



6.2 Resultados de control obtenidos para LS-11 y LS-12

Tabla 13: Resultados para bancos de células Vero de trabajo (LS-11, lote FA106611 elaborado el 29 de abril de 2002 y LS-12, lote FA115772 elaborado el 23 de julio de 2002), en el pasaje 137^o sobre células

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados para LS-11	Resultados para LS-12
Observación al microscopio óptico tras la fijación y la tinción	Morfología celular y características de multiplicación de las células Vero. Ausencia de alteraciones citológicas atribuibles a contaminantes microbianos	Cumple	Cumple
Observación al microscopio electrónico	No se observan virus, partículas parecidas a virus, <i>Mycoplasma</i> , hongos, levaduras ni bacterias.	Cumple	Cumple
Observaciones en el día 14	Ausencia de efecto citopático	Cumple	Cumple
Hemadsorción en el día 14	Ausencia de hemadsorción	Cumple	Cumple
Identificación de células de simio	Identificación positiva	Positivo	Positivos
Identificación de la línea celular continua Vero	Coincide con las células de referencia	Cumple	Cumple





Tabla 14: Resultados para bancos de células Vero de trabajo (LS-11, lote FA106611 elaborado el 29 de abril de 2002 y LS-12, lote FA115772 elaborado el 23 de julio de 2002), en el pasaje 137° en sobrenadantes

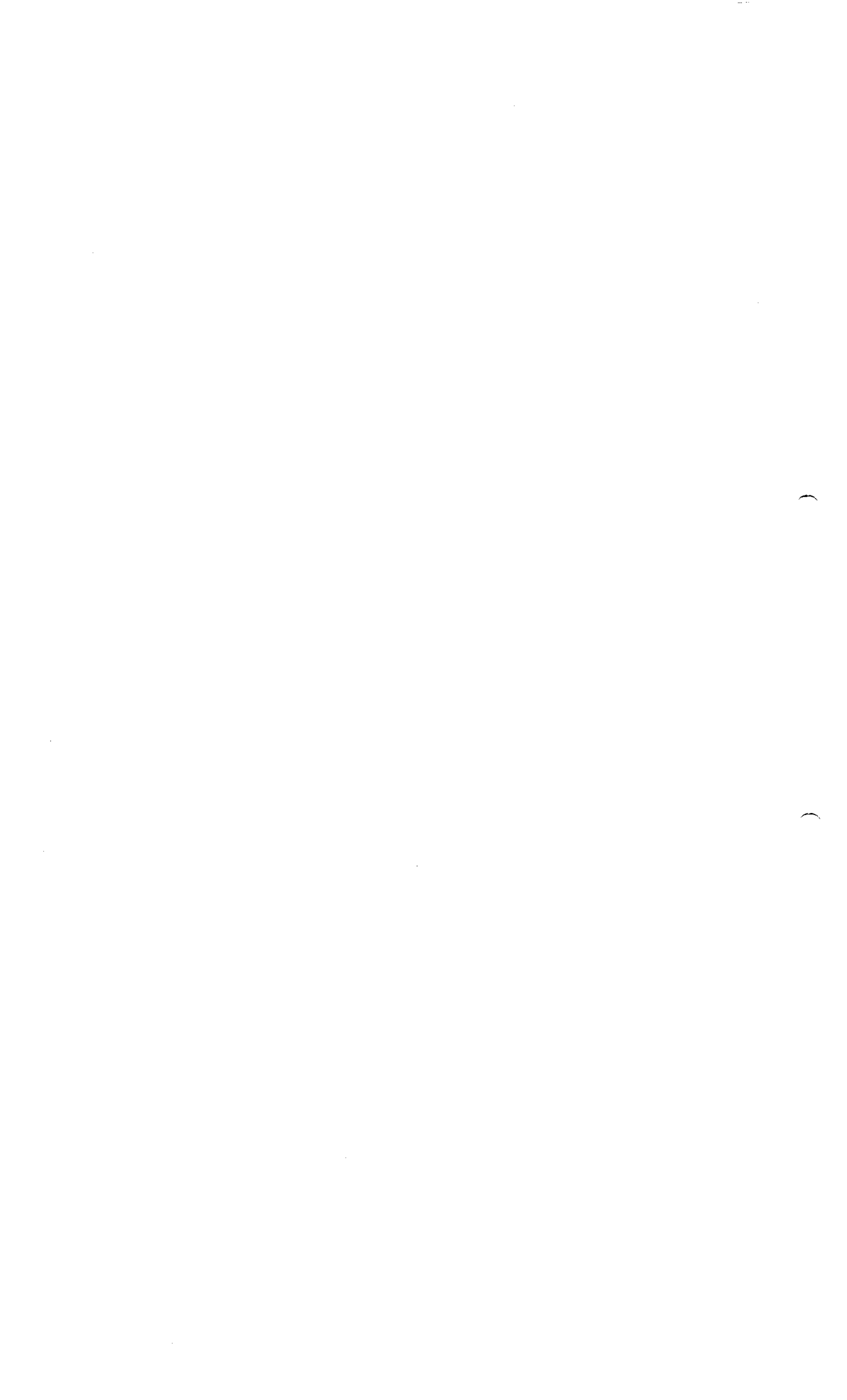
Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados para LS-11	Resultados para LS-12
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Sin crecimiento microbiano	Cumple	Cumple
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante el método de cultivo	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .	Cumple	Cumple
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.	Cumple	Cumple
Prueba de detección de agentes extraños con células: - células continuas Vero - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.	Cumple	Cumple
Prueba de detección de <i>Mycobacteria in vitro</i>	Sin crecimiento de <i>Mycobacteria</i>	Cumple	Cumple
Prueba de detección de <i>Mycobacteria in vivo</i>	Ausencia de muertes debidas a <i>Mycobacteria</i>	Cumple	Cumple





Tabla 15: Resultados para bancos de células Vero de trabajo (LS-11, lote FA106611 elaborado el 29 de abril de 2002 y LS-12, lote FA115772 elaborado el 23 de julio de 2002), en el pasaje 147^o sobre células

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados para LS-11	Resultados para LS-12
Identificación de células de simio	Identificación positiva	Positivo	Positivo
Identificación de la línea celular continua Vero	Coincide con las células de referencia	Cumple	Cumple
Observación al microscopio óptico tras la fijación y la tinción	Morfología celular y características de multiplicación de las células Vero. Ausencia de alteraciones citológicas atribuibles a contaminantes microbianos	Cumple	Cumple
Observación al microscopio electrónico (después de la inducción)	No se observan virus, partículas parecidas a virus, <i>Mycoplasma</i> , hongos, levaduras ni bacterias antes y después de la inducción por IUDR.	Cumple	Cumple
Prueba de detección de agentes extraños en animales: por vía intramuscular: - ratones lactantes - ratones adultos - cobayos - conejos por vía intracerebral: - ratones adultos	Sin evidencia de agentes extraños	Cumple	Cumple
Prueba de agentes extraños en huevos de gallina embrionados: - cavidad alantoidea - saco vitelino - membrana corioalantoidea	Sin evidencia de agentes extraños	Cumple	Cumple
Cocultivo de células intactas con: - células continuas Vero - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.	Cumple	Cumple
Cocultivo de células fragmentadas con: - células continuas Vero - células diploides humanas MRC-5 - células primarias de riñón de mono	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.	Cumple	Cumple



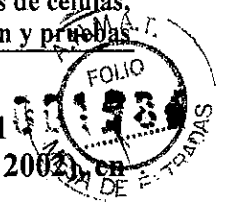
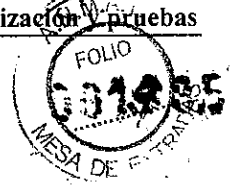


Tabla 16: Resultados para bancos de células Vero de trabajo (LS-11, lote FA106611 elaborado el 29 de abril de 2002 y LS-12, lote FA115772 elaborado el 23 de julio de 2002), en el pasaje 147^o en sobrenadantes

Pruebas	Criterios de aceptación	Resultados para LS-11	Resultados para LS-12
Prueba de detección de transcriptasa inversa (prueba bioquímica)	Ausencia de actividad de transcriptasa inversa	Cumple	Cumple
Prueba de detección de transcriptasa inversa (PERT)	Ausencia de actividad de transcriptasa inversa	Cumple	Cumple

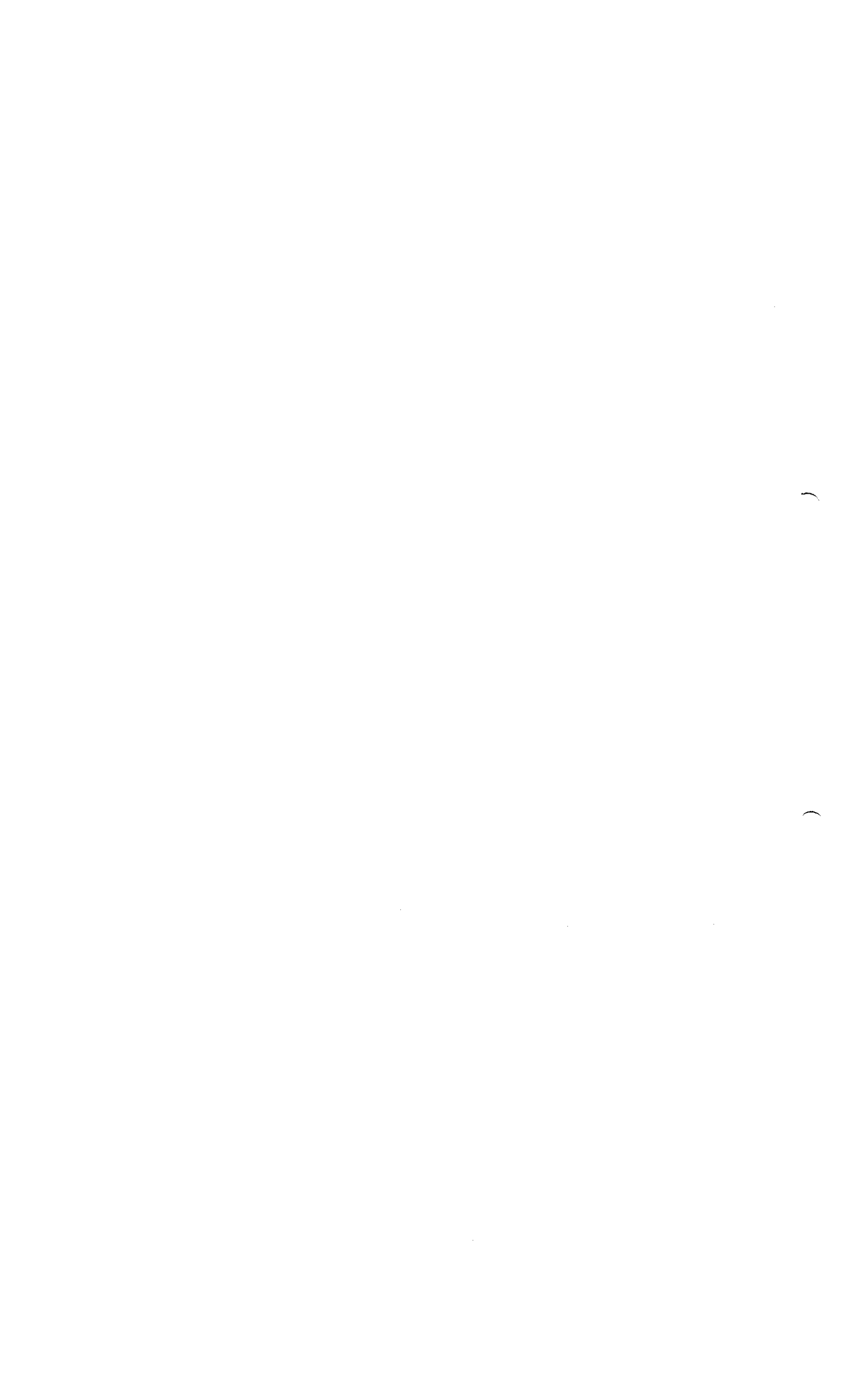




Lista de referencias

- 1 Terasima T. and Yasukawa M.: Biological properties of Vero cells derived from the present stock, Vero Cells: Origin Properties and Biomedical Applications, Department of Microbiology, School of Medicine Chiba University. 1988, 32-5.

*





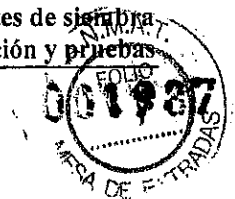
3.2.S.2.3

Sistema de Lotes de Siembra, Caracterización y Pruebas - IPV


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANOFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
APODERADO
SANOFI PASTEUR S.A.



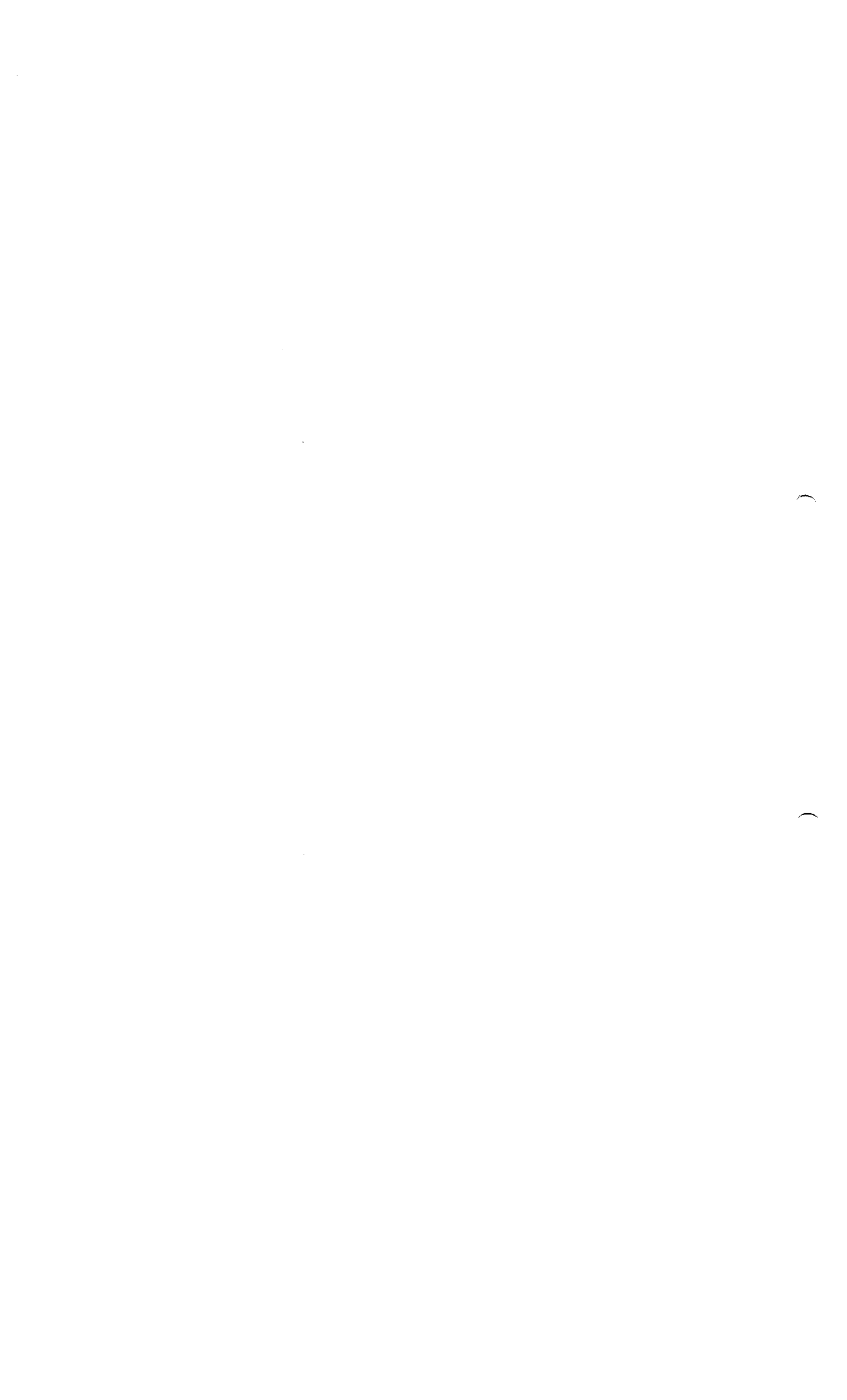


Sección 3.2.S.2.3 Control de materiales

Sistema de lotes de siembra de virus, caracterización y pruebas

Índice

Lista de tablas	3
1 Origen y preparación de las cepas virales vacunales	4
1.1 Panorama del sistema de lotes de siembra de poliovirus	4
1.2 Preparación de los lotes de siembra de poliovirus	5
1.2.1 Lotes de siembra maestros	5
1.2.2 Lotes de siembra submaestros	5
1.2.3 Lotes de siembra de trabajo	5
2 Especificaciones de los lotes de siembra de poliovirus	7
2.1 Lotes de siembra maestros	7
2.1.1 Pruebas de control del mono como fuente de células primarias de riñón	7
2.1.2 Pruebas de control realizadas en los lotes de siembra maestros	7
2.2 Lotes de siembra submaestros	7
2.2.1 Pruebas de control realizadas en los lotes de siembra submaestros	7
2.3 Pruebas de control realizadas en los lotes de siembra de trabajo	8
3 Procedimientos analíticos	12
3.1 Prueba de detección de <i>Mycobacteria in vitro</i>	12
3.2 Prueba de detección de agentes extraños en animales	12
3.3 Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> por epifluorescencia	13
<i>Prueba realizada en el sobrenadante de las células de control</i>	13
3.3.1 Referencia	13
3.3.2 Principio	13
3.3.3 Equipos	13
3.3.4 Reactivo	14
3.3.5 Procedimiento operativo	14
3.3.6 Lectura, cálculo, resultados	16
3.3.7 Criterios de validez	16





3.4	Detección de actividad de transcriptasa inversa mediante el análisis de transcriptasa inversa estimulada con productos fluorescentes (FPERT)	17
3.4.1	Principio	17
3.4.2	Muestras	18
3.4.3	Procedimiento operativo.....	19
3.4.4	Criterios de validez.....	19
3.5	Detección de virus símico 40 (SV40)	19
3.5.1	Principio	19
3.5.2	Muestras	19
3.5.3	Lectura, cálculo, resultados	20
3.5.4	Criterios de validez.....	20
4	Resultados de control.....	21


ROXANA MONTEMILONE
DIRECTORA TÉCNICA
SANIFI PASTEUR S.A.


CHRISTIAN DOMÍNGUEZ
OPERARIO
SANIFI PASTEUR S.A.





Lista de tablas

Tabla 1: Derivación de las cepas originales (SO) de poliovirus4

Tabla 2: Perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus del tipo 1, 2 y 3, pruebas realizadas en las células de control8

Tabla 3: Perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3: pruebas realizadas en los sobrenadantes de las células de control9

Tabla 4: Perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3, pruebas realizadas en la suspensión viral10

Tabla 5: Perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3, pruebas realizadas en la suspensión viral concentrada.....11

Tabla 6: Preparación celular15

Tabla 7: Preparación de la amplificación15

Tabla 8: Preparación de la siembra celular.....16

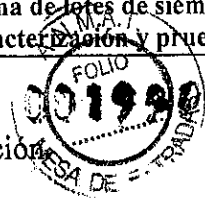
Tabla 9: Resultados para los lotes de siembra de trabajo FA350158 (poliovirus tipo 1), FA189575 (poliovirus tipo 2) y FA331115 (poliovirus tipo 3) en células de control.....21

Tabla 10: Resultados para los lotes de siembra de trabajo FA350158 (poliovirus tipo 1), FA189575 (poliovirus tipo 2), FA331115 (poliovirus tipo 3) en sobrenadantes de células de control.....22

Tabla 11: Resultados para los lotes de siembra de trabajo FA350158 (poliovirus tipo 1), FA189575 (poliovirus tipo 2), FA331115 (poliovirus tipo 3) en suspensión viral23

Tabla 12: Resultados para los lotes de siembra de trabajo FA350158 (poliovirus tipo 1), FA189575 (poliovirus tipo 2), FA331115 (poliovirus tipo 3) en suspensión viral concentrada.....24





Lista de abreviaturas: vea la sección 2.3 Resumen general de calidad, Introducción

1 Origen y preparación de las cepas virales vacunales

1.1 Panorama del sistema de lotes de siembra de poliovirus

La producción de vacuna antipoliomielítica se basa en un sistema de lotes de siembra compuesto por lotes de siembra maestros, lotes de siembra submaestros y lotes de siembra de trabajo.

El poliovirus existe en tres serotipos y por lo tanto el principio activo de la vacuna es una mezcla trivalente de los serotipos. Los tres serotipos utilizados por el fabricante, llamados serotipos 1, 2 y 3, corresponden a las siguientes cepas:

- Tipo 1: Mahoney (código 74/3 B3)
- Tipo 2: MEF-1 (código 68/2 B3)
- Tipo 3: Saukett (código 74/2 B2)

El origen de cada cepa se muestra en la Tabla 1. El RIJKS Instituut voor de Volksgezondheid (RIV), Bilthoven, Países Bajos, preparó el virus en células primarias de riñón de mono *Cynomolgus*. Estas cepas originales (SO) se le proporcionaron a sanofi pasteur (anteriormente el Institut Mérieux) el 4 de febrero de 1977 y se conservaron a ≤ -60 °C.

Tabla 1: Derivación de las cepas originales (SO) de poliovirus

Designación	Tipo 1 Mahoney 74/3 B3	Tipo 2 MEF-1 68/2 B3	Tipo 3 Saukett 74/2 B2
Origen	Compañía Pitman Moore.	Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca.	Statens Serum Institute, Copenhague, Dinamarca.
Pasajes en	Células primarias de riñón de mono (<i>Cynomolgus</i>).		
Proveedor	RIJKS Instituut voor de Volksgezondheid (RIV), Bilthoven, Países Bajos.		



1.2 Preparación de los lotes de siembra de poliovirus

1.2.1 Lotes de siembra maestros

Según lo establecido en la Ph. Eur. § 5.2.1 (terminología utilizada en las monografías de vacunas) lo que antes se llamaban "lotes de siembra primarios" se designan ahora con el término "lotes de siembra maestros". Los términos anteriores pueden encontrarse en la documentación adjunta (p. ej., certificados de análisis) ya que no se publicaron de nuevo.

Tras recibirlas del RIJKS Institute, cada una de las tres cepas virales fue sometida a un único pasaje en células primarias de riñón de mono (*Erythrocebus patas*) para obtener los lotes de siembra maestros SO + 1 del virus tipo 1, 2 o 3.

Los lotes de siembra maestros se conservan a ≤ -60 °C.

1.2.2 Lotes de siembra submaestros

Derivados de los lotes de siembra maestros, los lotes de siembra submaestros (SO + 2) se obtuvieron tras un pasaje en células primarias de riñón de mono (antes de 1981) o en células Vero (desde 1981). Antes de 1987, estos lotes de siembra submaestros se utilizaron como lotes de siembra de trabajo.

Los lotes de siembra submaestros se conservan a ≤ -60 °C.

1.2.3 Lotes de siembra de trabajo

Los lotes de siembra de trabajo utilizados actualmente (desde 1987) se encuentran al nivel SO + 3. Todos se derivaron del lote de siembra submaestro SO + 2 tras un pasajes en células Vero.

Los lotes de siembra de trabajo de virus se preparan de conformidad con la Serie de informes técnicos (TRS) de la Organización Mundial de la Salud en vigor en el momento de su elaboración. Desde 1981 se han utilizado células Vero como sustrato celular. El virus en la etapa de lote de trabajo se produce del mismo modo descrito para la producción de la propia vacuna (vea las secciones 3.2.S.2.2 Cultivo y cosecha celular y 3.2.S.2.2 Reacciones de purificación y modificación, llenado, almacenamiento y transporte) salvo que la suspensión viral no está inactivada. Además, para reducir al mínimo el volumen almacenado, la suspensión se concentra por ultrafiltración, se homogeneiza y se filtra, pero no se purifica. En la Figura 1 se presenta un diagrama de flujo que describe la producción de los lotes de siembra de trabajo y las pruebas de control de calidad realizadas en cada etapa.

Los lotes de siembra maestros del virus se conservan a ≤ -35 °C.

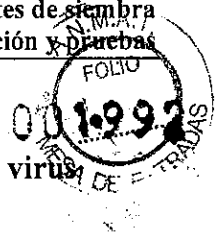
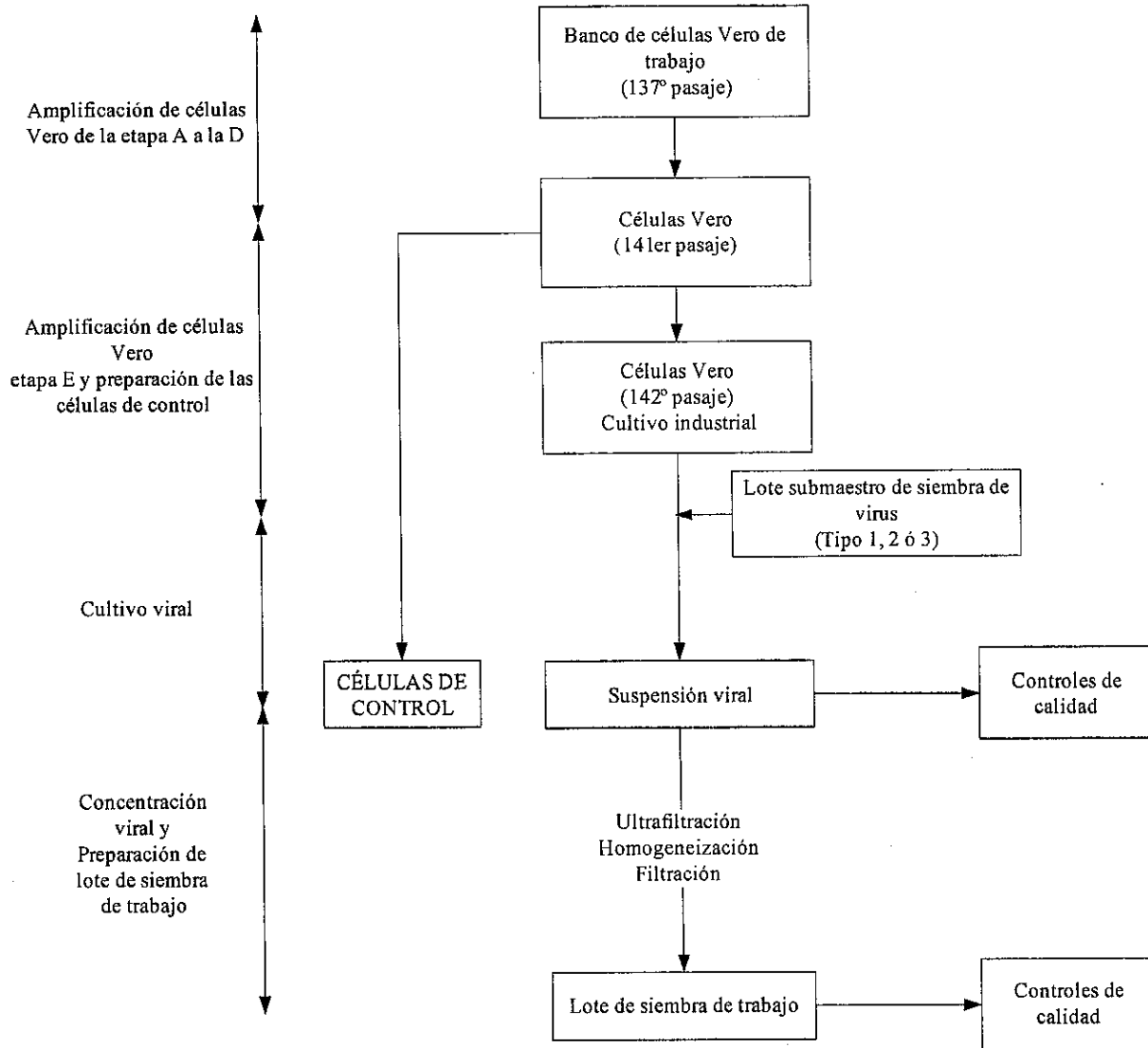


Figura 1: Diagrama de flujo de elaboración de los lotes de siembra de trabajo del virus preparados en células Vero







2 Especificaciones de los lotes de siembra de poliovirus

2.1 Lotes de siembra maestros

Los lotes de siembra maestros del virus se prepararon en células primarias de riñón de mono (*Erythrocebus patas*).

2.1.1 Pruebas de control del mono como fuente de células primarias de riñón

- Cuarentena

Los monos se mantuvieron en grupos de cuarentena durante un período mínimo de 6 semanas antes de su uso, en animalarios bien contruidos. Se adoptaron precauciones adecuadas para prevenir las infecciones cruzadas entre jaulas.

- Controles post mórtem

Los monos de los que se habían de extraer los riñones fueron examinados exhaustivamente en la necropsia, principalmente para detectar pruebas de infecciones por tuberculosis y virus del herpes símico (virus B). Además, se llevaron a cabo controles histológicos en muestras de los riñones, el hígado y el bazo.

2.1.2 Pruebas de control realizadas en los lotes de siembra maestros

Las cepas de poliovirus han sido aprobadas por la autoridad nacional de control y fueron identificadas mediante pruebas de infectividad y métodos inmunológicos. Los lotes de siembra maestros se controlaron de conformidad con los requisitos de la OMS vigentes en ese momento (1977). Inicialmente, los lotes de siembra maestros de virus se controlaron para detectar la ausencia de virus B en conejos, prueba de esterilidad bacteriana y fúngica, ausencia de *Mycobacteria*, ausencia de SV40 y de otros agentes extraños detectables por inoculación en células primarias de riñón de mono, ausencia del virus Marburg por inoculación de cobayo, identidad y concentración de poliovirus. Se observaron la células de control para detectar la ausencia de efecto citopático (CPE).

2.2 Lotes de siembra submaestros

Los lotes de siembra submaestros utilizados actualmente fueron producidos durante el período 1977-1981. En aquella época se utilizaban también como lotes de siembra de trabajo (ver el capítulo 1.2.2).

2.2.1 Pruebas de control realizadas en los lotes de siembra submaestros

Los lotes de siembra submaestros se controlaron y liberaron como lotes de siembra de trabajo y de conformidad con los requisitos de la OMS vigentes en el momento de las pruebas. Por lo tanto, se verificó la suspensión viral para detectar la ausencia de virus B en conejos, prueba de esterilidad



bacteriana y fúngica, ausencia de *Mycobacteria* y ausencia de *Mycoplasma* por el método de cultivo y por epifluorescencia en cultivo celular, ausencia de SV40 y de otros agentes extraños detectables por inoculación en células primarias de riñón de mono, identidad y concentración de poliovirus.

En caso de producción de nuevos lotes de siembra submaestros posteriores, se controlarán de conformidad con los requisitos actuales de la Farmacopea Europea (Ph. Eur.) y los requisitos de la OMS y de acuerdo con la tecnología más reciente.

2.3 Pruebas de control realizadas en los lotes de siembra de trabajo

Las especificaciones de los lotes de siembra de trabajo de virus se presentan en la Tabla 2 a la Tabla 5.

El perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3 comprende pruebas de control de calidad realizadas en los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3 y pruebas de control de calidad realizadas en las células de control y en los sobrenadantes de las células de control.

Las pruebas de control de calidad realizadas en las células de control, sobrenadante de las células de control y lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3 cumplen con los requisitos de la monografía 0214 de la Ph. Eur. y de la TRS de la OMS n.º 910 (2002) apéndice 2.

Tabla 2: Perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus del tipo 1, 2 y 3, pruebas realizadas en las células de control

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Observación	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual. Detección del efecto citopático mediante microscopía óptica.	Ausencia de efecto citopático debido a agentes extraños.
Prueba de virus hemadsorbentes	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual. Contacto con glóbulos rojos de cobayo.	Ausencia de hemadsorción.
Identificación de células de simio (línea celular continua Vero)	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.7.1, edición actual. Análisis de isoenzimas (lactato deshidrogenasa, fosfogluconato deshidrogenasa, glucosa fosfato isomerasa) mediante enfoque isoeléctrico (IEF)	Identificación positiva





Tabla 3: Perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3: pruebas realizadas en los sobrenadantes de las células de control

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Prueba de agentes extraños utilizando células: - Línea celular continua Vero - Células diploides humanas MRC-5 - Células primarias de riñón de mono	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual. Inoculación de los sobrenadantes en las monocapas de cada tipo de célula. Detección del efecto citopático.	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> con el método de cultivo	/	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual. Inoculación en dos medios (líquido y sólido). Incubación en condiciones aerobias y anaerobias.	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	/	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual. Epifluorescencia.	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.

Tabla 4: Perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3, pruebas realizadas en la suspensión viral

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Identificación de poliovirus (tipo 1 o 2 o 3)	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Verificación de la neutralización del efecto citopático del poliovirus en células sensibles (células Hep-2) con un antisuero específico del tipo.	Positiva: poliovirus tipo 1, 2 o 3.
Concentración de poliovirus (tipo 1 o 2 o 3)	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Observación del efecto citopático del poliovirus en células sensibles (células Hep-2) y cálculo de la dosis infecciosa 50 % de cultivo de tejido (DICC ₅₀).	>10 ⁷ DICC ₅₀ /mL
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual. Filtración por membrana. Utilización de 2 medios diferentes.	No se observa crecimiento microbiano.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> por el método de cultivo	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual. Inoculación en dos medios (líquido y sólido). Incubación en condiciones aerobias y anaerobias.	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual. Epifluorescencia.	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.
Prueba de detección de <i>Mycobacteria in vitro</i>	Ph. Eur. 0214, edición actual	Ph. Eur. 2.6.2, edición actual. Inoculación de dos medios nutrientes sólidos y de un medio nutriente líquido.	Ausencia de <i>Mycobacteria</i> .
Prueba de detección de agentes extraños en animales: - Conejos - Ratones adultos - Ratones lactantes - Cobayos	Ph. Eur. 0214, edición actual	Ph. Eur. 2.6.16, edición actual. Inoculación en cada animal.	Sin pruebas de infección con ningún agente extraño en cada tipo de animal.
Prueba de agentes extraños utilizando células: - Línea celular continua Vero - Células diploides humanas MRC-5 - Células primarias de riñón de mono	Ph. Eur. 0214, edición actual	Según la Ph. Eur. 2.6.16, edición actual. Subcultivo en monocapas de cada tipo celular. Detección del efecto citopático. Prueba de hemadsorción.	Ausencia de efecto citopático para cada tipo de célula. Ausencia de hemadsorción para cada tipo de célula.
Prueba de detección de transcriptasa inversa	/	PERT (PCR cuantitativa).	Ausencia de actividad de transcriptasa inversa.
Detección de virus símico 40 (SV40)	TRS 910	Reacción en cadena de la polimerasa (q-PCR).	Ausencia de ADN de SV40.



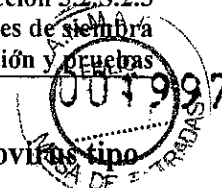


Tabla 5: Perfil de control de calidad de los lotes de siembra de trabajo de los poliovirus tipo 1, 2 y 3, pruebas realizadas en la suspensión viral concentrada

Pruebas	Requisitos	Métodos	Criterios de aceptación
Identificación de poliovirus (tipo 1 o 2 o 3)	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Verificación de la neutralización del efecto citopático del poliovirus en células sensibles (células Hep-2) con un antisuero específico del tipo.	Positiva: poliovirus tipo 1, 2 o 3.
Concentración de poliovirus (tipo 1 o 2 o 3)	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Observación del efecto citopático del poliovirus en células sensibles (células Hep-2) y cálculo de la dosis infecciosa 50 % de cultivo de tejido (DICC ₅₀).	Para información (DICC ₅₀ /mL).
Prueba de esterilidad bacteriana y fúngica	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Ph. Eur. 2.6.1, edición actual. Filtración por membrana. Utilización de 2 medios diferentes.	No se observa crecimiento microbiano.
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> por el método de cultivo	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual. Inoculación en dos medios (líquido y sólido). Incubación en condiciones aerobias y anaerobias.	Sin crecimiento de <i>Mycoplasma</i> .
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular	Ph. Eur. 0214, edición actual. TRS 910	Según la Ph. Eur. 2.6.7, edición actual. Epifluorescencia.	No se detectó <i>Mycoplasma</i> mediante epifluorescencia en cultivo celular.

