

© 2025 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 28: 1-16, 2025.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2025.716>

Cultivo de células animales murinas y humanas: una perspectiva histórica

José Luis Ventura Gallegos¹, Eric Alejandro García López²,
José Alberto Cabrera Quintero¹, Lexie Pérez Huerta^{1,2},
Rocío Alcántara-Hernández⁴ y Alejandro Zentella-Dehesa^{1,2,3*}

¹Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM,

²Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, ³Red de Apoyo a la Investigación, Coordinación de la Investigación Científica, UNAM, ⁴Departamento de Biología Celular y Desarrollo, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. E-mail: *azentell@iibiomedicas.unam.mx

RESUMEN

El estudio y la modificación de las células animales y humanas, en condiciones controladas de laboratorio, ha convertido a los cultivos celulares en un modelo crucial para la investigación básica, biomédica y farmacéutica. En esta revisión se detalla el origen y el desarrollo de esta técnica, al abordar conceptos clave *como in vivo, ex vivo, in vitro e in silico* en el cultivo celular. Se presenta una reseña histórica sobre cómo se resolvieron los problemas de esterilidad, adhesión al sustrato y suplementos necesarios para la supervivencia y proliferación celular. Se destacan ejemplos de los cultivos celulares en los que se mencionan las funciones de la señalización y de la regulación génica. La primera etapa consistió en el cultivo de los fibroblastos murinos y el de las células tumorales en el líquido de ascitis, así como el establecimiento de las líneas celulares HeLa y MCF-7 para los estudios sobre cáncer de mama. Se discute la importancia del suero fetal bovino y cómo la transfección en células HEK293 facilitó la producción industrial de los anticuerpos terapéuticos. Finalmente, se describe la evolución de los medios de cultivo empleados actualmente.

Palabras clave: cultivo celular, células HeLa, fibroblastos, estudios *in vitro, in vivo, ex vivo e in silico*.

Murine and human animal cell culture: a historical perspective

ABSTRACT

The study and modification of animal and human cells under controlled laboratory conditions have made cell cultures a crucial model for basic, biomedical, and pharmaceutical research. This text details the origin and development of this technique, addressing key concepts such as *in vivo, ex vivo, in vitro* and *in silico* in the context of cell culture. A historical review is provided on how problems such as sterility, substrate adhesion, and the supplements necessary for cell survival and proliferation were resolved. Initial examples stand out where cell cultures allowed us to investigate phenomena such as signaling and gene regulation. The first stage included culturing murine fibroblasts and tumor cells in ascites fluid, as well as establishing HeLa and MCF-7 cells for breast cancer studies. The importance of fetal bovine serum and how transfection into HEK293 cells facilitated the industrial production of therapeutic antibodies is discussed. Finally, the evolution of the culture media currently used is described.

Keywords: cell culture, HeLa cells, fibroblasts, *in vitro, in vivo, ex vivo* and *in silico* studies.

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los avances en biología, fisiología y medicina se apoyan en forma directa o indirecta en el conocimiento sobre la estructura y función de los más de 200 diferentes tipos de células que permiten que nuestro cuerpo crezca, madure y realice todas sus funciones. El estudio y el desarrollo de la bioquímica, la biología molecular, la biología celular, la epigenética y el estudio de las células troncales es el resultado en gran medida de la habilidad humana para observar y analizar la estructura y función de las células aisladas o formando tejidos e incluso dentro de los órganos bajo cultivo fuera de un organismo (*ex vivo*) así como en condiciones artificiales (*in vitro*), (Fina, Lombarte & Rigalli, 2013).

Se conocen las características de las células troncales totipotentes, como el cigoto, del que derivan todos los tipos diferenciados del cuerpo humano, en contraste con las células terminalmente diferenciadas como los hepatocitos, las neuronas, los linfocitos B productores de anticuerpos, los adipocitos, las neuronas o los conos y bastones de la retina. Los conceptos de reprogramación epigenética y plasticidad o los avances en la farmacología moderna no se conocerían sin el modelo de células en cultivo (Kanda, Sasaki, Masuzaki, Matsumoto, Ogawa & Moriyama, 2020; Pilipovi, Hrka, Ku & Pel, 2023; Tan, Liu & Polo, 2024).

Sin duda, la gran contribución de estos sistemas es el desarrollo de fármacos que corrigen el funcionamiento de las células y los tejidos, por ejemplo: **i**) los antagonistas del receptor de angiotensina que ayudan a controlar la hipertensión, **ii**) la metformina que actúa sobre las células hepáticas, musculares y adipocitos al normalizar la respuesta a la insulina en el paciente con síndrome metabólico, **iii**) las estatinas que inhiben la síntesis de ácidos grasos y colesterol en los pacientes con riesgo de infarto y **iv**) los antagonistas del receptor de estrógenos en pacientes con cáncer de mama dependiente de hormonas (Lahera, Vázquez-Pérez, de las Heras, Cediell, Navarro-Cid & Cachafeiro, 2000; Fulgencio, Kohl, Girard & PeÁgorier, 2001; Ikeda & Kato, 2007; Wang, Simpkins, Dykens & Cammarata, 2003).

El desarrollo de modelos tridimensionales a partir de un cultivo celular (cultivos en 3D) en forma de onco-esferas o de esferoides y la formación de organoides ha revelado notables diferencias con respecto a los cultivos en monocapa denominados cultivos en 2D (Duval *et al.*, 2017). El estudio de los sistemas de cultivo en 3D muestra que las células que crecen *in vitro* dentro de estas estructuras tridimensionales se acercan más al comportamiento de las células de los tejidos dentro del animal íntegro por lo que constituyen una nueva variante del cultivo celular (Ravi, Paramesh, Kaviya, Anuradha & Solomon, 2015).

NUEVOS CAMPOS: LA INGENIERÍA DE TEJIDOS Y LA MEDICINA REGENERATIVA

El descubrimiento de que las células diferenciadas se inducen y adquieren un fenotipo troncal para dar lugar a las mismas células pero de distinta estirpe dio origen a la ingeniería de tejidos que busca recrear los tejidos dañados como a las células beta pancreáticas en pacientes con diabetes tipo-1 o a los hepatocitos de un paciente que ha padecido infecciones virales o el implante de un hueso generado *in vitro* (Ohnuki & Takahashi, 2015).

En resumen, actualmente el cultivo primario de células, de líneas celulares en 2 y en 3D es una técnica totalmente estandarizada con diversidad de aplicaciones en el campo de las ciencias biomédicas (Segeritz & Vallier, 2017; Freshney, 2010; Cacciamali, Villa & Dotti, 2022).

En esta revisión se presenta una breve visión histórica de los modelos celulares que sirvieron para desarrollar y estandarizar la técnica moderna del cultivo celular. Se exponen brevemente algunos ejemplos relevantes de este desarrollo.

IN VIVO VERSUS EX VIVO

Los estudios en un organismo íntegro como en los roedores o en humanos se le denomina "*in vivo*" o sea dentro de un organismo vivo. Las condiciones experimentales que permitieron mantener las funciones vitales fuera del organismo dieron origen a los estudios "*ex vivo*". Ejemplos de esto son los modelos de órganos aislados y perfundidos a través de sus arterias o venas con soluciones salinas isotónicas glucosadas. Algunos de los más utilizados han sido el corazón, el hígado e incluso los anillos de la aorta. Estos modelos han servido para estudiar: los daños asociados a la isquemia y reperfusión (Watanabe & Okada, 2018), la utilización y el metabolismo de una diversidad de compuestos y fármacos (Estrada-Soto *et al.*, 2022), la gluconeogénesis y el metabolismo de fármacos (Hems, Ross, Berry & Krebs, 1966; García-Sáinz & Macías-Silva, 1990; Bounakta, Bteich, Mantha, Poulin & Haddad, 2018).

El primer experimento de un sistema de corazón perfundido fue en una rana y realizado por los médicos Carl Ludwig y Elias Cyon en 1866, posterior a este fue la perfusión del corazón de un mamífero en 1895 realizada por Langerdorff (Langendorff, 1895; Watanabe & Okada, 2018). El sistema de corazón perfundido de rata quedó plenamente establecido en la década de 1960 por Howard E. Morgan y James R. Neely (Zimmer, 1998). Por su parte, la primera preparación de hígado perfundido de rata fue reportada por Claude Bernard, en 1855 (Bessems *et al.*, 2006; Gores, Kost & Larusso, 1986; Guillouzo, 1998). Este modelo experimental contribuyó a completar el panorama del metabolismo hepático a través de otro tipo de preparaciones como los cortes histológicos de hígado realizados en un microtomo y cuyo resultado son finas

laminillas de tejido que se colocan en un portaobjetos para ver al microscopio (Worboys, Bradbury & Houston, 1995) técnica aplicada favorablemente en estudios de farmacología. Finalmente, un paso natural fue el de introducir enzimas como las colagenasas tipo IV a la solución de perfusión para degradar la matriz extracelular de los sinusoides del hígado y liberar a los hepatocitos primarios con el fin de estudiarlos en suspensión (Berry & Friend, 1969; García-Sáinz, Hernández-Sotomayor & Macías-Silva, 1990; Marín-Hernández *et al.*, 2020). Una vez obtenida la suspensión con los hepatocitos primarios y la matriz extracelular degradada se dieron las condiciones para generar cultivos en monocapa capaces de retener su estado diferenciado e incluso propiciar su proliferación *in vitro* (Mitaka, 1998). En la última década, son numerosos los esfuerzos por promover un fenotipo troncal que permita la expansión proliferativa de los cultivos primarios de hepatocitos humanos con fines de experimentación para valorar la re-implantación celular después de un daño hepático severo (Zhang *et al.*, 2018).

IN VITRO E IN SILICO

La capacidad para aislar a las células individuales de un tejido, mantenerlas con vida y que proliferen en un estado diferenciado bajo condiciones artificiales constituye el principio del cultivo celular. Por ejemplo, los primeros estudios de tejidos y células aisladas se realizaron en portaobjetos cóncavos de vidrio cubiertos con un vidrio delgado o cubreobjetos, este tipo de estudios se describen como estudios “en vidrio” o su equivalente en latín “*in vitro*”. Por extensión, los estudios teóricos o simulaciones de experimentos generados por modelos matemáticos en ordenadores reciben el nombre de estudios “*in silico*” (Pappalardo, Russo, Tshinanu & Viceconti, 2019).

Si bien los estudios “*ex vivo*” e “*in vitro*” han permitido grandes avances en la comprensión de la fisiología celular y en la farmacología es importante resaltar que bajo estas condiciones se pierde el efecto regulador de los sistemas de integración del organismo, como el sistema nervioso central y el periférico, los sistemas endocrinos y la información que fluye a través del sistema circulatorio, así como la información presente en el microambiente tisular (metabolitos, hormonas, citocinas y exosomas), (Aoki, Takezawa, Sugihara & Toda, 2016). Hoy en día se han hecho grandes avances en la recreación de las interacciones en el ámbito del microambiente tisular por medio de cultivos en 3 dimensiones como los organoides y los cultivos microscópicos en “chips” acoplados a sistemas microfluídicos, una metodología que permite el movimiento de pequeñas cantidades de líquidos a través de canales muy estrechos de solo decenas a cientos de micrómetros de ancho y que cubren células u organoides colocados en un “chip”, una pequeña pieza de material semiconductor que contiene circuitos integrados con los que se realizan funciones en computadoras y dispositivos electrónicos (Leung *et al.*, 2022).

ESTERILIDAD, MATRIZ Y FACTORES DE SUPERVIVENCIA

Entre los primeros antecedentes de un cultivo celular destacan los estudios del embriólogo Ross Granville Harrison, profesor de anatomía comparada de la Universidad de Yale. En 1907, Granville reportó el mantenimiento de fragmentos de la cresta neural de una rana embebidos en linfa coagulada. El sistema se generó al disecar los tejidos embrionarios en condiciones de esterilización mantenida por medio de la flama procedente de mecheros Bunsen y de material quirúrgico básico de aprehensión, diéresis o corte y de separación, además de usar un portaobjetos horadado y un cubreobjetos, ambos esterilizados para recibir el tejido y la linfa. El portaobjetos se cubría con el cubreobjetos y los bordes se sellaban con cera derretida. Si la esterilización era óptima la preparación podía permanecer sin alteración hasta por una semana. Además, Granville observó y describió los cambios morfológicos presentes durante varios días y que dieron lugar al crecimiento de las fibras nerviosas como indicativo de que las células estaban vivas (Flotte, 2008). Este modelo de tejido *ex vivo* permitió estudiar por primera vez el desarrollo y extensión de las fibras nerviosas cuyo movimiento es amiboideo. Con el mismo método también se estudiaron los tubos neurales completos, lo que abrió la posibilidad de hacerlo con otros órganos, tejidos y células *in vitro*. Sin embargo, en estos estudios nunca se observaron signos de proliferación celular (Harrison, 1907). A pesar de esta limitación, es importante reconocer que los resultados de Granville mostraron, por vez primera que: **i)** es posible mantener células vivas bajo condiciones *ex vivo* capaces de mostrar comportamientos complejos, **ii)** estos sistemas biológicos permanecen viables y funcionales por periodos extendidos de hasta una semana, **iii)** el ambiente en que se encuentran las células es determinante para la viabilidad *in vitro* y **iv)** la linfa coagulada así como los componentes disueltos en ella poseen los nutrientes y factores necesarios para mantener la vida y el estado diferenciado de las células. Al adoptar los mismos principios de Granville; Montrose T. Burrows embebió, fragmentos de un embrión de pollo de 60 horas de desarrollo, en suero coagulado de pollo. Esta preparación se incluyó en plasma dentro de un portaobjetos cóncavo, se cubrió con un vidrio esterilizado y se sellaron los bordes. La preparación se incubó a 39 °C, lo que promovió la coagulación del suero y creó una matriz proteica alrededor del explante embrionario (Burrows, Burns & Suzuki, 2017). En su reporte de 1910 (Burrows, 1910) describe que: **i)** dentro de las primeras 12 horas hay migración de células del tejido conectivo seguida de una proliferación sostenida hasta, por 14 días y documentada a través de la identificación de figuras mitóticas, **ii)** comparativamente, las células de los tejidos muscular y cardíaco presentan una proliferación modesta. Este fue el primer sistema que permitió mantener la proliferación de las células *in vitro* como una evidencia de la importancia de los factores de supervivencia y de proliferación presentes en el suero autólogo, además de

que estos factores actúan diferencialmente en las células de distintas estirpes como las de los fibroblastos mesenquimales y las de los cardiomiocitos (Burrows *et al.*, 2017). De aquí en adelante el uso de los extractos embrionarios y del suero de placenta son una constante, pero el más común es el suero fetal bovino (SFB), aunque también los sueros de ternera y caballo. La contaminación en los cultivos celulares fue un tema importante en donde la práctica del cultivo de las células HeLa fue determinante (Lucey, Nelson-Rees & Hutchins, 2009).

MUTAGÉNESIS DE LOS FIBROBLASTOS MURINOS Y CULTIVO DE LOS FIBROBLASTOS DE HISTÓRICO USO PERMANENTE

En 1940, el grupo del Dr. Wilton R. Earle estableció un sistema de cultivo continuo de fibroblastos derivados del tejido subcutáneo y del tejido adiposo de ratones de la cepa C3H. Los cultivos fueron tratados por varias generaciones con metilcolantreno, un agente que al ser metabolizado por miembros de la familia de las enzimas P450 se convierte en un epóxido que actúa como alquilante de las bases nitrogenadas, principalmente del grupo amino de la guanina. De estos cultivos en mantenimiento por más de 400 días se obtuvieron las células con fenotipo de fibroblastos de histórico uso permanente *in vitro* de la serie “L” y a partir de ellas fue que se estableció la primera clona *in vitro*: las células L929 (Sanford, Earle & Likely, 1948).

CÉLULAS DE TUMOR DE UN ESTUDIO, DE EHRLICH Y EL “EFECTO WARBURG”

Un ejemplo notable de los avances logrados al poder cultivar las células y describir sus características bioquímicas y capacidad proliferativa es la descripción del “Efecto Warburg”. En 1956, Otto Warburg, un bioquímico alemán escribe: “Nuestro principal modelo experimental para la medición del metabolismo del cáncer hoy ya no es el tumor sino las células tumorales del líquido de ascitis”. Al medir el consumo de glucosa y su metabolismo se encontró que las células tumorales metabolizan la glucosa a lactato en forma semejante a las levaduras y con escasa producción de dióxido de carbono (CO₂), aun con una elevada presión parcial de oxígeno (O₂). En contraste, las células normales en presencia de oxígeno favorecen la conversión de glucosa a CO₂ y H₂O. A esta paradoja se le denominó el “Efecto Warburg”, descrito en un cultivo de células tumorales del carcinoma murino de Ehrlich, cáncer que surge en el tejido epitelial de la piel o en el revestimiento de órganos internos como el adenocarcinoma mamario espontáneo en ratones hembra, trasplantado por primera vez por Paul Ehrlich, las células crecen en suspensión en el líquido de ascitis dentro de la cavidad peritoneal (Barros, Ruminot, San Martín, Lerchundi, Fernández-Moncada & Baeza-Lehnert, 2021). En 1905, Ehrlich y Apolant estudiaron los tumores murinos que aparecían en forma espontánea. Situación que los llevó a realizar el trasplante subcutáneo del tumor de un ratón a otro y que dio origen al carcinoma murino, llamado de Ehrlich (Figura 1), (Ehrlich, 1891a & 1891b). A partir de 1930,

aparecieron tumores que al diseminarse formaban múltiples masas peritoneales. En algunos casos se acumulaba líquido de ascitis con células cancerosas en suspensión (Ehrlich & Apolant, 1905). El modelo se reportó originalmente en 1932 (Loewenthal & Jahn, 1932), sin embargo, es hasta 1952 cuando se describe con detalle un sistema de cultivo experimental *in vitro* para estas células (descrito por Klein, 1956).

CÉLULAS TUMORALES EN EL LÍQUIDO DE ASCITIS Y EL CULTIVO CELULAR

La diseminación de algunos tumores conduce a la invasión de los fluidos de la cavidad peritoneal (líquido de ascitis maligno) o a los fluidos de la cavidad pleural que rodea a los pulmones (derrame pleural maligno), (Hou & Sanyal, 2009; Yalcin, Choong & Eizenberg, 2013).

El hecho de que las células del carcinoma murino de Ehrlich crecieran en suspensión dentro de la cavidad peritoneal de los animales experimentales permitió colectarlas y realizar cultivos *in vitro* bajo condiciones de esterilización controladas. Se demostró que su proliferación tiene dependencia a la glucosa y que son capaces de incorporar aminoácidos marcados a las proteínas, por ejemplo, la glicina-C₁₄ se empleó como un indicador de la capacidad anabólica celular. Estas primeras observaciones ayudaron a establecer los primeros medios de cultivo, en el entendido de que el anabolismo y la proliferación son dependientes de fuentes de energía, de carbono y de nitrógeno (glucosa y glutamina) así como de otros parámetros como: la temperatura, un pH neutro estable, y de la presencia de oxígeno (95% O₂ y 5% CO₂), (Fraser, 1960). Otro hallazgo relevante ocurrió cuando se observó que el medio de crecimiento que contenía el líquido de ascitis del propio tumor conducía a mejores tasas de crecimiento que el suero del mismo animal experimental o que el líquido de otro animal con ascitis maligna. Más aún, el suero de otros animales como el de un ratón, una rata, un cuyo y un bovino también mostró la capacidad de mantener elevadas tasas de proliferación (Mather, 1998). Antecedentes que sentaron las bases para el uso del suero fetal bovino como suplemento estándar para mantener la viabilidad y la proliferación sostenidas (Figura 1). En 1955, el medio de cultivo estándar para estas células contenía: entre 2 y 10% de suero de caballo, de 5 a 20 mM de glucosa y de 2 a 10 mM de glutamina (Puck, Cieciora & Robinson, 1958). Estos componentes estaban disueltos o suspendidos en una solución salina isotónica (NaCl 112 mM, KCl 4.5 mM, NaH₂PO₄·H₂O 1.2 mM, MgSO₄·7H₂O 1.2 mM, CaCl₂ 2.5 mM y NaHCO₃ 26 mM) con un pH de 7.4 y una atmósfera controlada saturada de agua, 95% de O₂, 5% de CO₂ y la temperatura de 37 °C.

CÉLULAS HELa EL PRIMER CULTIVO PRIMARIO DE UN TUMOR HUMANO

El cultivo celular moderno inició con el Dr. George Otto Gey, médico, biólogo celular y académico asociado al Hospital Johns Hopkins en Baltimore. El grupo del Dr. Gey logró

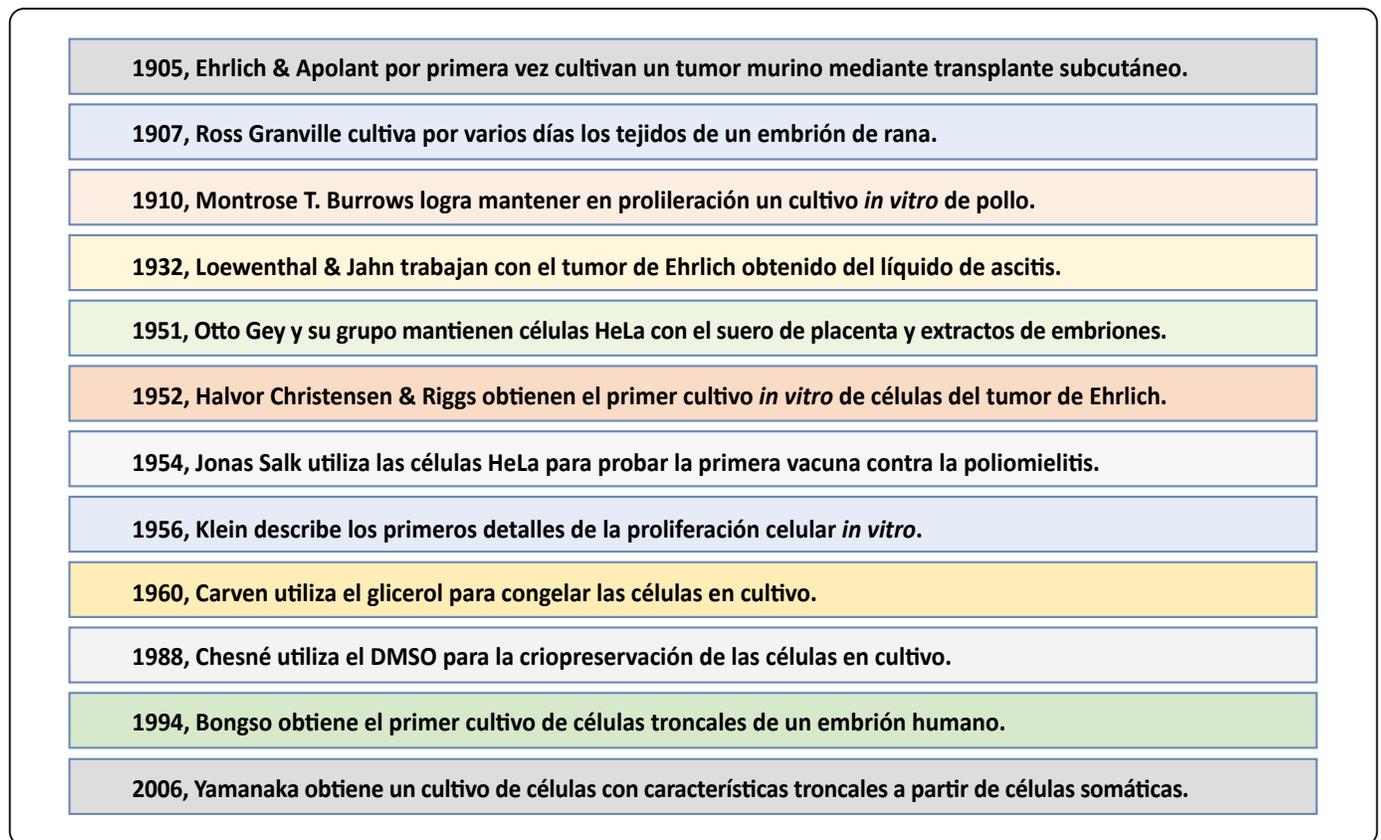


Figura 1. Se muestra la línea del tiempo con algunos de los eventos más relevantes en el desarrollo del cultivo celular entre el año de 1905, cuando se realizó por primera vez un cultivo celular proveniente de tumores del líquido de ascitis y del año 2006 en el que se obtuvo un cultivo de células con características troncales a partir de las células somáticas (reprogramación). Esta figura fue elaborada por los autores.

establecer el primer cultivo primario de células de cáncer cérvico uterino el 8 de febrero de 1951 (Scherer, Syverton & Gey, 1953). El tejido tumoral se obtuvo de la biopsia de una paciente de 31 años, negra, llamada Henrietta Lacks con diagnóstico de adenocarcinoma cérvico uterino. El grupo del Dr. Gey había intentado establecer cultivos primarios de cáncer por varios meses sin ningún éxito. Para ello, habían desarrollado un medio de cultivo basado en una solución salina isotónica propuesta originalmente por Ringer (NaCl 133 mM, KCl 1.34 mM, CaCl₂·2H₂O 1.25 mM y NaHCO₃ 2.76 mM). Además, el medio empleado para establecer las células HeLa contenía: Na₂HPO₄·2H₂O, MgCl₂·6H₂O, KH₂PO₄ y MgSO₄·7H₂O. Adicionalmente, el medio de cultivo celular de Gey estaba suplementado con glucosa como fuente de energía, extracto embrionario de bovino y suero de placenta humana como fuente de factores de supervivencia y proliferación (Scherer *et al.*, 1953).

Las biopsias tumorales obtenidas de las pacientes eran incubadas en un sistema de botellas que rodaban sobre un mecanismo de rodillos giratorios. Fue este mismo medio de cultivo rotatorio en el que crecieron las células HeLa, y el

origen histórico de la primera línea celular de cáncer humano (Figura 1), (Scherer *et al.*, 1953).

LAS CÉLULAS HELa Y LA VACUNA CONTRA LA POLIOMIELITIS

Uno de los primeros grandes desarrollos biotecnológicos fue la valoración de la efectividad, la seguridad y la aplicación masiva de la primera vacuna contra el virus causante de la poliomielitis, en 1954. Esta enfermedad es causada por el poliovirus, un RNA-virus del género *Enterovirus* del que existen 3 serotipos. El ciclo de infección es por vía fecal-oral y se presenta en forma estacional durante los meses de verano. En la década de 1950, Franklin Delano Roosevelt, presidente de los Estados Unidos de América, se embarcó en una campaña contra la poliomielitis a través de la Fundación Nacional contra la Parálisis Infantil (NFIP, por sus siglas en inglés). Con apoyo de esta fundación el médico y virólogo Jonas Salk desarrolló una vacuna basada en un virus inactivo, sin embargo, para su aplicación a nivel poblacional era necesario probar su eficacia y seguridad en un esquema que requería de 600,000 niños vacunados con la vacuna o placebo y 1 millón de niños como grupo testigo (Meldrum, 1998). La eficacia fue valorada con la

sangre de los niños vacunados e incubada con el virus activo, de haber anticuerpos neutralizantes contra el virus en el suero de los niños vacunados, el virus perdería su efectividad en un ensayo *in vitro* al emplear células susceptibles a la infección. La prueba requería de 300,000 ensayos con células en cultivo. Las células del simio macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) que se empleaban en ese momento tenían un costo que estaba fuera del presupuesto de la NFIP (Turner, 2012). El virólogo William Franklin Scherer de la universidad de Minnesota, responsable del sistema de cultivo de células HeLa creado por Gey, entrenó al bacteriólogo Russel W. Brown y al fisiólogo vegetal James Henderson, científicos afroamericanos del Instituto Tuskegee, para diseñar, establecer y operar instalaciones masivas de ese cultivo. Así, se generaron 10,000 frascos con suficientes células HeLa que fueron subcultivadas en otros laboratorios participantes, dispersos en todo Estados Unidos. Alcanzar esta meta de producción permitió analizar el suero de más de 300,000 niños participantes (Ramírez, 2021). En 1954, se iniciaron las pruebas con 420,000 niños vacunados y con 200,000 niños inyectados con placebo, el estudio incluyó 1.2 millones de niños como grupo testigo del estudio. Este esfuerzo masivo permitió demostrar la eficacia y la seguridad de la vacuna que posteriormente fue aplicada a toda la población infantil de los Estados Unidos de América (Figura 1). Esta línea celular ha sido empleada en una gran diversidad de estudios que van más allá del cáncer cérvico uterino.

La Figura 2 obtenida en la siguiente liga: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=hela+cells+&sort=pubdate> muestra un histograma del número total de trabajos publicados en los que se menciona a las células HeLa desde su establecimiento hasta la fecha, como índice de su utilidad.

EL ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS Y LAS PRIMERAS LÍNEAS CELULARES

Todos estos avances permitieron establecer las condiciones para el cultivo de fibroblastos embrionarios murinos de donde emergieron en forma espontánea clonas de las primeras células históricas por su origen. Esta aproximación dio lugar a una gran variedad de líneas celulares que se usan como modelos experimentales de estudio tanto de los órganos completos o de enfermedades como el cáncer (Tabla I), (Shengqiang, Yu, Jiang, Wan, Wu, Gao & Liu, 2017).

Las líneas celulares derivadas de los fibroblastos murinos han servido para diversos propósitos, por ejemplo, si bien todas las células presentan receptores al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) las células L929 mueren por apoptosis y por tanto se han empleado para demostrar la presencia de TNF- α biológicamente activo (Gómez, Mendoza-Milla, Ibarra-Sánchez, Ventura-Gallegos & Zentella, 1996; Shiau, Chiou, Lee, Kuo & Chang, 2001). Otro ejemplo, son las células 3T3-L1 que se diferencian en adipocitos y son útiles en el estudio de los procesos de diferenciación dependientes de los factores

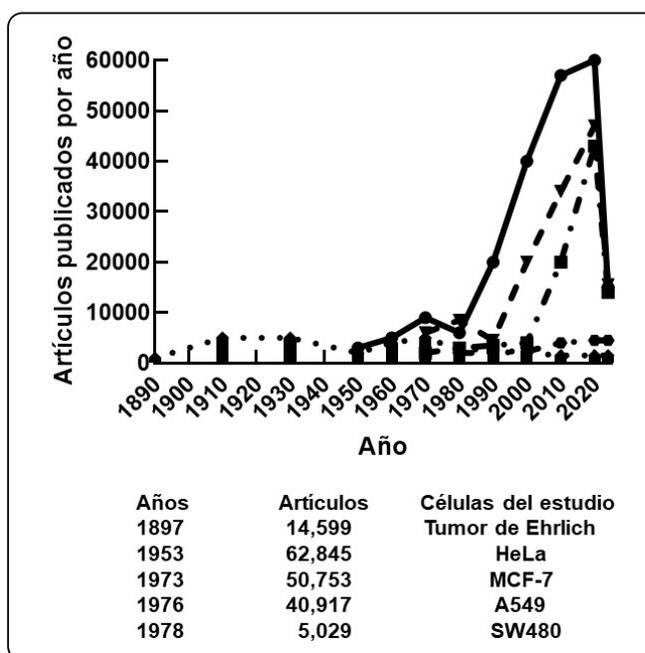


Figura 2. Comparación del número de publicaciones internacionales registradas en la base de datos de PubMed, de los años de 1905 a 2020 en las que se emplearon los cultivos celulares con: células del tumor de Ehrlich (carcinoma murino), HeLa (cáncer cérvico-uterino humano), MCF-7 (cáncer de mama dependiente de estrógenos humano), A549 (cáncer de pulmón de células no pequeñas de un humano) y SW480 (cáncer colorrectal humano) (Ehrlich & Apolant, 1905; Soule *et al.*, 1973; Halper & Moses, 1983). Se observa el máximo de artículos en la década de los años 2000 a 2010. Esta figura fue elaborada por los autores con los datos de las gráficas que se pueden consultar en las siguientes direcciones: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Ehrlich+tumor+cells> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=Hela+cells> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=MCF-7+cells> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=A549+cells> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=SW480+cells>

de transcripción PPAR-gama y C/EBP (Gabrielli, Martini, Brandani, Iustman & Romero, 2014; Nakata, Nagasaka, Kusaka, Matsuoka, Ishibashi & Yada, 2006). Por otro lado, las células C2C12 son un valioso modelo en la identificación de los factores de transcripción determinantes en la diferenciación muscular como la miogenina (Rajan *et al.*, 2012; Adhikari, Kim & Davie, 2021) y en la identificación de miokinas liberadas cuando las células musculares se contraen (Furuichi, Manabe, Takagi, Aoki & Fujii, 2018).

LÍNEA CELULAR MCF-7: UN MODELO PARA CÁNCER DE MAMA DEPENDIENTE DE LOS ESTRÓGENOS

Además del cáncer cérvico-uterino, el cáncer de mama pasó a ser la principal causa de muerte en las mujeres. Sin embargo, gracias a los avances logrados con las células HeLa fue posible publicar las líneas celulares de este cáncer a partir de las biopsias de pacientes con la enfermedad. Lo que condujo

Tabla I. Primeras líneas celulares inmortalizadas o tumorales de origen murino y canino, empleadas para expresar proteínas recombinantes y tumorales humanas. Se indica el nombre de la línea celular, origen, medio de cultivo (DMEM: Dulbecco’s Modified Media; MEM: Minimum Essential Media, EMEM: Medio Eagle Minimum Essencial, Leibovitz’sL-15 y Ham’s F12) y suero recomendado por la American Type Culture Collection o ATCC, por sus siglas en inglés, de los Estados Unidos (<https://www.atcc.org>). La Tabla fue elaborada por los autores.

Línea Celular	Origen	Medio recomendado	Suero recomendado
NIH-3T3	Fibroblastos embrionarios murinos	MEM DMEM	Tenera
L929	Fibroblastos embrionarios murinos	MEM DMEM	Tenera
3T3-L1	Fibroblastos embrionarios murinos	DMEM	Fetal bovino
C2C12	Mioblasto murino	DMEM	Fetal bovino
B16-F10	Melanoma murino	DMEM	Fetal bovino
MDCK	Epitelio renal canino	DMEM DMEM/F12	Fetal bovino
CHO	Células del ovario de un hámster chino	MEM Ham’s F12	Tenera
COS-1	Epitelio del riñón de un mono de cola verde	DMEM	Fetal bovino
HEK293T	Epitelio del riñón embrionario	DMEM	Fetal bovino
HeLa	Cáncer cérvico uterino humano	MEM	Tenera
MCF-7	Cáncer de mama	EMEM	Fetal bovino
HepG2	Cáncer hepático humano	MEM	Fetal bovino
A549	Cáncer de pulmón humano de células no pequeñas	MEM	Fetal bovino
SW-480	Cáncer colorrectal humano	Leibovitz’sL-15	Fetal bovino

al descubrimiento de las células MCF-7 producto del derrame pleural de una paciente de 69 años con cáncer de mama luminal A. Esta línea celular fue un hallazgo, en 1973, por el grupo del Dr. Soule en la Fundación para el cáncer ubicada en Michigan (Soule, Vazquez, Long & Brennan, 1973) y usada extensamente como un modelo para el estudio de la biología del cáncer, así como para la valoración de múltiples tratamientos contra este padecimiento. Actualmente existen más de 50 líneas celulares humanas de esta afección. En el principal repositorio de células, en los Estados Unidos de América, la ATCC (American Type Culture Collection) cuenta con un panel de 43 líneas celulares, la Tabla II muestra 7 de ellas que son las más empleadas en la investigación biomédica.

Otras líneas celulares derivadas de pacientes con diferentes tipos de cáncer han servido también de modelo para el estudio de la biología de estas enfermedades y para estudios farmacológicos (Pernik *et al.*, 2021).

En la Figura 2 se muestra el resultado de la consulta, en la base de datos de PubMed (portal gratuito de la National Library of Medicine) las publicaciones en las que se mencionan 5 líneas celulares de cáncer humano desde su establecimiento como

cultivo celular. Las curvas muestran como el cultivo de estas células aumentó masivamente entre 1970 y 2015.

LÍNEAS CELULARES, BIOLOGÍA MOLECULAR Y TRANSFECCIÓN

Una herramienta determinante en la biología molecular es la transfección que permite introducir construcciones moleculares de los ácidos nucleicos a las células eucariontes para la expresión de proteínas o RNAs ajenos a la célula receptora (Chong, Yeap & Ho, 2021; Stepanenko & Heng, 2017; Wolff & Lederberg, 1994). El descubrimiento de la transformación bacteriana mostró que existen mecanismos para introducir el DNA al interior de una bacteria receptora y que este ácido nucleico puede incorporarse al genoma bacteriano o permanecer en el citoplasma en forma de episoma (Johnston, Martin, Fichant, Polard & Claverys, 2014). Esto motivó el intento de introducir el DNA a las células eucariontes. Inicialmente se demostró que el RNA del virus de la poliomielitis aislado con una mezcla de fenol y cloroformo podía introducirse a las células y promover la formación de placas de lisis (Alexander, Koch, Mountain, Sprunt & Van Damme, 1958). El descubrimiento de las enzimas de restricción, fosfatasas y ligasas permitió primero modificar y luego “construir” vectores para la transfección basados

Tabla II. Ejemplo de líneas celulares de cáncer de mama de pacientes y una línea celular epitelial no tumoral. L: luminal positiva para receptor de estrógenos y de progesterona; H: Her2 positiva para el receptor tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico; TN: triple negativo; MC: metástasis cerebral; IM: inmortalizada pero no tumoral. La Tabla fue elaborada por los autores.

Línea celular	Origen de la línea celular de pacientes con cáncer o normales
BT474 (H)	Carcinoma ductal sólido de una paciente con cáncer de mama invasivo
HCC1419 (H)	Carcinoma ductal invasivo de una paciente hispana de 42 años con cáncer de mama estadio IIIA grado 3.
HCC1954 (H)	Carcinoma ductal invasivo aislado de una paciente con cáncer de mama estadio IIA grado 3 sin metástasis a nódulos
MCF-7 (L)	Adenocarcinoma aislado de una paciente con cáncer de mama
MCF-10F (IM)	Línea celular epitelial no tumoral
MDA-MB-231 (TN)	Obtenida de líquido pleural de una paciente caucásica con cáncer de mama
MDA-MB-361 (MC)	Adenocarcinoma-metastásico de una paciente de 40 años con cáncer de mama

en los plásmidos bacterianos lo que originó el concepto de “ingeniería molecular”. El desarrollo de esta tecnología llevó a proponer estrategias de “terapia génica”, donde el ácido nucleico introducido podía sustituir al DNA de la célula receptora y corregir un error.

LA TRANSFECCIÓN CON ÁCIDOS NUCLEICOS CO-PRECIPITADOS CON FOSFATO DE CALCIO

Los ácidos nucleicos virales de SV40 o poliovirus e incluso el DNA tumoral al ser co-precipitados con sales poco solubles como el fosfato de calcio $Ca_3(PO_4)_2$, Cr_2O_3 , Al_2O_3 , $CaCO_3$, $CaSO_4$, Fe_2O_3 y MgF_2 pueden incorporarse a los fibroblastos murinos 3T3 o L929 e incluso a las células tumorales humanas como las células HeLa (Iglesias-Artola, Villamonte, Gonzales Molino, 1994). Estas transfecciones son transitorias cuando la “construcción molecular” portadora del cDNA del transgen de interés no se integra al genoma de la célula receptora y no se encuentra ligado a una resistencia a los antibióticos (generalmente, geneticina). Cuando el plásmido contiene el cDNA de una enzima que permite degradar a un antibiótico de selección, la construcción molecular es incorporada al genoma celular y se logra una transfección estable (Alexander *et al.*, 1958). Pronto fue evidente la baja eficiencia de la transfección al introducir estas construcciones a líneas celulares humanas y a esto se sumaba un bajo nivel de expresión de las proteínas transgénicas. Estas limitaciones se resolvieron al elegir líneas celulares que naturalmente tuvieran una alta eficiencia de transfección y alta capacidad biosintética entre las que destacan las células del ovario del hámster chino (CHO) (Ritacco, Wu & Khetan, 2018), la línea de los fibroblastos derivados del tejido renal del mono verde africano (COS-7) y la línea celular del tejido renal embrionario de un humano (HEK293 (Sah *et al.*, 2015). Las células CHO fueron establecidas por el grupo del Dr. Arthur B. Robinson en 1958 a partir del epitelio del ovario del hámster chino (Puck *et al.*, 1958). Todas éstas células se han convertido en líneas celulares de elección para la industria biotecnológica por: **i)** su alta eficiencia de transfección,

ii) facilidad para adaptarse a diferentes medios de cultivo químicamente definidos, **iii)** alta capacidad anabólica entre 0.1 y 1.0 g de proteína recombinante por litro, **iv)** fenotipo altamente proliferativo, **v)** cultivos fácilmente escalables a nivel industrial, **vi)** baja susceptibilidad a las infecciones por virus que afectan al humano y **vii)** patrón de N-glicosilación compatible con el del humano. Un ejemplo del uso de las células CHO en la producción de las proteínas recombinantes humanas, adecuadamente N-glicosiladas es la eritropoyetina (Medina, Ortiz, González & Pérez, 2011). Otro ejemplo del uso de estas células en la industria biotecnológica es su empleo para la producción de anticuerpos quiméricos y humanizados de uso clínico (Zhang, Shan, Liang, Du & Li, 2022) como: Rituximab (anti-CD20), Trastuzumab (anti-Her-2), Bevacizumab (anti-VEGFR), Panitumumab (anti-EGFR) e Ipilimumab (anti-CTLA-4), (Trill, Shatzman % & Ganguly, 1995). La necesidad de contar con líneas celulares eficientes para la transfección llevó a la selección de las células COS-1 generadas a partir de la línea celular epitelial del riñón del mono de cola verde CV-1 que fue transfectada con el antígeno T grande del virus SV40 (Gluzman, 1981; Hancock, 1992; John-Arne, Enden, Camerer, Iversen & Prydz, 1995) y de la que posteriormente se derivó la línea celular COS-7. Por varios años esta línea celular se empleó como rutina para expresar proteínas transgénicas, hasta el desarrollo de las células HEK293 obtenidas por el Dr. Frank Graham a partir de las células embrionarias de un riñón humano (Graham, 1987; Tomas & Smart, 2005). Estas células fueron transfectadas con un fragmento de 4 Kb del genoma del adenovirus Ad5, que contiene los genes de las proteínas E1A y E1B que en conjunto manifiestan el fenotipo transformado a través de la regulación de muchas vías celulares, y que quedó insertado en el cromosoma 19 (Graham, Smile, Russell & Nairn, 1977). Una línea celular derivada de las HEK293 es la HEK293T generada en el grupo del Dr. Calos, en 1987 al introducir y expresar de manera estable el antígeno T grande del adenovirus SV40 (DuBridge, Tang, Hsia, Leong, Miller & Calos, 1987).

Además de su permanente utilidad estas dos líneas celulares por su eficiencia en la transfección se convierten en el modelo más empleado para expresar una gran diversidad de proteínas transgénicas (Tan *et al.*, 2021). Así, por ejemplo, ha servido para estudiar los procesos de señalización del receptor $\alpha 1\text{B}$ -adrenérgico, transfectando a la dominante negativa de la cinasa de los fosfoinosítidos (PKD-1), (Alcántara-Hernández & García-Sáinz, 2012). En la Figura 3 se muestran las publicaciones internacionales de tres líneas celulares empleadas en la expresión de los transgenes.

REQUERIMIENTOS QUÍMICOS Y EVOLUCIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

El interés por la composición de los medios de cultivo comenzó con el trabajo del Dr. Philip R. White, quien creó la formulación de un medio que permitía el crecimiento de las células y los tejidos vegetales *in vitro* (Cacciamali *et al.*, 2022). Este medio mostró la importancia de los aminoácidos esenciales y las vitaminas, al igual que del papel de la glutamina como nutriente aeróbico al ingresar directamente al metabolismo de los ácidos tricarbóxicos en la mitocondria. Si bien esta formulación sirvió de base para definir los componentes mínimos para el cultivo de las células animales, aún requería ser suplementado con SFB al 10%, como ocurrió con la fórmula del medio de Dulbecco (DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium), que necesitó del suplemento con el SFB (Cantor, 2019). La Tabla III muestra la composición salina y los complementos utilizados para el desarrollo de las células en los medios de cultivo tanto por Dulbecco, como el del Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640).

Desde un inicio, una de las limitantes del cultivo *in vitro* fue el control del pH ácido que con la actividad glicolítica generó

lactato, por lo que se implementó un sistema de amortiguamiento basado en el flujo continuo de CO_2 y la presencia de NaCO_3 (Swain, 2012), en la Tabla IV se presentan las formulaciones o combinación de componentes de varias soluciones salinas

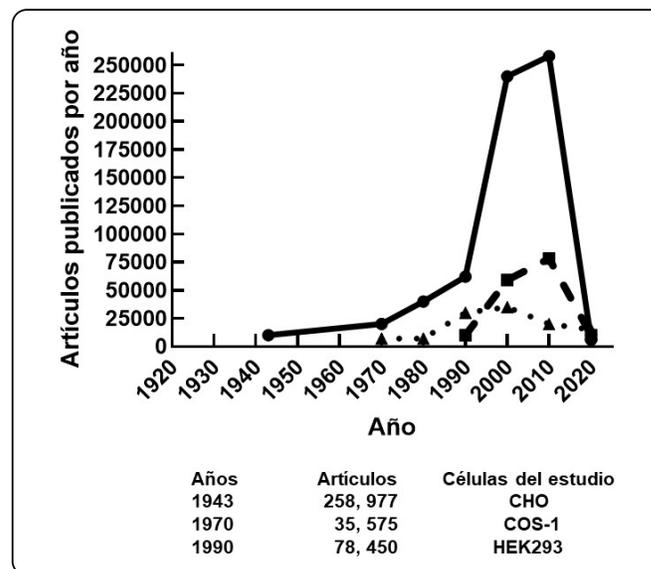


Figura 3. Se indican las líneas celulares que más se emplean actualmente en la expresión transgénica: CHO, COS-1 y HEK293T. La gráfica muestra el número de publicaciones, a partir del año 1943, 1970 y 1990, respectivamente de cada línea celular, y hasta el año 2020, publicaciones registradas en la base de datos de PubMed. Esta figura fue elaborada por los autores con los datos de las gráficas que se pueden consultar en las siguientes direcciones: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=CHO+cells>, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=COS-1+cells> <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/?term=HEK293+cells>

Tabla III. Contenido de iones de las diferentes soluciones salinas más empleadas en el cultivo celular, así como los medios de cultivo (mM). Roswell Park Memorial Institute (RPMI), hoy Roswell Park Comprehensive Cancer Center, en Buffalo, NY. EUA; Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) y Leibovitz, medio de cultivo diseñado para mantener el pH sin NaHCO_3 (<https://www.fishersci.es/>). La Tabla fue elaborada por los autores.

	Sydney Ringer	Krebs Ringer	Hank's BSS	Gey	RPMI1640	DMEM	Leibovitz
NaCl	133.00	112.00	137.00	120.00	107.33	110.00	138.00
KCl	1.34	4.50	5.40	5.00	5.36	5.33	5.33
Na_2HPO_4	-	-	0.25	1.20	5.63	-	1.33
NaH_2PO_4	-	-	-	-	1.04	0.91	-
NaNO_3	-	-	0.85	-	-	-	-
CuSO_4	-	-	-	-	0.60	-	-
KH_2PO_4	-	1.20	0.44	0.20	-	-	0.44
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1.25	2.50	1.30	1.41	1.80	1.80	1.26
MgSO_4	-	1.20	1.00	0.78	0.81	0.08	0.81
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	-	-	-	-	0.24	2.4E-4	-
NaHCO_3	2.73	26.00	4.20	-	44.05	44.00	-

isotónicas y de los medios que requieren de su complemento con NaCO₃. En 1963, el Dr. Albert Leibovitz diseñó un medio libre de NaCO₃ en el que la glucosa fue reemplazada por galactosa y por glutamina (Leibovitz, 1963). Cabe destacar que Leibovitz realizó estudios que pusieron de manifiesto la importancia de la glutamina como fuente de energía y la posibilidad de reemplazar la glucosa con otros carbohidratos simples como la galactosa (ver Tablas III-VI).

SUERO FETAL DE UN BOVINO

En 1951, Otto Gey aisló y cultivó las células de HeLa, sin embargo, reconoció la importancia de contar con nutrientes complejos para los medios de cultivo como los factores de supervivencia y los factores de crecimiento presentes en los

tejidos embrionarios por lo que implementó el uso rutinario de los extractos fetales y el suero placentario. Hoy el SFB es un suplemento indispensable en el cultivo de las células animales (Nims & Harbell, 2017). Los efectos de la viabilidad y la capacitación para la proliferación *in vitro* afectan el uso de los nutrientes fundamentales a los que están expuestas las propias células, por ejemplo: el EGF, el FGF, los glucocorticoides y la insulina tienen un papel central para facilitar el ingreso y el metabolismo de los nutrientes como la glucosa, las bases nitrogenadas, los aminoácidos, las poliaminas e incluso el Na⁺, el K⁺, el Mg²⁺ y el Ca²⁺ (Bettger & McKeehan, 1986), (Tabla III). La tabla VII desglosa algunos de los principales componentes presentes en el SBF (Pilgrim, McCahill, Rops, Dufour, Russell & Koch, 2022).

Tabla IV. Composición de aminoácidos y nutrientes en los medios de cultivo RPMI 1640, DMEM y Leibovitz (concentración mM) (<https://www.fishersci.es/>). La Tabla fue elaborada por los autores.

Aminoácido	Medio de cultivo: RPMI 1640	Medio de cultivo: DMEM	Medio de cultivo: Leibovitz
DL-Alanina	-	0.399	2.528
L-Arginina	1.000	0.398	2.873
L-Asparagina	0.378	0.454	1.893
L-Aspártico	0.150	0.398	-
L-Cisteína	0.207	0.201	0.992
L-Glutámico	0.136	0.401	-
L-Glutamina	-	-	2.00
Glicina	-	-	-
L-Histidina	0.096	0.200	1.612
L-Hidroxiprolina	1.152	-	-
Isoleucina	0.381	0.801	1.903
L-Leucina	0.381	0.801	0.954
L-Lisina	0.218	0.797	0.513
L-Metionina	0.100	0.201	0.503
L-Fenilalanina	0.090	0.400	0.757
L-Prolina	0.173	0.400	-
L-Serina	0.285	0.400	1.904
L-Treonina	0.168	0.798	2.521
L-Triptofano	0.024	0.078	0.098
L-Tirosina	0.111	0.397	1.657
L-Valina	0.171	0.803	0.854
Ácido 4-para-amino-benzoico	1.000	-	-
D(+) Biotina	0.001	-	-
D-Pantotenato de calcio	0.001	0.008	0.002
Cloruro de colina	0.007	0.028	0.007
Ácido fólico	0.007	0.028	0.007
Mio-inositol	0.194	0.040	0.011
Niacinamida	0.008	0.032	0.008
Piridoxina HCl	0.005	0.019	0.004
Riboflavina	0.0005	0.001	0.0002
Tiamina HCl	0.003	0.011	0.002
Vitamina B12	3.690 E-6		

Tabla V. Principales fuentes de energía en los medios de cultivo (<https://www.fishersci.es/>). La Tabla fue elaborada por los autores.

Compuesto	Medio de cultivo: RPMI 1640	Medio de cultivo: DMEM	Medio de cultivo: Leibovitz
Glucosa	11.20	5.5-10	-
Galactosa	-	-	5.00
Glutación	0.0003	-	-
Piruvato de sodio	1.00	1.24	-

Tabla VI. Evolución de los principales medios de cultivo (Cacciamali *et al.*, 2022). BME: medio basal de Eagle. La Tabla fue elaborada por los autores.

Medio de cultivo	Año	Cultivos celulares y la composición de algunos de ellos
Medio 99	1950	Cultivo de células embrionarias de pollo
BME	1955	Cultivo de fibroblastos murinos “L” y células HeLa
MEM	1959	Doble concentración de aminoácidos que BME
Ham F10	1963	Cultivo de células CHO, libre de suero
DMEM	1959	Cuatro veces más concentración de aminoácidos y vitaminas que BME
MEM	1959	Doble concentración de aminoácidos que BME
Ham F12	1965	Completamente sintético con composición definida y suplementado con ácido linolénico y putrecina
RPMI 1640	1966	Cultivo de células hematopoyéticas
DMEM F12	1979	Medio compuesto por DMEM y Ham F12 1:1

Tabla VII. Principales componentes del Suero Fetal Bovino (SBF). Valores en % del total de ácidos grasos. La Tabla fue elaborada por los autores.

Citocinas	Interleucina 16, interleucina 1
Aminoácidos esenciales	Isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina e histidina
Factores de crecimiento	IGF-1, IGF-2, EGF, FGF, VEGF, NGF, PDGF, TGFβ
Hormonas	Adenocorticotrópica, corticosteroides, hormona foliculo-estimulante, glucagon, hormona de crecimiento, insulina, hormona luteinizante, hormona paratiroidea, factor gonadotrópico de la pituitaria, prostaglandinas, prolactina, testosterona, hormona tiroidea, tiroxina, vasopresina
Pretinas séricas	Albúmina, antitrombina-III, inmunoglobulinas, hemoglobinas fetales, kininógeno, laminina, plasminógeno, antitripsina, α2-HS-glicoproteína, α2-macroglobulina, β2-glicoproteína I, apolipoproteínas, transcortina, transferrina, a1-lipoproteína, b1-lipoproteína
Enzimas	Alanina aminotransferasa, lactato deshidrogenasa, lactoperoxidasa, fosfoquinasa, protrombinasa, fosfatasa alcalina, aspartato aminotransferasa, lactato deshidrogenasa, lactoperoxidasa, fosfoquinasa, protrombinasa, transaminasas, γ-glutamil transferasa
Vitaminas	Ácido retinóico, vitamina-C, vitaminas del grupo B, biotina, cobalamina, ácido fólico, niacinamida, ácido pantoténico, pridoxal-fosfato, riboflavina, tiamina, α-tocoferol
Otros	Bilirrubina, urea, creatinina, poliaminas, purinas, pirimidinas
Carbohidratos	Glucosa, fructosa, galactosa, manosa, ribosa, intermediarios de la glicólisis

Tabla VII. Principales componentes del Suero Fetal Bovino (SBF). Valores en % del total de ácidos grasos. La Tabla fue elaborada por los autores (continuación).

Ácidos grasos	14:0	0.8
	16:0 (PAM)	23.0
	18:0 (STA)	18.8
	Saturados	45.0
	16:1 n-9	0.9
	16:1 n-7	1.3
	18: 1 n-9 (OLA)	15.3
	18: 1 n-7	2.0
	Monosaturados	23.5
	18: 2 n-6 (LNA)	7.6
	18: 3 n-6	0.3

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El cultivo de las células animales murinas y humanas tiene una larga historia a través de la cual esta técnica se ha convertido en una herramienta de suma importancia para la investigación, principalmente básica (transfección y expresión de proteínas, por ejemplo) y biomédica (obtención de vacunas y tratamientos médicos). El cultivo celular ha permitido observar “*in vitro*” la estructura y la función de las células aisladas, los tejidos y los órganos (la señalización, el metabolismo, la expresión de los genes y las proteínas y la diferenciación). Además, el cultivo de las células ha permitido realizar los ensayos experimentales a partir del modelaje *in silico* de diversos fenómenos celulares con base en el conocimiento teórico y con el apoyo de las bases de datos (inteligencia artificial). A la fecha, existen varias líneas celulares inmortalizadas, es decir, con reproducción sin control, y por lo tanto de uso permanente o en constante cultivo gracias al avance en la comprensión de las condiciones biofísicas de temperatura y de pH, así como al desarrollo de los medios de cultivo suplementados con nutrientes y factores de crecimiento específicos (Tablas I-VII). En las Figuras 1 y 2 se observa que el número de publicaciones de trabajos experimentales originales (PubMed) en donde se emplea el cultivo celular es extenso lo que demuestra su importancia. Para el estudio del cáncer de mama por ejemplo, la ATCC tiene registradas varias líneas celulares (Tabla II) que provienen de pacientes. Hallazgos clave como la descripción de los mecanismos tumorigénicos, patogénicos por muerte celular, sobrevivencia y la tolerancia a los fármacos, por mencionar algunos, se obtuvieron de modelos producto del cultivo de células.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos el apoyo de PAPIIT-DGAPA-UNAM. Proyecto: IT201222.

REFERENCIAS

Adhikari, A., Kim, W. & Davie, J. (2021). Myogenin is required for assembly of the transcription machinery on muscle genes during skeletal muscle differentiation. *PLoS One*, Jan 19;

- 16(1), e0245618. DOI: 10.1371/journal.pone.0245618.
- Alcántara-Hernández, R. & García-Sáinz, J. A. (2012). Roles of phosphoinositide-dependent kinase-1 in α 1B-adrenoceptor phosphorylation and desensitization. *Eur. J. Pharmacol.*, 15; **674(2-3)**, 179-187. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.11.021.
- Alexander, H. E., Koh, G., Mountain, I. M., Sprunt, K. & Van Damme, O. (1958). Infectivity of ribonucleic acid of poliovirus on HeLa cell monolayers. *J. Exp. Med.*, Oct 1; **108(4)**, 493-506. DOI: 10.1084/jem.108.4.493.
- Aoki, S., Takezawa, T., Sugihara, H. & Toda, S. (2016). Progress in cell culture systems for pathological research. *Pathol. Intern.*, **66**, 554-562. DOI: 10.1111/pin.12443.
- Barros, L. F., Ruminot, I., San Martín, A., Lerchundi, R., Fernández-Moncada, I. & Baeza-Lehnert, F. (2021). Aerobic Glycolysis in the Brain: Warburg and Crabtree Contra Pasteur. *Neurochem. Res.*, **46**, 15-22. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02964-w>.
- Beaulieu, J. F. & Calvert, R. (1985). Permissive effect of glutamine on the differentiation of fetal mouse small intestine in organ culture. *Differentiation*, **29(1)**, 50-55. DOI: 10.1111/j.1432-0436.1985.tb00291.x.
- Berry, M. N. & Friend, D. S. (1969). High yield preparation of insulate right rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.*, **43**, 506-520.
- Bessems, M., Hart, N. A., Tolba, R., Doorschodt, B. M., Leuvenink, H. G., Ploeg, R. J., Minor, T. & van Gulik, T. M. (2006). The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim.*, Jul; **40(3)**, 236-246. DOI: 10.1258/00236770677611460.
- Bettger, W. J. & McKeehan, W. L. (1986). Mechanisms of cellular nutrition. *Physiol. Rev.*, **66(1)**, 1-35. DOI:10.1152/physrev.1986.66.1.1
- Bounakta, S., Bteich, M., Mantha, M., Poulin, P. & Haddad, S. (2018). Predictions of bisphenol A hepatic clearance in the isolated perfused rat liver (IPRL): impact of albumin binding and of co-administration with naproxen. *Xenobiotica*, Feb; **48(2)**, 135-147. DOI: 10.1080/00498254.2017.1294276.
- Burrows, M. T. (1910). The cultivation of tissues of the chick-

- embryo outside the body. *J. Amer. Med. Assoc.*, **55(24)**, 2057-2058. DOI:10.1001/jama.1910.04330240035009.
- Burrows, M. T., Burns, J. E. & Suzuki, Y. (2017). Studies on the growth of cells the cultivation of bladder and prostatic tumors outside the body. *J. Urol.*, **197**, S2-S14. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2016.10.072>.
- Cacciamali, A., Villa, R. & Dotti, S. (2022). 3D cell cultures: evolution of an ancient tool for new applications. *Front. Physiol.*, **13**, 836480. DOI: 10.3389/fphys.2022.836480.
- Cantor, J. R. (2019). The rise of physiologic media. *Trends Cell Biol.*, Nov; **29(11)**, 854-861. DOI: 10.1016/j.tcb.2019.08.009.
- Chong, Z. X., Yeap, S. K. & Ho, W. Y. (2021). Transfection types, methods and strategies: a technical review. *Peer J.*, Apr 21, **9**, e11165. DOI: 10.7717/peerj.11165.
- Christensen, H. N. & Riggs, T. R. (1952). Concentrative uptake of amino acids by the Ehrlich mouse ascites carcinoma cell. *J. Biol. Chem.*, **194(1)**, 57-68. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)55854-3.
- DuBridges, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H. & Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.*, Jan; **7(1)**, 379-387. DOI: 10.1128/mcb.7.1.379-387.1987.
- Duval, K., Grover, H., Han, L-H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J. & Chen, Z. (2017). Modeling physiological events in 2D vs. 3D cell culture. *Physiol.*, June 14; **32**, 266-277. DOI:10.1152/physiol.00036.2016.
- Ehrlich, P. (1891a). Experimentelle untersuchungen über immunität I. Über ricin. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **17**, 976-979.
- Ehrlich, P. (1891b). Experimentelle untersuchungen über immunität II. Über abrin. *Dtsch. Med. Wochenschr.*, **17**, 1218-1219.
- Ehrlich, P. & Apolant, H. (1905) Beobachtungen über maligne Mäusetumoren. *Berliner klinische Wochenschrift*, **28**, 871-874.
- Estrada-Soto, S., Rendón-Vallejo, P., Villalobos-Molina, R., Millán-Pacheco, C., Vázquez, M., Hernández-Borja, F. & Hernández-Núñez, E. (2022). 6-Amino-3-Methyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4-Dihydropyrano[2,3-c]Pyrazole-5-Carbonitrile shows antihypertensive and vasorelaxant action via calcium channel blockade. *Drug Res.*, Jan; **72(1)**, 53-60. DOI: 10.1055/a-1616-0156.
- Fina, B. L., Lombarte, M. & Rigalli, A. (2013). Investigación de un fenómeno natural, ¿Estudios *in vivo*, *in vitro* o *in silico*? *Actual Osteol.*, 13; **9(3)**, 294-299. <http://www.osteologia.org.ar>.
- Flotte, T. J. (2008). Transverse sectioning of the scalp (Headington technique) in the 19th century. *J. Cutan Pathol.*, **35**, 82-85. DOI: 10.1111/j.1600-0560.2007.00772.x.
- Fraser, M. (1960). Optimal protein synthesis by ascites tumour cells *in vitro*. *Nature*, **187**, 1114-1115. DOI: 10.1038/1871114a0.
- Freshney, R. I. (2010) Culture of animal cells: a manual of basic techniques and specialized applications. 6a edición. *Wiley-Blackwell*. ISBN: 978-0-470-52812-9.
- Fulgencio, J-P., Kohl, C., Girard, J. & PeÀgorier, J-P. (2001). Effect of metformin on fatty acid and glucose metabolism in freshly isolated hepatocytes and on specific gene expression in cultured hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, Aug 15; **62(4)**, 439-446. DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00679-7.
- Furuichi, Y., Manabe, Y., Takagi, M., Aoki, M. & Fujii, N. L. (2018). Evidence for acute contraction-induced myokine secretion by C2C12 myotubes. *PLoS One*, Oct 24; **13(10)**, e0206146. DOI: 10.1371/journal.pone.0206146.
- Gabrielli, M., Martini, C. N., Brandani, J. N., Iustman, L. J. R., Romero, D. G. & Vila, M. del C. (2014). Exchange protein activated by cyclic AMP is involved in the regulation of adipogenic genes during 3T3-L1 fibroblasts differentiation. *Dev. Growth Differ.*, Feb; **56(2)**, 143-151. DOI: 10.1111/dgd.12114.
- García-Sáinz, J. A. & Macías-Silva, M. (1990). Angiotensin II stimulates phosphoinositide turnover and phosphorylase through AII-1 receptors in isolated rat hepatocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Oct 30; **172(2)**, 780-785. DOI: 10.1016/0006-291x(90)90742-6.
- García-Sáinz, J. A., Hernández-Sotomayor, S. M. & Macías-Silva, M. (1990). Melittin stimulates liver glycogenolysis and the release of prostaglandin D2 and thromboxane B2. *Biochem. J.*, Jul 1; **269(1)**, 273-275. DOI: 10.1042/bj2690273.
- Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell.*, Jan; **23(1)**, 175-182. DOI: 10.1016/0092-8674(81)90282-8.
- Gómez, E. O., Mendoza-Milla, C., Ibarra-Sánchez, M. J., Ventura-Gallegos, J. L. & Zentella, A. (1996). Ceramide reproduces late appearance of oxidative stress during TNF-mediated cell death in L929 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Nov 12; **228(2)**, 505-509. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1690.
- Gores, G. J., Kost, L. J. & Larusso, N. F. (1986). The Isolated Perfused Rat Liver: Conceptual and Practical Considerations. *Hepatol.*, **6(3)**, 511-517 DOI: 10.1002/hep.1840060331.
- Graham, F. L. (1987). Growth of 293 Cells in suspension culture. *J. Gen. Virol.*, **68**, 937-940. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-3-937>.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C. & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, **36(1)**, 59-74. DOI: 10.1099/0022-1317-36-1-59.
- Guillouzo, A. (1998). Liver cell models in *in vitro* toxicology. *Environ health Perspect.*, Apr; **106 (Suppl 2)**, 511-532. DOI: 10.1289/ehp.98106511.
- Halper, J. & Moses, H. L. (1983). Epithelial tissue-derived growth factor-like polypeptides. *Cancer Res.*, May; **43(5)**, 1972-1979. PMID: 6572559.

- Hancock, J. F. (1992). COS cell expression. *Methods Mol. Biol.*, **8**, 153-158. DOI: 10.1385/0-89603-191-8:153.
- Harrison, H. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **4**, 140-143. DOI: 10.3181/00379727-4-98.
- Hems, R., Ross, B. D., Berry, M. N. & Krebs, H. A. (1966). Gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Biochem. J.*, Nov; **101(2)**, 284-292. DOI: 10.1042/bj1010284.
- Hou, W. & Sanyal, A. J. (2009). Ascites: diagnosis and management. *Med. Clin. of North America.*, **93(4)**, 801-817. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2009.03.007>.
- Iglesias-Artola, J. M., Villamonte, G. & Gonzales Molfino, H. M. (1994). Transfección de SDN a células animales como herramientas utilizadas en biotecnología animal. *The Biologist.*, (Lima), **13(1)**, 125-142. https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologist/v13_n1/pdf/rev1v13n1.
- Ikeda, M. & Kato, N. (2007). Life style-related diseases of the digestive system: cell culture system for the screening of anti-hepatitis C virus (HCV) reagents: suppression of HCV replication by statins and synergistic action with interferon. *J. Pharmacol. Sci.*, Oct; **105(2)**, 145-150. DOI: 10.1254/jphs.fm0070050.
- John-Arne, R., Enden, T., Camerer, E., Iversen, J. G. & Prydz, H. (1995). Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca²⁺ signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J. Biol. Chem.*, **270(9)**, 4650-4660.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. & Claverys, J. P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat. Rev. Microbiol.*, Mar; **12(3)**, 181-196. DOI: 10.1038/nrmicro3199.
- Kanda, T., Sasaki, R., Masuzaki, R., Matsumoto, N., Ogawa, M. & Moriyama, M. (2020). Cell culture systems and drug targets for hepatitis A virus infection. *Viruses*, **12**, 533. DOI: 10.3390/v12050533. <http://dx.doi.org/10.3390/v12050533>.
- Klein, G. (1956). Some recent studies on the production and growth characteristics of ascites tumors. *Zeitschrift für Krebsforschung*, **61(2)**, 99-119. DOI: 10.1007/bf00524327.
- Klein, G. & Révész, L. (1953). Quantitative studies on the multiplication of neoplastic cells *in vivo*. I. Growth curves of the Ehrlich and MClM ascites tumors. *J. Nat. Cancer Inst.*, **14(2)**, 229-277. DOI: 10.1093/jnci/14.2.229.
- Lahera, V., Vázquez-Pérez, S., de las Heras, N., Cediél, E., Navarro-Cid, J. & Cachofeiro, V. (2000). Angiotensina II e hipertensión arterial: consecuencias del antagonismo de sus receptores. *Hipertensión y Riesgo Vascular*, **17(1)**, 22-29. [https://doi.org/10.1016/S1889-1837\(00\)71005-1](https://doi.org/10.1016/S1889-1837(00)71005-1).
- Langendorff, O. (1895). Untersuchugen am überlebenden Säugethierherz [https://doi.org/10.1016/S1889-1837\(00\)71005-1en](https://doi.org/10.1016/S1889-1837(00)71005-1en). *Pflügers Arch.*, **61**, 291-307.
- Leibovitz, A. (1963). The growth and maintenance of tissue-culture cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Am. J. Hyg.*, Sep; **78**, 173-180. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a120336.
- Leung, Ch. M., de Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G-H., Ko, J., Rho, H. S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N. L., Takayama, S., Shuler, M. L., Vunjak-Novakovic, G., Frey, O., Verpoorte, E. & Toh, Y-Ch. (2022). A guide to the organ-on-a-chip. *Nat. Rev. Methods Primers.*, **2**, 33. DOI: 10.1038/s43586-022-00118-6.
- Loewenthal, H. & Jahn, G. (1932). Übertragungsversuche mit carcinomatöser Mäuse-Ascitesflüssigkeit und ihr Verhalten gegen physikalische und chemische Einwirkungen. *Zeitschrift für Krebsforschung*, **37**, 439-447. DOI: 10.1007/BF01618550.
- Lucey, B. P., Nelson-Rees, W. A. & Hutchins, G. M. (2009). Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination. *Arch. of Pathol. & Lab. Med.*, **133(9)**, 1463-1467. <https://doi.org/10.5858/133.9.1463>.
- Marín-Hernández, A., Gallardo-Pérez, J. C., Reyes-García, M. A., Sosa-Garrocho, M., Macías-Silva, M., Rodríguez-Enríquez, S., Moreno-Sánchez, R. & Saavedra, E. (2020). Kinetic modeling of glucose central metabolism in hepatocytes and hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, Nov; **1864(11)**, 129687. DOI: 10.1016/j.bbagen.2020.129687.
- Mather, J. P. (1998). Making informed choices: medium, serum, and serum-free medium. How to choose the appropriate medium and culture system for the model you wish to create. *Methods Cell Biol.*, **57**, 19-30. DOI: 10.1016/s0091-679x(08)61569-1.
- Medina, R. E., Ortiz, E. C., González, R. E. & Pérez, R. N. O. (2011). Cuantificación de EPO humana recombinante por Fase Reversa-Cromatografía Líquida de Ultra Resolución. *Rev. Mex. Cienc. Farm.*, **42(2)**, 20-26. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1870-01952011000200004&lng=es&nrm=iso
- Meldrum, M. (1998). "A calculated risk": the Salk polio vaccine field trials of 1954. *BMJ.*, Oct 31; **317(7167)**, 1233-1236. DOI: 10.1136/bmj.317.7167.1233.
- Mitaka, T. (1998). The current status of primary hepatocyte culture. *Int. J. Exp. Pathol.*, Dec; **79(6)**, 393-409. DOI: 10.1046/j.1365-2613.1998.00083.x.
- Nakata, M., Nagasaka, S., Kusaka, I., Matsuoka, H., Ishibashi, S. & Yada, T. (2006). Effects of statins on the adipocyte maturation and expression of glucose transporter 4 (SLC2A4): implications in glycaemic control. *Diabetologia*, Aug; **49(8)**, 1881-1192. DOI: 10.1007/s00125-006-0269-5.
- Nims, R. W. & Harbell, J. W. (2017). Best practices for the use and evaluation of animal serum as a component of cell culture medium *in vitro* cell. *Dev. Biol. Anim.*, **53**, 682-690. DOI: 10.1007/s11626-017-0184-8.
- Ohnuki, M. & Takahashi, K. (2015). Present and future challenges of induced pluripotent stem cells. *Philos. Trans. R Soc. Lond B Biol. Sci.*, Oct 19; **370(1680)**, 20140367.

- DOI: 10.1098/rstb.2014.0367.
- Pappalardo, F., Russo, G., Tshinanu, F. M. & Viceconti, M. (2019). *In silico* clinical trials: concepts and early adoptions. *Brief Bioinform.*, Sep 27; **20(5)**, 1699-1708. DOI:10.1093/bib/bby043.
- Pernik, M. N., Bird, C. E., Traylor, J. I., Shi, D. D., Richardson, T. E., McBrayer, S. K. & Abdullah, K. G. (2021). Patient-derived cancer organoids for precision oncology treatment. *J. Pers. Med.*, **11(5)**, 423. <https://doi.org/10.3390/jpm11050423>.
- Pilgrim, C. R., McCahill, K. A., Rops, J. G., Dufour, J. M., Russellm, K. A. & Koch, T. G. (2022). A Review of Fetal Bovine Serum in the culture of mesenchymal stromal cells and potential alternatives for veterinary medicine. *Front. Vet. Sci.*, May 3; **9**, 859025. DOI: 10.389/fvets.2022.859025.
- Pilipovi, K., Hrka, A. H., Ku, N. & Pel, J. M. (2023). Modeling central nervous system injury *in vitro*: Current status and promising future strategies. *Biomedicines*, **11**, 94. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11010094>.
- PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/about>. National Library of Medicine. 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894.
- Puck, T. T., Cieciura, S. J. & Robinson, A. (1958). Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J. Exp. Med.*, Dec 1; **108(6)**, 945-956. DOI: 10.1084/jem.108.6.945.
- Rajan S, Chu Pham Dang, H., Djambazian, H., Zuzan, H., Fedyshyn, Y., Ketela, T., Moffat, J., Hudson, T. J. & Sladek, R. (2012). Analysis of early C2C12 myogenesis identifies stably and differentially expressed transcriptional regulators whose knock-down inhibits myoblast differentiation. *Physiol. Genomics*, Feb 1; **44(2)**, 183-197. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00093.2011.
- Ramírez, A. (2021). Hidden black scientists proved the polio vaccine worked. *Sci. Am.*, June 17. <https://www.scientificamerican.com/article/hidden-black-scientists-proved-the-polio-vaccine-worked>.
- Ravi, M., Paramesh, V., Kaviya, S. R., Anuradha, V. & Solomon, F. D. P. (2015). 3D cell culture systems: advantages and applications. *J. Cell. Physiol.*, Jan; **230(1)**, 16-26. DOI: 10.1002/jcp.24683.
- Ritacco, F. V., Wu, Y. & Khetan, A. (2018). Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: History, key components, and optimization strategies. *Biotechnol. Progress*, **34(6)**, 1407-1426. <https://doi.org/10.1002/btpr.2706>.
- Sah, J. P., Salahuddin, M., Sayed, M. A., Salauddin, A. S., Sayfullah, Md., Rashid, M., Saclain, S., Washim, M. R., Zeb, M. A., Hossain, D., Chowdhury, Md. R. & Momin, M. A. (2015). Transfection optimisation in HEK-293 cell line. *Asian J. Med. Biol. Res.*, **1(1)**, 121-129. ISSN 2411-4472.
- Sanford, K. K., Earle, W. R. & Likely, G. D. (1948). The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, Dec; **9(3)**, 229-246. PMID: 18105872.
- Scherer, W. F., Syverton, J. T. & Gey, G. O. (1953). Studies on the propagation *in vitro* of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.*, May; **97(5)**, 695-710. DOI: 10.1084/jem.97.5.695.
- Segeritz, C. P. & Vallier, L. (2017). Cell Culture: growing cells as model systems *in vitro* basic science. *Methods for Clin. Res.*, **Chapter 9**, 151-172. DOI: 10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6.
- Shengqiang, Y., Yu, E., Jiang, Y., Wan, F., Wu, J., Gao, Z. & Liu, D. (2017). Immortalized cancer-associated fibroblasts promote prostate cancer carcinogenesis, proliferation and invasion. *Anticancer Res.*, **37**, 4311-4318. DOI: 10.21873/anticancer.11824.
- Shiau, M. Y., Chiou, H. L., Lee, Y. L., Kuo, T. M. & Chang, Y. H. (2001). Establishment of a consistent L929 bioassay system for TNF-alpha quantitation to evaluate the effect of lipopolysaccharide, phytomitogens and cytodifferentiation agents on cytotoxicity of TNF-alpha secreted by adherent human mononuclear cells. *Mediators Inflamm.*, Aug; **10(4)**, 199-208. DOI: 10.1080/09629350123139.
- Soule, H. D., Vazquez, J., Long, A., Albert, S. & Brennan M. (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, **51(5)**, 1409-1416. DOI: 10.1993/jnci/51.5.1409.
- Stepanenko, A. A. & Heng, H. H. (2017). Transient and stable vector transfection: Pitfalls, off-target effects, artifacts. *Mutat. Res. Rev.*, Jul; **773**, 91-103. DOI: 10.1016/j.mrrev.2017.05.002.
- Swain, J. E. (2012). Media composition: pH and buffers. *Methods and Protocols, Methods in Mol. Biol.*, 01 Jan; **912**, 161-175. DOI: 10.1007/978-1-61779-971-6_10.
- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S. & Ng, S. K. (2021). HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, Dec 13; **9**, 796991. DOI: 10.3389/fbioe.2021.796991.
- Tan, J. P., Liu, X. & Polo, J. M. (2024). Reprogramming fibroblast into human iBlastoids. *Nat. Protocols.*, **(19)**, 2298-2316. DOI: 10.1038/s41596-024-00984-2. <https://www.nature.com/articles/s41596-024-00984-2>.
- Thomas, P. & Smart, T. G. (2005). HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J. Pharmacol. and Toxicol. Meth.*, **51(3)**, 187-200. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2004.08.014>.
- Trill, J. J., Shatzman, A. R. & Ganguly, S. (1995). Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Current Opinion in Biotechnol.*, **5(6)**, 553-560. DOI: 10.1016/0958-1669(95)80092-1.
- Turner, T. (2012). Development of the polio vaccine: a historical perspective of
- Tuskegee University's role in mass production and distribution of HeLa cells. *J. Health Care Poor Underserved.*, Nov; **23(4, Supp1)**, 5-10. DOI:10.1353/hpu.2012.0151.

- Wang, X., Simpkins, J. W., Dykens, J.A. & Cammarata, P. R. (2003). Oxidative damage to human lens epithelial cells in culture: estrogen protection of mitochondrial potential, ATP, and cell viability. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, May; **44(5)**, 2067-2075. DOI: 10.1167/iovs.02-0841.
- Watanabe, M. & Okada, T. (2018). Langendorff perfusion method as an *ex vivo* model to evaluate heart function in rats. *Meth. Mol. Biol.*, **1816**, 107-116. DOI: 10.1007/978-1-4939-8597-5_8.
- Wolff, J. A. & Lederberg, A. (1994) An early history of gene transfer and therapy. *Hum. Gene Ther.*, Apr; **5(4)**, 469-480. DOI: 10.1089/hum.1994.5.4-469.
- Worboys, P. D., Bradbury, A. & Houston, J. B. (1995). Kinetics of drug metabolism in rat liver slices. Rates of oxidation of ethoxycoumarin and tolbutamide, examples of high- and low-clearance compounds. *Drug Metab. Dispos.*, Mar; **23(3)**, 393-397.
- Yalcin, N. G., Choong, C. K. C. & Eizenberg, N. (2013). Anatomy and pathophysiology of the pleura and pleural space. *Thorac. Surg. Clin.*, **23(1)**, 1-10. DOI: 10.1016/j.thorsurg.2012.10.008
- Zhang, J. H., Shan, L. L., Liang, F., Du, C. Y. & Li, J. J. (2022). Strategies and considerations for improving recombinant antibody production and quality in chinese hamster ovary cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, Mar 4; **10**, 856049. DOI: 10.3389/fbioe.2022.856049.
- Zhang, K., Zhang, L., Liu, W., Ma, X., Cen, J., Sun, Z., Wang, C., Feng, S., Zhang, Z., Yue, L., Sun, L., Zhu, Z., Chen, X., Feng, A., Wu, J., Jiang, Z., Li, P., Cheng, X., Gao, D., Peng, L. & Hui, L. (2018). *In vitro* expansion of primary human hepatocytes with efficient liver repopulation capacity. *Cell. Stem Cell.*, Dec 6; **23(6)**, 806-819.e4. DOI: 10.1016/j.stem.2018.10.018.
- Zimmer, H. G. (1998). The isolated perfused heart and its pioneers. *News Physiol. Sci.*, Aug; **13**, 203-210. DOI: 10.1152/physiologyonline.13.4.203.