

Palabras clave: antioxidantes, hibridomas, potencial redox del cultivo

Introducción. Aún cuando no se conoce exactamente porque los cultivos celulares reducen su ambiente, los tioles tales como Cys, 2-ME, monoioglicerol, y ácido ascórbico se utilizan frecuentemente para suplementar el medio de cultivo ya que se ha observado que el suministro de este tipo de compuestos incrementa la síntesis de GSH, así como la activación y la proliferación celular [1]. También se ha demostrado que estos compuestos incrementan la formación de anticuerpo monoclonal (AcMo) [2]. Este resultado puede ser consecuencia de un mejoramiento en las características de crecimiento de la célula en presencia de tioles. Además, se ha observado que a una mayor concentración de tioles en el cultivo menor es el potencial redox del cultivo (PRC) permitiendo determinar la concentración de células viables por medio del monitoreo en línea de este parámetro, siendo específico de cada línea celular y del medio de cultivo utilizado.

En este trabajo se presentan los resultados sobre las cinéticas de crecimiento de hibridomas cuando los cultivos son adicionados con antioxidantes. Asimismo, se discute el papel de la adición de éstos sobre el PRC, el cual es un novedoso parámetro a controlar en cultivo de células de eucariotes superiores, mostrando la dependencia de la producción de agentes antioxidantes en el monitoreo en línea de la concentración de células viables en cultivos a oxígeno disuelto constante.

Metodología. Línea celular: hibridomas murinos BCF2 productores del AcMo contra la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffman. Medio de cultivo: DMEM suplementado con 4 g/L de glucosa, 4 mM de glutamina, 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 1% de solución de aminoácidos no esenciales, 1% de solución antibiótica-antimicótica y 10% de suero fetal bovino. Los cultivos se desarrollaron en frascos estáticos con 10 y 30 ml de medio de cultivo y la viabilidad así como la concentración celular se determinaron por medio de tinción con azul de tripano y por cuenta en el Coulter Counter Multisizer II. Los antioxidantes utilizados fueron el 2 mercaptoetanol (2-ME), cisteína (Cys), glutatión (GSH), suero fetal bovino (SFB) y como oxidante se utilizó el peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Resultados y Discusión. Como se muestra en la Tabla 1, los antioxidantes y oxidantes utilizados tienen diferente efecto sobre el PRC así como sobre el crecimiento celular. En el caso del 2-ME, la concentración letal es de 0.5 mM y el cambio que provoca sobre el PRC es de aprox. -350 mV. La concentración máxima de cys utilizada fue de 2 mM, debido a que tiende a cristalizarse en el medio, sin embargo, es un antioxidante que puede utilizarse como adición al medio de cultivo debido a que provoca un cambio de -150 mV y tiene la ventaja de que no se evapora como sucede con el 2-ME. El GSH, aún cuando es el principal agente para controlar el potencial redox intracelular, no provoca cambio en el PRC, pero sí lo hace sobre el pH del medio. Asimismo, tiene efecto sobre la producción de anticuerpo monoclonal. En el caso del SFB, se observó que su papel principal es como estimulador del crecimiento celular debido a los factores de crecimiento que contiene, sin embargo, no se observó efecto sobre el PRC. Debido a que una concentración del 20% de SFB estimuló la proliferación celular, también se incrementó la producción de AcMo. En el caso del H₂O₂, se observó que éste modifica drásticamente el PRC a valores oxidantes pero tiene efecto letal sobre el crecimiento celular afectando la producción de AcMo.

Tabla 1. Efecto de la adición de antioxidantes/oxidantes sobre PRC, crecimiento celular y la producción de AcMo.

Antioxidante/oxidante	Modificación del redox	Efecto sobre el crecimiento	Efecto sobre el AcMo
2-ME	Sí	No	No
Cys	Sí	Ligero	No
GSH	No	No	Sí
SFB	No	Sí	Sí
H ₂ O ₂	Sí	Sí	Sí

También se presentan los resultados obtenidos en cultivos a oxígeno disuelto constante, en los cuales la producción de antioxidantes por parte de la célula causa una disminución en el PRC, por lo que el monitoreo en línea de este parámetro puede utilizarse como indicador de la concentración de células viables en el cultivo. Se observó que en este caso los resultados obtenidos son dependientes de la concentración de oxígeno disuelto y de la línea celular utilizada.

Conclusiones. Estos resultados permiten establecer dos aplicaciones en el cultivo de células de eucariotes superiores: por un lado es posible monitorear su producción para determinar en línea la concentración de células viables y por otro lado, la adición de antioxidantes puede permitir el control del PRC.

Agradecimientos. CONACyT, UPIBI-IPN.

Bibliografía.

1. Glacken M.W. Adema E., Sinskey J. (1989). Mathematical descriptions of hybridoma culture kinetics: II. The relationship between thiol chemistry and the degradation of serum activity. *Biotech. Bioeng.*, 33: 440-450.

2. Ohmori H., Yamamoto I. (1983a). Mechanism of argumentation of the antibody response *in vitro* by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes. II. A major role of the mixed disulfide between 2-Mercaptoethanol and cysteine. *Cell. Immunol.*, 79: 173-185.