptibility to HgCl₂ with those obtained from cells grown in MEM medium. A greater amount of MD in the mix 5:95 produced nuclear morphological changes, altered nucleus-cytoplasm relationship and did not support cell growth, which was possibly due to a toxic concentration of metals in the peptone and yeast extract and also to the low concentration of zinc in the yeast extract.

Keywords: cell culture medium, cell adaptation, peptone, yeast extract.

1. Introducción

En los últimos años, la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en el entendimiento de los mecanismos implicados en los procesos intra e intercelulares que ocurren a nivel molecular, bioquímico y fisiológico (Freshney, 2000). Una de las limitantes para el avance en la investigación que emplea cultivos de células, en países en vías de desarrollo, es que los medios existentes en el mercado son de importación y de alto

costo. Por lo anterior, es importante diseñar nuevos medios de cultivo utilizando fuentes alternas de carbono, nitrógeno y vitaminas que favorezcan el crecimiento celular de manera similar a como ocurre en los medios tradicionales, manteniendo las características fisiológicas y morfológicas de las células y que permitan reducir los costos de producción. En nuestro grupo de trabajo se han realizado estudios enfocados al diseño de medios de cultivo para microorganismos (Rivas, 1998, Patente en trámite No. 010892; Elias, 2002) y actualmente

* Autor para la correspondencia: E-mail: pilarcarranza@cibimty.net
Tel. (81) 8190-4035

también en el diseño medios de cultivo para células de mamífero. Al respecto, Iding y col., (2000) reportaron medios de cultivo modificados mediante la adición de extracto de levadura y peptona para el crecimiento de líneas celulares de mamíferos, sin embargo los resultados obtenidos variaron con los lotes de extracto de levadura y las concentraciones utilizadas. Burtreau y col., (2003) observaron que el crecimiento de la línea celular CHO aumentó hasta un 30%, cuando se utilizó un medio de cultivo libre de proteína de origen animal, pero suplementado con peptonas vegetales. Pham y col., (2003) determinaron que la línea celular HEK293/EBNA1 (293SFE) es capaz de crecer en un medio libre de suero suplementado con peptonas. Estos mismos autores (Pham y col., 2005), evaluaron la eficiencia en la síntesis de proteínas recombinantes en la línea celular HEK293 utilizando un medio libre de suero y adicionando distintos tipos de peptonas de origen animal (carne, caseína y gelatina), el estudio mostró que la utilización de peptona de gelatina como sustituto del suero fetal bovino fue la más efectiva para la producción de dichas proteínas.

En la búsqueda de alternativas para el cultivo de células de mamífero, se propuso formular un medio de cultivo utilizando fuentes de nitrógeno y vitaminas grado industrial, lo cual permitirá disminuir los costos de cultivo *in vitro* y contribuir con un nuevo producto nacional y de fácil acceso para los investigadores de este campo.

2. Materiales y métodos.

2.1 Líneas celulares.

Se utilizaron las líneas celulares OK de riñón de zarigüeya, LLCPK-1 de riñón de cerdo y CHANG de hígado humano (American Type Culture Collection: CRL1840, CRL1392 y CCL13 respectivamente). Se cultivaron a 37 °C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ en botellas de poliestireno de 25 cm² (Corning, NY, USA) en los medios descritos abajo.

2.2 Preparación de los medios de cultivo.

Para el medio de cultivo diseñado (MD) se utilizó peptona de colágeno y extracto de levadura (SENSIENT, Jalisco, Méx.) como fuente de nitrógeno y de vitaminas respectivamente. Se complementó con glucosa, sales inorgánicas (CaCl₂, NaCl, KCl, MgSO₄, NaH₂PO₄), rojo de fenol y bicarbonato de sodio. Para la preparación del medio MEM se utilizó una presentación comercial (GIBCO BRL, Grand Island, USA). En ambos medios de cultivo se adicionó una mezcla de antibióticos (100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de estreptomina) y fueron suplementados con 10 % de suero fetal de bovino (GIBCO BRL, Grand Island, USA).

2.3 Adaptación de las líneas celulares al MD.

Para la adaptación de las líneas celulares al medio MD, se utilizaron diferentes proporciones de medio MEM y MD con la finalidad de sustituir al 100 % el medio testigo (MEM). Para esto, se realizaron mezclas de los medios MEM y MD con incrementos progresivos desde 50:50 hasta 5:95 (MEM:MD). En paralelo se cultivaron las líneas celulares en medio MEM al 100 % como testigo. La incubación se llevó a cabo como se describió previamente.

2.4 Parámetros de crecimiento

Para determinar los tiempos de duplicación y el rendimiento celular en las mezclas MEM:MD y el medio testigo MEM, se sembraron 3.5 x 10⁴ células/ml en frascos de cultivo de poliestireno de 25 cm² y se incubaron a 37 °C con atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Cada 24 h, se determinó la densidad celular por triplicado: a cada frasco se retiró el medio de cultivo respectivo y se agregaron 2 ml de tripsina al 0.25 %, se incubaron por 10 min a 37 °C y se agregaron 4 ml del medio basal correspondiente. Las células se resuspendieron suavemente con una pipeta y se contaron utilizando una cámara de Newbauer.

2.5 Morfología de las células.

Se realizó un análisis al microscopio de luz con el objetivo de comparar la morfología de las células en las distintas mezclas de MEM:MD con respecto a las cultivadas en MEM. Los estándares morfológicos tomados en cuenta para el análisis fueron la forma del núcleo, aspecto del citoplasma, distribución de la cromatina, presencia de nucleolos y relación núcleo-citoplasma. Las células se cultivaron en MEM y en las distintas proporciones de MEM:MD sobre cubreobjetos de vidrio estériles depositados en microplacas de 6 pozos durante 72 h, hasta formar una monocapa confluyente. Los cultivos se lavaron 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se fijaron por 10 min con metanol absoluto. Posteriormente se lavaron con agua de la llave y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se tiñeron durante 30 min con colorante Giemsa, se retiró el colorante, se lavó con agua de la llave, y se montaron con resina en un portaobjetos para ser analizadas al microscopio de luz.

2.6 Criopreservación.

Cultivos confluentes de las diferentes líneas celulares cultivadas en las mezclas MEM:MD, así como en MEM, se lavaron con PBS. Las células se despegaron con tripsina al 0.25 %, y se resuspendieron con medio de cultivo completo (suplementado con suero y antibióticos). La suspensión celular se centrifugó a 200 Xg. El

sedimento celular se resuspendió en el medio de cultivo correspondiente, adicionado con 10 % de DMSO. La densidad celular se ajustó a 1×10^6 células/ml. Para su congelación, los cultivos se incubaron secuencialmente por 20 min a temperatura ambiente, 1 h a 4 °C, 2 h a -20 °C, toda la noche a -80 °C y finalmente se almacenaron en nitrógeno líquido. Después de 45 días se descongelaron las células y se determinó su viabilidad con azul tripano.

2.7 Ensayo de citotoxicidad

Se realizó un ensayo en microplacas de 96 pozos para evaluar la respuesta de las líneas celulares cultivadas en ambos medios de cultivo frente a un compuesto tóxico. Se seleccionó el HgCl₂ debido a que su toxicidad sobre líneas celulares es conocida y se tiene caracterizado en nuestro laboratorio (Carranza y col., 2005). Las células fueron tratadas con concentraciones variables de HgCl₂ (0, 10, 15, 20 μM), durante 6 h a 37 °C en atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Después se lavaron dos veces con solución salina balanceada de Hanks (SSBH), se agregó a cada pozo una mezcla de bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) 2 mg/ml y de metasulfato de fenazina (PMS) 3.3 mg/ml y se incubaron a 37 °C durante 75 min. Se lavaron las células con SSBH, se agregó alcohol isopropílico acidificado (HCl 0.04 M en isopropanol absoluto) y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se tomaron 200 μl del sobrenadante y se colocaron en una microplaca nueva. Se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 545 nm en un lector de microplacas (EIA multi-well reader, SIGMA Diagnostics).

2.8 Cuantificación de elementos esenciales y no esenciales

La determinación de la concentración de arsénico, cadmio, cobalto, hierro, mercurio, plomo y zinc se realizó utilizando la metodología NOM-117-SSA1-1994. Para el análisis de cobalto se empleó la metodología EPA-200.7. Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Servicios Clínicos y Análisis Toxicológicos, S.A. de C.V., con autorización (SS) TA-01-03 y número de acreditación A-038-003/03.

2.9 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba ANOVA de una sola vía con intervalo de confianza del 95 %. Para el análisis de los datos se utilizó el programa SPSS versión 11.0.

3. Resultados y Discusión.

Las tres líneas celulares estudiadas en este trabajo (OK, CHANG y LLCPK-1) se adaptaron satisfactoriamente al cultivo en las mezclas de MEM:MD de 50:50 y 25:75. Esto se determinó a través de la comparación de los parámetros de crecimiento a los tres días de cultivo y formación de monocapas confluentes. El tiempo de duplicación para las células OK, CHANG y LLCPK-1 cultivadas en el medio testigo fue de 9.84, 14.64 y 14.20 h respectivamente, mientras que para las mismas células cultivadas en la mezcla 50:50 (MEM:MD) fue de 10.20, 15.02, 14.52 h y en la mezcla 25:75 (MEM:MD) fue de 10.97, 15.44 y 14.78 h respectivamente; no se encontró diferencia significativa en ninguno de los casos ($p < 0.05$). En las mezclas 50:50 y 25:75 (MEM:MD), los cultivos no presentaron diferencias en la morfología con respecto a las crecidas en el medio testigo (Fig. 1 A-C, E-G, I-K). Lo anterior concuerda con lo reportado por Schlaeger y Schumpp, (1992) y Jan y col., (1994) sobre adaptación de diversas líneas celulares en medios de cultivo con diferentes hidrolizados de proteínas, tales como peptona y extracto de levadura. Por otra parte, el cultivo de las líneas celulares en la mezcla 5:95 MEM:MD produjo un crecimiento celular irregular no permitiendo realizar cinéticas de crecimiento, además de presentar alteraciones morfológicas tales como cambios en la relación núcleo-citoplasma, caracterizada principalmente por una disminución notable del contenido citoplásmico en las células OK y CHANG (Fig. 1 D y H respectivamente), y disminución general del tamaño celular en las células LLCPK-1 (Fig. 1 L) comparadas con células provenientes del medio testigo. Se observó además que los tres tipos celulares cultivados en la mezcla 5:95 MEM:MD mostraron mayor afinidad por el colorante. Los resultados obtenidos muestran que las mezclas 50:50 y 25:75 (MEM:MD) permiten el crecimiento de las tres líneas estudiadas.

Con la finalidad de analizar la capacidad de las células para soportar un proceso de criopreservación después de ser cultivadas en las mezclas de MEM:MD, se procedió a congelar las células. Después de 45 días de permanecer a -196 °C en nitrógeno líquido se determinó la viabilidad de las células con azul de tripano. Los porcentajes de viabilidad obtenidos para cada una de las mezclas de medio MEM:MD y para el medio MEM se pueden observar en la Tabla 1. Estos resultados muestran que las células cultivadas en las mezclas 50:50 y 25:75 (MEM:MD) soportan el proceso de congelación, ya que al ser descongeladas presentan porcentajes de viabilidad similares a los observados en el medio testigo y además mantienen su capacidad de crecimiento para formar monocapas confluentes con morfología normal. Estas características son deseables para la conservación de las líneas celulares a largo plazo.

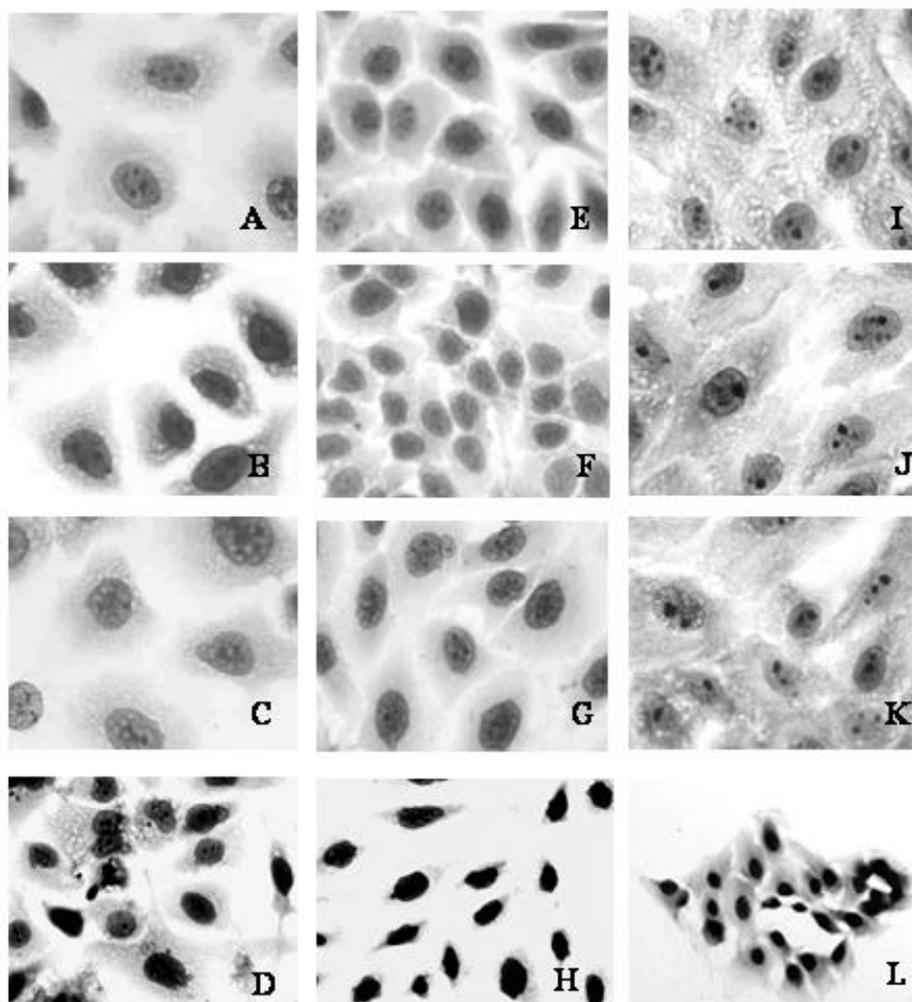


Fig. 1. Morfología de las células cultivadas en MEM y en las mezclas 50:50, 25:75 y 5:95 (MEM:MD). (A) Células OK en MEM, (B) Células OK en 50:50, (C) Células OK en 25:75, (D) Células OK en 5:95. (E) Células CHANG en MEM, (F) Células CHANG en 50:50, (G) Células CHANG en 25:75, (H) Células CHANG en 5:95. (I) Células LLCPK-1 en MEM, (J) Células LLCPK-1 en 50:50, (K) Células LLCPK-1 en 25:75, (L) Células LLCPK-1 en 5:95. Magnificación total 4000 X.

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad de las líneas celulares cultivadas en los distintos medios de cultivo, después de 45 días en estado de criopreservación.

Células/Medio	TESTIGO MEM/MD		
	MEM	50:50	27:75
OK	97	90	90
CHANG	95	91	92
LLCPK-1	92	85	80

Con el propósito de determinar la respuesta frente a un agente tóxico, las tres líneas celulares cultivadas en la mezcla 25:75 (MEM:MD) se incubaron 6 h con diferentes concentraciones de HgCl_2 y se compararon con las células tratadas en el

medio testigo. A nivel microscópico, se observó que las células cultivadas en la mezcla 25:75 MEM:MD fueron más susceptibles al daño inducido por HgCl_2 . En la Fig. 2 D-F se observa que los cultivos provenientes de esta mezcla e incubados con $15 \mu\text{M}$ de HgCl_2 presentan menos células comparados con los cultivos provenientes del medio testigo (Fig. 2 A-C). Sin embargo, los resultados cuantitativos obtenidos del ensayo de reducción de MTT muestran que no hay diferencia significativa ($p < 0.05$) en las tres líneas celulares con respecto al medio testigo (Fig. 3). La reducción de MTT se utiliza en ensayos de proliferación celular y de citotoxicidad. El anillo de tetrazolio de MTT es reducido a formazan por el sistema succinato-tetrazolio reductasa, que se encuentra activo solamente en células viables. Los cambios de absorbancia resultante se correlacionan directamente con actividad enzimática en células vivas y se considera un parámetro de viabilidad

(Mosmann, 1983). Por otra parte, se sabe que parte del mecanismo de toxicidad del mercurio se relaciona con la inducción de estrés oxidativo, debido a que favorece la formación de peróxido de hidrógeno y de radicales libres (Lund y col., 1993). La estimulación por HgCl_2 en la actividad celular medida por la reducción de MTT en los cultivos provenientes de la mezcla 25:75 (MEM:MD), se puede explicar considerando que las células se encontraban en estado de estrés y posiblemente hayan presentado una respuesta de alerta fisiológica para contrarrestar los efectos tóxicos de la intoxicación experimental con HgCl_2 . Es posible que el estado de estrés celular inducido por HgCl_2 fuera magnificado por la presencia de elementos tóxicos presentes en el MD.

Los resultados de este trabajo mostraron que las células se adaptaron satisfactoriamente hasta la mezcla 25:75 (MEM:MD), pero no a una mayor

proporción de MD en la mezcla. Se consideró que las fuentes nutritivas alternas (peptona de colágeno y extracto de levadura) posiblemente contenían elementos tóxicos que afectaron el crecimiento celular a medida que se aumentaba su concentración en el MD y se disminuía el porcentaje de medio testigo (MEM). Por lo anterior, se realizó la determinación de la presencia y concentración de metales en la peptona y extracto de levadura de grado industrial y se comparó con los mismos reactivos, pero de grado cultivo celular. Comparado con estos últimos, se encontraron concentraciones bajas de zinc y altas de plomo en el extracto de levadura grado industrial, mientras que la concentración de hierro fue alta tanto en la peptona de colágeno como en el extracto de levadura de grado industrial. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

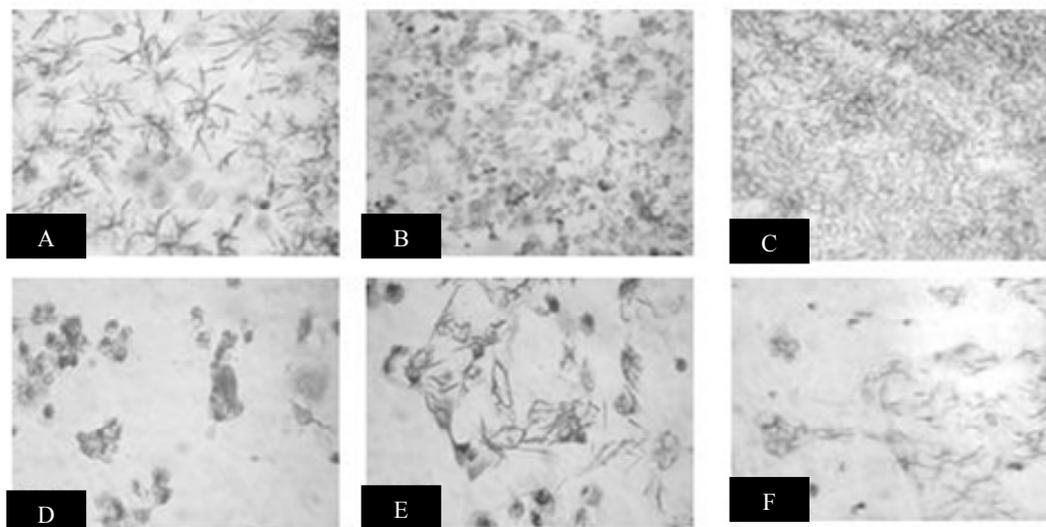


Fig. 2. Efecto citotóxico de $15 \mu\text{M}$ de HgCl_2 sobre las células cultivadas en MEM y en la mezcla 25:75 MEM:MD. (A) Células OK en MEM; (B) Células CHANG en MEM; (C) Células LLCPK-1 en MEM. (D) Células OK en la mezcla 25:75; (E) Células CHANG en la mezcla 25:75; (F) Células LLCPK-1 en la mezcla 25:75. Magnificación total 250 X.

Tabla 2. Metales presentes en la peptona de colágeno y extracto de levadura utilizados en la formulación del MD comparados con el medio testigo (MEM).

Metales (mg/Kg)	Peptona grado cultivo celular	Peptona grado industrial	Extracto de levadura grado cultivo celular	Extracto de levadura grado industrial
Arsénico	<0.010	<0.010	<0.010	<0.010
Cadmio	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Cobalto	<4.0	<4.0	<4.0	<4.0
Hierro	<1.2	138.0	30.5	56.5
Mercurio	<0.004	<0.004	<0.004	<0.004
Plomo	<0.4	<0.4	1.72	3.51
Zinc	<0.1	<0.1	2.35	1.08

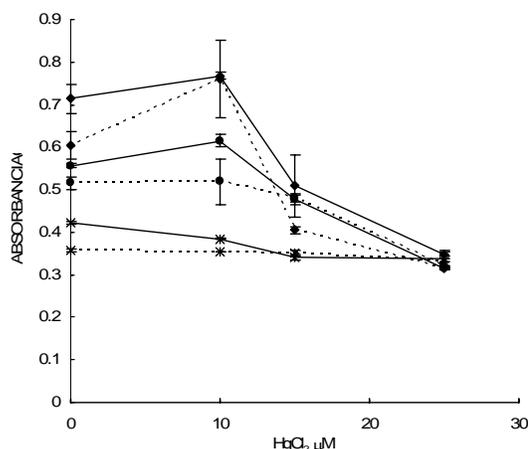


Fig. 3. Efecto del HgCl_2 sobre las líneas celulares OK, CHANG y LLCPK-1 propagadas en MEM y en la mezcla 25:75 (MEM:MD). \blacklozenge — OK MEM, \blacklozenge --- OK MEM:MD, —● CHANG MEM, ---● CHANG MEM:MD, *— LLCPK-1 MEM, *--- LLCPK-1 MEM:MD.

El zinc iónico está implicado en diversos procesos celulares, tanto como un cofactor de numerosas enzimas y como un factor regulador, por lo que es un elemento importante en el crecimiento de los cultivos celulares (Zhang y Robinson, 2005). El hierro es considerado un metal esencial en la actividad celular normal, sin embargo en exceso puede causar toxicidad en células hepáticas (Hughes, 1996). Se ha encontrado que el Fe^{++} libre inhibe la expresión de la ferroportina en la línea celular PC12 de ratas tratadas con factor de crecimiento nervioso (Yanming y col., 2005). Los resultados obtenidos también muestran que el extracto de levadura grado industrial contiene cantidades altas de plomo, un elemento no esencial y tóxico (Tchounwou y col., 2004). Fischer y Skreb (1980), realizaron estudios acerca de la toxicidad del plomo sobre distintas líneas celulares y encontraron que el efecto principal del plomo fue sobre la síntesis de DNA, lo que influyó directamente sobre la proliferación celular. Los resultados obtenidos hasta el momento apoyan la continuación de este estudio, utilizando fuentes de nitrógeno y vitaminas de mayor pureza para lograr un medio de cultivo equivalente al medio comercial (testigo).

Conclusiones

Las fuentes de nitrógeno y vitaminas utilizadas permitieron la adaptación de los cultivos celulares empleados hasta una mezcla 25:75, ya que la morfología y los parámetros de crecimiento fueron similares a los obtenidos con el medio testigo. El hecho de que no se haya logrado la adaptación en el 100 % de medio de cultivo propuesto (MD) de las tres líneas celulares puede ser debido a la alta

concentración de metales como plomo en el extracto de levadura, y hierro tanto en la peptona como en el extracto de levadura, así como la menor concentración de zinc en el extracto de levadura utilizados.

Agradecimientos

Este trabajo se efectuó con el apoyo financiero del CONACYT (beca de doctorado No. 170412 de G.E. Espinosa-Ayala), del CONACYT-SECTORIAL-SALUD 33B y de la UANL (PAYCIT-CA-83-04).

Referencias

- Burteau, C. C., Verhoeve, F. R., Mols, J. F., Ballez, J. S., Agathos, S. N. y Schneider, Y. J. (2003). Fortification of a protein-free cell culture medium with plant peptones improves cultivation and productivity of an interferon- γ producing CHO cell line. *Journal of In Vitro Cellular & Developmental Biology Animal* 39, 291-296.
- Carranza-Rosales, P., Said-Fernández, S., Sepúlveda-Saavedra, J., Cruz-Vega, D. E., y Gandolfi, A. J. (2005). Morphologic and functional alterations induced by low doses of mercuric chloride in the kidney OK cell line: ultrastructural evidence for an apoptotic mechanism of damage. *Toxicology* 210,111-121.
- Elias, S. (2002). Efecto de las condiciones operacionales de fermentación sobre la producción de *Paecilomyces fumosoroseus* cepa 612 en cultivo sumergido. *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Fischer, A. B. y Skreb, Y. (1980). Cytotoxicity of manganese for mammalian cells in vitro-comparisons with lead, mercury and cadmium. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene* 171, 525-37.
- Freshney, R. (2000). Cell culture media. En: *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Techniques* (4th ed). (Wiley-Liss, Inc.). Pp. 89 – 104. New York, USA.
- Hughes, W. (1996). The effects of environmentally hazardous substances on human health. En: *The Book of Essentials of Environmental Toxicology*, (Taylor & Francis), Pp. 133 – 136. Philadelphia USA.
- Iding, K., Buntmeyer, H., Gudermann, F., Deutschmann, S. M, Kionka, C. y Lehmann, J. (2000). An automatic system for the assessment of complex medium additives under cultivation conditions. *Biotechnology and Bioengineering* 6, 442 – 448.
- Jan, D. C., Jones, S. J., Emery, A. N., Al-Rubeai, M. (1994). Peptone, a low-cost growth-promoting

- nutrient for intensive animal cell culture. *Cytotechnology* 16, 17-26.
- Lund, B. O., Miller, D. M., Woods, J. S. (1993). Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress *in vivo* and *in vitro* in rat kidney mitochondria. *Biochemical Pharmacology* 45, 2017-24.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application on proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods* 65, 5-60.
- Pham, P. L., Perret, S., Cass, B., Carpentier, E., St-Laurent, G., Bisson, L., Kamen, A. y Durocher, Y. (2003). Large-scale transient transfection of serum-free suspension-growing HEK293/EBNA1 cells: peptones additives improve cell growth and transfection efficiency. *Biotechnology and Bioengineering* 84, 332 – 342.
- Pham, P., Perret, S., Cass, B., Carpentier, E., St-Laurent, G., Bisson, L., Kamen, A. y Durocher, Y. (2005). Transient gene expression in HEK293 cells: peptone addition posttransfection improves recombinant protein synthesis. *Biotechnology and Bioengineering* 90, 332- 344.
- Rivas, C. (1998). Diseño de un nuevo medio de cultivo para la producción de biomasa de *Nocardia brasiliensis* a escala piloto y la obtención de proteasas caseinolíticas. En: *Tesis Doctoral*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.
- Schlaeger, E. J., Schumpp, B. J. (1992). Propagation of a mouse myeloma cell line J558L producing human CD4 immunoglobulin G1. *Journal of Immunological Methods* 1, 111-20.
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Foxx, D. N., Ishaque, A. B. y Shen, E. (2004). Lead-induced cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* 255, 161 – 70.
- Yanming, C., Zhong – Ming, Q., Junrong, D., Xianglin, D., Yangzhong, Ch., Qin, W., Chenyuan, W., Yan, M., Youjia, X., Lianzhi, L. y Ya, K. (2005). Iron loading inhibits ferroportin 1 expression in PC12 cells. *Neurochemistry International* 47, 507-503.
- Zhang, J. y Robinson, D. (2005). Development of animal-free, protein-free and chemically-defined media for NS0 cell culture. *Cytotechnology* 48, 59–74.