



**ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO
Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS PRIMARIAS DE QUERATINOCITOS *IN*
*VITRO***

Wyner Andrés Angulo Bustos

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2017

**ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO
Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS PRIMARIAS DE QUERATINOCITOS *IN*
*VITRO***

Wyner Andrés Angulo Bustos

Trabajo de grado para optar por el título de pregrado en Química Farmacéutica

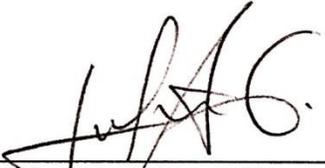
Tutor: Julián Arbey González Ospina M. Sc

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2017

Aprobado Por:



Alejandra Jerez
Evaluador



Julián Arbey González
Tutor del Proyecto

Santiago de Cali, 09 Agosto 2017

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis agradecimientos por todas las facilidades otorgadas por la universidad Icesi para poder llevar a cabo la realización de este proyecto, además de permitirme realizar mi formación académica.

Agradezco profundamente a mi familia, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo ellos el pilar fundamental en mi crecimiento personal y profesional. Depositando siempre toda la confianza en cada reto y meta que me propuse, sin dudar de mis capacidades para lograrlas.

También expreso mis más sinceros agradecimientos al profesor Julián González, tutor de este proyecto, por la orientación, seguimiento y supervisión del mismo. De igual manera, a los profesores que, por sus consejos, palabras de apoyo y motivación contribuyeron en la culminación de este proyecto.

Finalmente agradezco a mi pareja por su apoyo incondicional, por el amor recibido, los consejos, críticas y comprensión cuando en ocasiones sustraje de su tiempo para alentarme y poder seguir adelante, cuando a veces sentía que me iba a rendir. Por la paciencia con la que cada día se preocupaba por mi avance y finalización de este proyecto, es simplemente único.

Por último, y no menos importantes, mis amigos más cercanos, gracias por estar presente, no solo en esta etapa sino por cada momento vivido durante todos estos años de formación académica, por las alegrías y tristezas compartidas, por los triunfos y fracaso no logrados, pero que sin importar cual fuese el motivo, estuvieron siempre ahí presentes brindándome su fuerza y apoyo incondicional. ¡GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN DEL TRABAJO.....	10
ABSTRACT.....	12
1 INTRODUCCIÓN.....	13
2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	15
2.1 Planteamiento y justificación del problema	15
2.2 Marco Teórico y estado del arte	17
2.2.1 La piel: estructura y función	17
2.2.2 Antecedentes e historia del cultivo celular <i>in vitro</i>	19
2.2.3 Aislamiento de células epidérmicas: cultivos <i>in vitro</i>	22
2.3 Objetivos.....	25
2.3.1 Objetivo general	25
2.3.2 Objetivos específicos	25
2.4 METODOLOGÍA.....	26
2.4.1 Animales Experimentales.....	26
2.4.2 Preparación de reactivos y materiales	26
2.4.3 Preparación de ratas recién nacidas para la remoción de la piel	27
2.4.4 Remoción de la piel de ratas recién nacidas.....	28
2.4.5 Tratamiento de la epidermis con tripsina.....	29
2.4.6 Aislamiento de queratinocitos primarios de la epidermis de ratas recién nacidas	29
2.4.7 Cultivo de queratinocitos primarios	31
2.4.8 Determinación de Viabilidad celular	31
2.5 Resultados.....	33
2.6 Discusión	45
2.7 Conclusiones	52
2.8 Recomendaciones	53
2.9 Referencias.....	54

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para células de mamífero.	23
Tabla 2 Características y tiempo de duración de cada cultivo de queratinocitos a partir de epidermis de ratas neonatales.	33
Tabla 3 Subcultivo celular y tiempo de duración de cada cultivo de queratinocitos a partir de las epidermis tratadas.	33
Tabla 4 Resultados de las concentraciones de células y viabilidad de los cultivos celulares de queratinocitos a partir del tejido epidérmico.	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes estructurales de la piel Fuente: (Mackneil, 2007).....	17
Figura 2. Capas de la epidermis Fuente: (Moore & Wilkinson, 1990)	19
Figura 3. Procedimiento para la extracción de la epidermis en ratas neonatales.	28
Figura 4. tratamiento enzimático de la epidermis con tripsina sin EDTA.	29
Figura 5. procedimiento para el aislamiento de queratinocitos primarios a partir de epidermis de ratas neonatales.	30
Figura 6. Cultivo de queratinocitos primarios a partir de epidermis de ratas neonatales.	31
Figura 7. Esquema de una cámara Neubauer y distribución de los recuadros para el conteo. Fuente: (González, 2012).....	32
Figura 8. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 1 (plato de cultivo No. 1) en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (E) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x), (F) a los 38 días de cultivo (objetivo 10x).....	35
Figura 9. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 1 (plato de cultivo No. 2) en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (G) queratinocitos y fibroblastos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (H) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (I) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (J) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (K) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x), (L) a los 38 días de cultivo (objetivo 10x).	36
Figura 10. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 2 (plato de cultivo No. 1 centrifugado No. 1) en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (E) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x), (F) a los 32 días de cultivo (objetivo 10x).	38
Figura 11. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 2 (plato de cultivo No. 2 centrifugado No. 2) en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (G) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (H) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (I) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (J) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (K) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x).	39
Figura 12. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de las epidermis 3 y 4 en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 10 días de cultivo	

(objetivo 10x), (E) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x), (F) a los 31 días de cultivo (objetivo 10x).41

Figura 13. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 5 en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (E) a los 25 días de cultivo (objetivo 10x).42

Figura 14. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de subcultivo de epidermis 3 y 4 en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 8 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 14 días de cultivo (objetivo 10x).43

Figura 15. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos del subcultivo de epidermis 5 en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 8 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 14 días de cultivo (objetivo 10x).44

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de Marco Lógico.....	57
Anexo 2. Carta aprobación comité ética proyecto “Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la Enfermedad de Alzheimer” por el cual se utilizaron los tejidos epidérmicos sobrante de los biomodelos utilizados para la presente investigación.	60

RESUMEN DEL TRABAJO

La ingeniería de tejidos es una disciplina que aplica los conocimientos de la ingeniería y de las ciencias naturales para entender la relación estructura-función en los tejidos normales y patológicos de los mamíferos para desarrollar sustitutos biológicos y así restaurar, mantener y mejorar sus funciones (R, 1991).

Los queratinocitos son los tipos de células predominantes en la epidermis, los cuales constituye el 90% de las células que se encuentran allí. Los queratinocitos se encuentran en la capa basal de la piel y se denominan a veces como "células basales" o "queratinocitos basales". Los queratinocitos son uno de los escasos tipos de células animales en las cuales se pueden desarrollar y diferenciar en diferentes tipos de cultivo *in vitro* como: cultivo de explantes, cultivo de células disociadas, cultivo tridimensional y cultivo de líneas celulares. Gracias a cada una de estas modalidades, la alta viabilidad en cultivo, aislamiento y maduración de los queratinocitos ha permitido investigar nuevas alternativas y protocolos, con el fin de mejorar el rendimiento celular *in vitro* (Gil-Loizaga, 2011).

El aislamiento y cultivo de queratinocitos epidérmicos en ratón o ratas es una técnica común que permite fácilmente la manipulación genética. Sin embargo, debido a su limitada esperanza de vida en el cultivo, los experimentos que utilizan queratinocitos primarios requieren un gran número de animales, tiempo y dinero. Es por esto que este proyecto de investigación buscó estandarizar un protocolo para el aislar la mayor cantidad de queratinocitos *in vitro*, y que permitieran mantenerse por más tiempo este tipo de líneas celulares en condiciones *in vitro*. Para esto, se usó ratas Wistar en estadio P0 a P2, ya que en estos estadios se encuentran mayor cantidad de queratinocitos basales no diferenciados. Se realizó un tratamiento enzimático con tripsina durante 18h a 4°C para facilitar el aislamiento de los queratinocitos. Luego de esto, se realizó una centrifugación de las células, para separarlas de otros componentes presentes. Se cultivaron de acuerdo a la densidad celular estimada por conteo celular en cámara Neubauer. Finalmente se cultivaron en platos de cultivo de 25cm² y 75cm², de acuerdo a la densidad celular obtenida.

Los resultados obtenidos de esta investigación, mostraron que se pudieron establecer cultivos primarios de queratinocitos basales, que, aunque no se evidenció algún cambio en su morfología típica cuando están en cultivo, y proliferación hasta llegar a confluencia, se lograron mantener los cultivos durante un periodo de un mes, con una viabilidad mínima del 66% y en promedio del 87%±14, proporcionando una metodología sencilla para el aislamiento de queratinocitos en condiciones *in vitro* que sea utilizado para futuras investigaciones en ciencias básicas y aplicadas.

Palabras claves: cultivo *in vitro*, queratinocitos basales, aislamiento, disgregación enzimática, ratas Wistar.

ABSTRACT

Tissue engineering is a discipline that applies the knowledge of engineering and natural sciences to understand the structure-function relationship in normal and pathological tissues of mammals to develop biological substitutes and thus, restore, maintain and improve their functions (R, 1991).

Keratinocytes are the predominant types of cells in the epidermis, which constitute 90% of the cells that are there. Keratinocytes are found in the basal layer of the skin and sometimes are referred to as "basal cells" or "basal keratinocytes". Keratinocytes are one of the few types of animal cells in which they can develop and differentiate into different types of *in vitro* cultures such as: culture explants, dissociated culture cells, tridimensional culture and culture of cell lines. Thanks to each of these modalities, the high viability in culture, isolation and maturation of keratinocytes has allowed to investigate new alternatives and protocols, to improve cellular performance *in vitro* (Gil-Loizaga, 2011).

Isolation and culture of epidermal keratinocytes in mice or rats is a common technique that readily allows genetic manipulation. However, because of their limited life expectancy in the culture, experiments using primary keratinocytes require many animals, time and money. That is why this research project sought to standardize a protocol for the isolation of the largest number of keratinocytes *in vitro*, and to allow this type of cell line to continue for a long time in *in vitro* conditions. For this, we used Wistar rats in stage P0 to P2, since in these stages we find more undifferentiated basal keratinocytes. An enzymatic treatment with trypsin was carried out for 18 hours at 4 ° C to facilitate the isolation of the keratinocytes. After this, cells were centrifuged to separate them from other components present. They were cultured per the cell density estimated by the cell count in the Neubauer chamber. Finally, they were cultivated in culture dishes of 25cm² and 75cm², per the cell density obtained.

The results obtained from this research showed that it was possible to establish primary cultures of basal keratinocytes which, although there was no evidence of a change in their typical morphology when they were cultivated, and proliferation until reaching confluence, the cultures were maintained for a period of one month, with a minimum viability of 66% and average of 87%±14, providing a simple methodology for the isolation of keratinocytes under *in vitro* conditions that it may be used for future research in basic and applied sciences.

Key words: *in vitro* culture, basal keratinocytes, isolation, enzymatic digestion, Wistar rats.

1 INTRODUCCIÓN

La piel constituye el órgano más grande del cuerpo humano, siendo esta una estructura dinámica y compleja integrada por células, tejidos y elementos de la matriz extracelular que median algunas funciones como: barrera física de permeabilidad, protección contra agentes infecciosos, termorregulación, reparación de heridas y regeneración, además de proteger al individuo de las agresiones del medio ambiente. También posee un papel importante en otras funciones vitales, tales como metabólicas, nerviosas y psicológicas (Gartner LP, 2002).

La piel, anatómicamente se encuentra dividida en dos capas: la epidermis y la dermis. La epidermis es la capa superficial y cumple una función protectora. Sin embargo, la dermis se encarga de proveer firmeza y elasticidad. La epidermis consiste en varias capas de células epiteliales (queratinocitos), y se encuentra adherida a la dermis por la membrana basal.

Los queratinocitos son las células que forman la mayor parte de la epidermis, puesto que representan alrededor de un 90% de las células epidérmicas. Tienen un origen ectodérmico y se organizan formando un epitelio estratificado plano queratinizado (Gil-Loizaga, 2011). Gracias a la alta proporcionalidad en la epidermis, las metodologías acerca de cultivos celulares *in vitro* de células animales se han convertido en herramientas vitales para la investigación en ciencia básica y aplicada de la Biomedicina mediante la ingeniería de tejidos.

El cultivo celular es conocido como el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, pero que mantienen sus características genéticas, bioquímicas y fisiológicas intactas, logrando aproximarse a las condiciones que deberían tener *in vivo*. Alrededor de 1975, dos investigadores (Rheinwald & Howard Green) lograron establecer las condiciones ideales para poder lograr cultivar células de queratinocitos en un tiempo no establecido a partir de un teratoma de ratón. Gracias a la continua mejora en el desarrollo de nuevas técnicas para el cultivo celular, estas han favorecido importantes logros en la investigación con el uso de biomodelos, como la disminución en el uso de los animales de experimentación y como la reducción de costos en el empleo de estas técnicas.

Actualmente existen diferentes modelos o protocolos que han provisto una poderosa herramienta para entender aspectos como la proliferación y diferenciación de queratinocitos *in vitro*, utilizando en paralelo el uso de biomodelos animales, como la epidermis de ratones o ratas. La epidermis de ratones, ha sido una de las más utilizadas, para el cultivo y asilamiento de líneas celulares. Estas se componen mayoritariamente de queratinocitos, además de

otros tipos de células en menor grado de origen no-epidérmico. Un aspecto importante en el cultivo de este tipo de células, es mantener la integridad de la epidermis y su función, por tal razón los queratinocitos sufren procesos de proliferación y diferenciación celular (G.Fiirstenberger, 1986).

Un procedimiento para el crecimiento de queratinocitos de ratones involucra un tratamiento mecánico y enzimático de una muestra de epitelio de ratón, con el objetivo de disgregar las células requeridas, para así cultivarse con el uso de diversos medios de cultivos que provean nutrientes y factores de crecimiento adecuados para el desarrollo de los mismos (Fuesing, 1975). Además de obtener una buena cantidad de células disponibles, es necesario el uso de un material que sea capaz de brindar un ambiente especial, adecuado para la adhesión, migración y proliferación para las células, con el fin de hacer un andamio que mimetice de la forma más parecida a la estructura de la piel (Freed, Biron, Eagles, & Lesnoy, 1994).

El objetivo de todos los procedimientos de aislamiento de células es maximizar el rendimiento de células disociadas que son viables y funcionalmente activas. Pero a pesar de toda la contribución científica durante todos estos años, los métodos actuales de cultivo de queratinocitos presentan algunas desventajas. El tiempo de vida útil de los cultivos primarios de ratón son cortos, su incapacidad de subcultivarse, hace que los experimentos se completen en tiempo relativamente corto de varios días después de realizado el cultivo.

Por tanto, aún quedan algunos desafíos por resolver, como la optimización de protocolos de aislamiento y mantenimiento de células *in vitro*, para así lograr desarrollos que sean económicamente sustentables, y que sean accesibles a cualquier grupo de investigación. Por tal razón, el presente trabajo de investigación buscó estandarizar un protocolo para el cultivo, aislamiento y mantenimiento de líneas celulares de queratinocitos primarios *in vitro* ajustado a las condiciones del laboratorio del grupo de investigación en Biofarmacia y Biocosmética, garantizando el rendimiento celular, la viabilidad y eficiencia del cultivo. Todo esto con el fin de otorgar a futuras investigaciones un modelo *in vitro* útil para realizar las pruebas preliminares de seguridad y tolerancia dérmica, que son usadas principalmente en biomodelos animales.

2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 Planteamiento y justificación del problema

Hernández y colaboradores, en su artículo mencionan que: El uso de los animales de laboratorio en el mundo requiere de acuerdo a ciertas características en su condición de “reactivo vivo”, un manejo y un uso que implique la garantía total de aplicación de estándares internacionales, de acuerdo a las implicaciones éticas y morales.

Desde hace mucho tiempo, se han venido utilizando los modelos animales como objetos de estudio para muchas enfermedades, siendo estos constituyentes fundamentales en distintos campos, como lo son: la docencia, la industria y la investigación. Se ha considerado que los experimentos con animales son una aproximación pequeña de estas especies como modelos a los problemas o en enfermedades humanas.

Por un lado, desde un punto de vista científico, se considera que el uso de animales es necesario para ayudar a prevenir y curar algunas enfermedades. Por otro lado, desde el punto ético y moral, hay quienes no están de acuerdo con esto, pues implicaría tratar a los modelos animales de formas que actualmente son cuestionadas, y que, en el caso de usar personas, estas no se emplearían. Por tal razón, se están buscando alternativas para tratar de reducir en cantidad el uso de modelos animales en investigación y poder así minimizar el sufrimiento que se les ocasiona.

En este orden de ideas, es necesario evaluar las situaciones en las cuales es estrictamente necesaria el empleo de animales para experimentación, y en caso de ser necesario reducir al máximo en daño y la cantidad de animales utilizados. El principio de las tres R's de Russell y Burch (Refinamiento, Reducción, Reemplazo) se basa en minimizar el daño que se puede causar a las especies animales en la experimentación científica. Este principio se apoya en herramientas estadísticas como diseños experimentales con el fin de disminuir la cantidad de especies utilizadas en la experimentación. También se debe tener en cuenta la disminución del daño o sufrimiento que se le causa a la especie sometida a experimentación (Russell & Burch, 1959).

El 11 de marzo de 2013, entró en vigor la normativa (Directiva 76/768/CEE) por la Unión Europea, donde establece la eliminación gradual de los ensayos con animales en productos cosméticos, instaurando en: “la prohibición de experimentar en animales, la prohibición de comercializar productos cosméticos que hayan sido probados en animales” (Botero & Gómez R, 2013).

Es por esto, que los avances en la metodología de cultivo celular *in vitro* han facilitado las investigaciones moleculares de la patogénesis de enfermedades como el cáncer y en el campo de investigación dermatológico como modelos análogos de epidermis para la regeneración de tejidos. Con este proyecto se busca estandarizar un protocolo de aislamiento y cultivo de queratinocitos que puedan ser utilizados como futura herramienta en el campo en la industria cosmética con la finalidad de disminuir la realización de las pruebas preliminares de seguridad y tolerancia dérmica en biomodelos animales.

2.2 Marco Teórico y estado del arte

2.2.1 La piel: estructura y función

La piel, como órgano superficial (no un órgano compacto) que reviste y protege la superficie externa del organismo. Considerado como el órgano más grande del cuerpo que, aparte de proporcionar protección contra agentes externos, este también es un órgano sensorial dotado de múltiples terminaciones nerviosas que le permiten tener sensibilidad al tacto y a la presión, a los cambios que se generan con la temperatura y a estímulos dolorosos. Por lo que a las sensaciones en general, la piel es la principal fuente de información (Palastanga, Field, & Soamers, 2000).

La piel, estructuralmente se encuentra dividida en tres capas principalmente: Epidermis, dermis y tejido subcutáneo (hipodermis), como lo muestra la siguiente imagen:

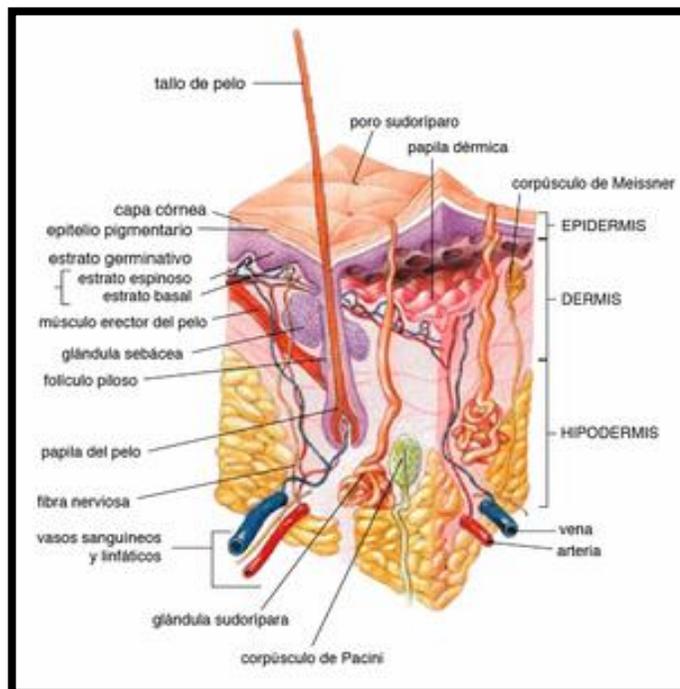


Figura 1. Componentes estructurales de la piel **Fuente:** (Mackneil, 2007)

La epidermis constituida por un delgado epitelio plano poliestratificado y queratinizado, es la que contiene el mayor número de células y posee una alta tasa de recambio. Está compuesta aproximadamente de un 90% por queratinocitos. Además de esto, contiene células pigmentarias que producen melanina (melanocitos), células dendríticas pertenecientes al sistema inmune

(células de Langerhans) y células del sistema nervioso periférico (células de Merkel) (Rassner, 1999).

La epidermis se halla constituida por diferentes capas, en la que los queratinocitos van atravesando diferentes estadios de diferenciación; de la capa más interna a la más externa, son:

a. **Capa germinativa o basal:** considerada la capa interior de la epidermis donde se encuentra en contacto directo con la lámina basal. Esta, cuenta con queratinocitos menos diferenciados, que se anclan a la membrana basal por uniones celulares.

b. **Capa espinosa:** Esta capa se sitúa por encima de la capa basal y constituye otro estadio de evolución de las células basales. Aquí, las células de queratinocitos tienen una forma más o menos poliédrica y con un tamaño alrededor de 15 μm .

c. **Capa granulosa:** Esta capa se compone de tres a cinco capas de células aplanadas, cuyo citosol contienen gránulos de una sustancia característica, la cual es precursora de la queratina, llamada querato-hialina.

d. **Capa lúcida:** Esta es una capa transitoria desde el estrato granuloso al estrato córneo y donde existe un alto porcentaje de rozamiento entre los estratos.

e. **Capa córnea:** Es la capa más superficial, contiene células planas queratinizadas sin núcleos llamados corneocitos y están compuestos principalmente por queratina.

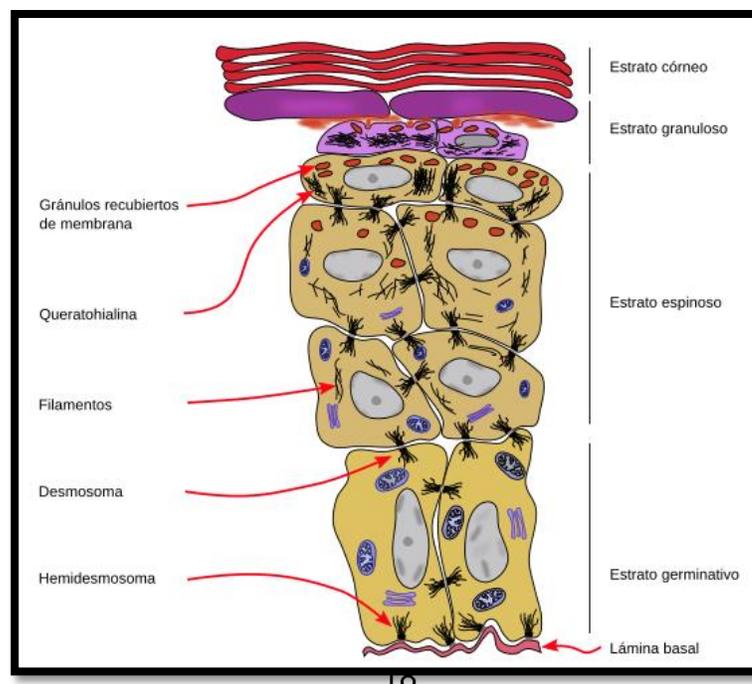


Figura 2. Capas de la epidermis **Fuente:** (Moore & Wilkinson, 1990)

Por otro lado, la dermis se encuentra compuesta por tejido conectivo, donde en este caso sus células, los fibroblastos, se encuentran rodeados por una matriz de colágeno (tipo I), fibronectina, elastina y otras proteínas de andamios que hacen parte del citoesqueleto (Mast, 1992).

En el desarrollo para cultivos de queratinocitos, investigaciones muestran que el primer método implementado para este tipo de células, usó capas de alimentación de fibroblastos (feeder layer) como substrato de adhesión. A partir de ese momento, se han llevado a cabo distintas metodologías para el cultivo de queratinocitos humanos, utilizando diferentes medios de cultivo y con diversos suplementos que le permitan un exitoso desarrollo y crecimiento del cultivo. Todo esto, con el fin de poder contribuir, no sólo a la recuperación de la piel en pacientes con traumas superficiales, sino también, al desarrollo de la investigación de la ingeniería de tejidos (Amórtegui & Rocío, 2008).

2.2.2 Antecedentes e historia del cultivo celular *in vitro*

Las técnicas de cultivos celulares empezaron a desarrollarse a mediados del siglo XIX. Sin embargo, no es sino hasta 1885 en donde se observan las primeras referencias para el cultivo celular, gracias a Wilhelm Roux, en donde cultivó células de embrión de pollo en solución salina durante algunos días. Desde entonces, el conocimiento de cómo cultivar células *in vitro* ha aumentado considerablemente (Gil-Loizaga, 2011).

El zoólogo americano R. G. Harrison, fue considerado como el fundador de realizar los primeros cultivos de tejido animal. Un ejemplo de esto, fue en 1097, donde empleó técnicas *in vitro* para poder realizar estudios de fenómenos *in vivo*, en los cuales utilizaba cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios (Eugenia, 2009).

Tratar de obtener un medio de cultivo que aportara todos los nutrientes necesarios para la proliferación de las células embrionarias, era una limitante en esa época. En 1910, Burrows, quien utilizó plasma para nutrir explantes de tejidos embrionarios de pollo, observó que, con este medio, obtuvo mejor crecimiento del cultivo que con otros medios utilizados con anterioridad. A partir de esta fecha hasta la década de los 50 se establecieron los medios de cultivos y condiciones para el desarrollo y crecimiento de los cultivos celulares, y el aislamiento de las primeras líneas celulares, como las células HeLa (Castaño, 2000).

En los siguientes años, entre los años 1960 y 1970, se realizaron algunos intentos para aislar queratinocitos de piel humana mediante la disgregación enzimática, para luego ser cultivados en monocapa (Cruickshank, 1960) (Briggaman, 1967) (Yuspa, 1970), donde demostraron las limitaciones que tenían estos primeros cultivos y que en estos no podían realizarse subcultivos.

Fueron (Rheinwald & Green, 1975) los primeros que, en 1975 realizaron un método efectivo donde realizaban un co-cultivo de queratinocitos junto con otras células, (*feeder-layer* o capas de alimentación). Usaron fibroblastos de ratón radiados (cepa 3T3) como capa de sostén, favoreciendo el crecimiento y la maduración del cultivo. Con este método se obtuvieron láminas epiteliales, de dos a ocho capas de queratinocitos con distinto grado de diferenciación.

Desde el trabajo de Rheinwald y Green ha habido más avances en las técnicas de cultivo. En los años 80, se realizaron cultivos de queratinocitos sin usar suero fetal bovino, y la eliminación de *feeder-layer*, lo que conllevó a la utilización de nuevos medios de cultivo más completos en cuanto a proteínas y factores de crecimiento.

A lo largo del siglo XX las posibilidades y aplicaciones de éstas técnicas han ido en aumento. Por tanto, los cultivos celulares han logrado obtener mayor importancia, no solo en disciplinas de ciencias básicas sino también, en ciencias de la salud. A partir de todos estos estudios y desarrollos, se han podido establecer los cultivos celulares como parte de muchas investigaciones para la síntesis de anticuerpos, fármacos o los “bancos celulares” (Gil-Loizaga, 2011).

A partir del año 2000 hasta la fecha, los estudios sobre los cultivos de queratinocitos *in vitro* han tomado nuevos enfoques, como lo muestran (Carrol & Molés, 2000) en su artículo titulado “*A three-dimensional skin culture model for mouse keratinocytes: application to transgenic mouse keratinocytes*” en donde adaptan un modelo para queratinocitos de ratón para así mostrar que la neo-epidermis puede llegar a ser reconstruida exhibiendo un programa completo de diferenciación. Además de esto, usando este modelo en cultivos de queratinocitos en ratas transgénicas.

Por otro lado, (Zhang, Yang, & Singh, 2002) mejoraron un método para el cultivo de células epidérmicas a partir de células madre de queratinocitos de epidermis de ratas recién nacidas. Para esto, tomaron ventaja de las propiedades de los queratinocitos en adherirse muy rápidamente a la matriz extracelular mediante proteínas como el colágeno tipo I y la fibronectina (componentes indispensables en el citoesqueleto de la matriz extracelular) realizando un pretratamiento a los platos de cultivo con estas proteínas, logrando una tasa de cultivos aproximadamente del 70% de éxito.

En el año 2008 (Lichti, Andres, & Yuspa, 2008), publicaron un protocolo optimizado donde, a pesar de la información de otras técnicas para el crecimiento

y mantenimiento de queratinocitos, el periodo de vida del cultivo es muy limitado. Este protocolo demuestra que utilizando un medio bajo en calcio es más eficaz para sondear las vías que regulan la fisiología basal de los queratinocitos y así poder mantener el cultivo por mucho más tiempo.

Alrededor del año 2010 y continuando con la línea establecida por Yuspa en 2008, (Reiisi, Esmaeili, & Shirazi, 2010) realizaron el aislamiento, cultivo e identificación de las células epidérmicas madres a partir de piel de ratones recién nacidos. Para este estudio, también se realizaron pre tratamientos a los platos de cultivo con fibronectina y colágeno tipo I. Adicionalmente, utilizaron anticuerpos de integrina anti- β 1 para la clasificación de células por fluorescencia activada, ya que la expresión de integrina β -1 (glicoproteínas que participan mayoritariamente en la unión de células de la matriz extracelular) es generada por los queratinocitos basales de las células epidérmicas madres. En este estudio obtuvieron grupos de queratinocitos basales a las 2 semanas de cultivo, ya que los queratinocitos crecen lentamente y se van diferenciando al cabo de un mes a partir del cultivo.

En el año 2014 (Morales, 2014), realizó como proyecto de investigación en la Universidad Icesi, el diseño, establecimiento e implementación de un protocolo para extracción y obtención de un cultivo celular de queratinocitos de mamífero (humano y animal) en el cual mediante la metodología planteada se pudo obtener el crecimiento de pequeñas colonias de queratinocitos de mamífero a pesar de no obtener una confluencia total de queratinocitos, por la contaminación de los cultivos. Este proyecto sirvió como punto de partida para optimizar y estandarizar otros métodos y protocolos para el aislamiento de este tipo de líneas celulares, con el fin de garantizar y mantener el cultivo de estas células por más tiempo para futuras investigaciones en ciencias básicas y aplicadas.

Por último, en 2015 un nuevo método para la generación de cultivos de células de queratinocitos primarios inmortalizados de ratón fue publicado por (Hammiller & El-Abaseri, 2015), en donde al seguir algunas de las metodologías anteriormente mencionadas, lograron el aislamiento de los queratinocitos en un tiempo limitado usando factores de crecimiento específicos para este tipo de líneas celulares. Después de varias semanas de crecimiento, realizaron subcultivos para adaptar a las células a nuevas condiciones de cultivo y poder así mantener su morfología y prolongar su tiempo de vida útil. En resumen, este método de generación de línea celular permite la disminución del uso de los animales, reduce el gasto y el tiempo involucrado en la investigación, y proporciona un modelo útil para los queratinocitos cutáneos de experimentación.

2.2.3 Aislamiento de células epidérmicas: cultivos *in vitro*

Actualmente, el cultivo celular es conocido como el conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células *in vitro*, pero que mantienen sus características genéticas, bioquímicas y fisiológicas intactas, logrando aproximarse a las condiciones que deberían tener *in vivo*. Se puede hablar de varios tipos de cultivos, siempre y cuando dependan del grado en el cual se conserva la estructura del tejido o órgano proveniente, tal como: cultivo de órganos, de explantes (primario o secundario), entre otros (cultek, 2016).

Los cultivos *in vitro* son considerados de gran importancia en el ámbito de la investigación científica, ya que, gracias a estos, se pueden llegar a realizar distintos tipos de estudios, algunos relacionados con toxicología, inmunología, farmacología, ingeniería de tejidos, entre otros (Arroyo, Ortiz, & Gómez, 2014).

Al realizar un cultivo celular, uno de los factores más importantes para el buen desarrollo y crecimiento de este es la asepsia. Puesto que, si esta no se controla desde el uso de materiales estériles hasta el uso de implementos de seguridad por parte del investigador, esto conlleva a que no se obtenga el cultivo deseado, ya que la tasa de crecimiento de las células en cultivo es mucho menor al de los contaminantes habituales como hongos, levaduras y bacterias. Existen diversos métodos para esterilizar los materiales y soluciones empleadas para el cultivo, éstos pueden ser por: irradiación, calor seco, calor húmedo, métodos químicos, entre otros (Freshney, 2005).

De acuerdo al contexto de cultivos de tejidos, se puede hablar de tres tipos de cultivos: cultivo de órganos, en donde se mantiene el órgano en un medio del cual obtiene nutrientes y su estructura tridimensional permanece intacta, pero que no permite su propagación. Explantes primarios, que son fragmentos de tejidos u órganos, los cuales se adhieren a una superficie, para poder así proliferar alrededor de esta. Por último, se encuentran el cultivo celular, en donde por medio de la disgregación celular, bien sea por medios mecánicos o enzimáticos se puede cultivar como una monocapa que se adhiere o suspende en un medio de cultivo (cultek, 2016).

Las células que se cultivan después de ser aisladas a partir de un órgano o tejido provenientes de un individuo, son conocidos como cultivos primarios, los cuales tienen un tiempo de vida limitado. Después de realizar cierta cantidad de pases o divisiones, las células entran en senescencia y dejan de dividirse (Chaudry, 2004).

El cultivo celular *in vitro* se realiza utilizando medios artificiales preparados mediante diferentes componentes o soluciones orgánicas fundamentales para la supervivencia, crecimiento y multiplicación celular como lo son: sales, glucosa como fuente de energía, aminoácidos (aportan nitrógeno), vitaminas, factores de

crecimiento y otros componentes nutritivos que participan en el proceso de división celular, logrando así todas las condiciones posibles en las cuales se desarrollan las células en los organismos. Además de esto, sus características físico químicas se conservan dentro de los recipientes (platos de cultivos), para así lograr mantenerlos aislados del ambiente externo, y evitar una posible contaminación. Por ello, el medio de cultivo está constituido por varios elementos relevantes al momento de prepararlos: la naturaleza del sustrato, la naturaleza y composición de la fase gaseosa y las condiciones de incubación (humedad y temperatura) y por último las características fisiológicas y físico químicas del medio (Castaño, 2000).

Los medios de cultivo están tamponados con soluciones buffer para mantener un pH alrededor de 7.4, simulando el pH fisiológico. También, tienen indicadores de pH, como el rojo de fenol, que cambia de color a medida que aparecen catabolitos ácidos, provenientes del metabolismo celular. Se adicionan al medio de cultivo, antibióticos y antimicóticos para evitar la contaminación microbiana (Eugenia, 2009). A continuación, se muestra en la tabla 1 la composición de medios de cultivo:

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para células de mamífero. **Fuente:** (Egerit, 2002)

Aminoácidos	Vitaminas	Sales	Otros compuestos*	Proteínas requeridas en los medios definidos libres de suero
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa	Insulina
Cisteína	Colina	KCl	Penicilina	Transferrina
Glutamina	Folato	NaH ₂ PO ₄	Estreptomicina	Factores de crecimiento específicos
Histidina	Nicotinamida	NaHCO ₃	Anfotericina	
Isoleucina	Pantotenato	CaCl ₂	Rojo fenol	
Leucina	Piridoxal	MgCl ₂	Suero fetal bovino	
Lisina	Tiamina			
Metionina	Riboflavina			
Fenilalanina				
Treonina				
Triptofano				
Tirosina				
Valina				

Para mantener las células cultivadas, aparte de los anteriores componentes ya mencionados, también deben ser establecidas una temperatura y mezcla de gases específica, generalmente a 37°C, 5% CO₂ y 95% O₂ en una incubadora, con los medios de cultivos adecuados según la tabla anterior, que les provean a las células todos los nutrientes esenciales para su supervivencia, desarrollo y proliferación.

Otro aspecto importante para que las células proliferen en un cultivo es necesario la existencia de suero que aporte los factores de crecimiento y las moléculas adhesivas como la fibronectina, lipoproteínas como transferrina y demás

componente. Para esto, la adición de un factor de crecimiento (péptidos de bajo peso molecular que regulan el ciclo celular) en el desarrollo y proliferación de una línea específica celular, como queratinocitos, es de gran importancia, puesto que existen diferentes tipos de factores específicos para cada línea celular, como por ejemplo: Factor de crecimiento del fibroblasto (FGF, siglas en inglés), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento plaquetario (PDGF), factor de crecimiento neuronal (NGF). De no seleccionar el factor correcto en la línea celular de la cual se está trabajando, esto puede afectar a la línea celular, ya que algunos factores pueden generar el crecimiento de otro tipo de células consideradas como contaminantes en los cultivos específicos del cual se está trabajando, ejemplo de esto: el factor de crecimiento plaquetario (PDGF) estimula la proliferación de fibroblastos, generando problemas al momento de establecer cultivos primarios de queratinocitos (Castaño, 2000). Ya que la línea celular de este proyecto, es queratinocitos, el factor de crecimiento de relevancia es el KGF o Factor de crecimiento de queratinocitos, siendo este causante de la inhibición de otro tipo de células en el proceso de diferenciación celular e incrementando el tiempo de vida del cultivo *in vitro* de queratinocitos.

Después de establecer todas las condiciones tanto físico-químicas, como fisiológica, se puede realizar el proceso del cultivo *in vitro*, permitiendo a las células estar en continua división hasta que ocupen toda el área o volumen disponible. Por otra parte, se debe realizar un cambio continuo del medio de cultivo y subcultivo de las células, cuando éstas no hayan alcanzado una confluencia total (cantidad máxima de área superficial cubiertas por células en el cultivo), puesto que, si no se realiza esto, puede generar algunos inconvenientes, tales como: el agotamiento de nutrientes, acumulación de células apoptóticas y la inhibición de la división celular, lo que conlleva a la muerte de las células y por tanto el cultivo celular (Castro, 2009).

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

- Estandarizar un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de células primarias de queratinocitos *in vitro*.

2.3.2 Objetivos específicos

- Establecer cultivos celulares primarios de tejido epidérmico a partir de ratas neonatales.
- Estimular el crecimiento de las células primarias de queratinocitos a partir factores de crecimiento.
- Determinar la concentración de células y viabilidad del cultivo celular de queratinocitos a partir del tejido epidérmico.

2.4 METODOLOGÍA

2.4.1 Animales Experimentales

Para el desarrollo del proyecto de investigación se utilizó los cuerpos restantes de ratas Wistar utilizados para el proyecto “*Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la Enfermedad de Alzheimer*” bajo la tutoría del profesor Álvaro Barrera Ph.D. Estos fueron utilizados inmediatamente después de su sacrificio, ya que la epidermis y las células de queratinocitos empiezan a degenerarse dentro de las siguientes 2 horas. Las ratas utilizadas se seleccionaron bajo las siguientes condiciones: Neonatos P0 – P2 (0 a 2 días post-natal). Se escogieron en este rango de edad, debido a que en ratas más jóvenes hay mayor abundancia de queratinocitos basales no diferenciados, los cuales son más fáciles de extraer y aislar, mientras que, para ratas mayores, los queratinocitos ya han sufrido diferenciación y se han estratificado, por tanto, el aislamiento de queratinocitos basales es mucho más difícil.

2.4.2 Preparación de reactivos y materiales

La metodología utilizada en el proyecto se basó en el protocolo “*Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice*” realizado por Yuspa y colaboradores.

Preparación de suero fetal bovino quelado (Solución de 100 mL)

Se utilizó la resina Chelex-100 (Bio-Rad, Cat. No. 1421253) al 20% para su preparación. Se pesaron 20g de la resina y se adicionó a 100mL de agua destilada. Luego de esto, se dejó agitar durante 1 hora en plancha agitadora donde se iba ajustando a pH 7.4 con HCl concentrado. Pasado el tiempo, se llevó a filtración por gravedad con papel filtro Whatman No. 1. Se eliminó el filtrado y la suspensión de resina se adicionó a 100mL de suero fetal bovino y se dejó agitar durante 1 hora (todo esto en cabina de flujo laminar para evitar contaminación microbiana). Después, se filtró primero a gravedad con papel filtro Whatman No. 1. Aquí, se descartó la suspensión de la resina sobrante en el papel filtro. Luego, se realizó una segunda filtración con un embudo de polisulfona (previamente esterilizado) con una membrana estéril con tamaño de poro de 0,22 μm y se alicuotó en tubos Falcon estériles de 50mL y se almacenaron a -20°C .

Preparación del medio bajo en calcio (0.05mM Ca²⁺) (Solución de 250mL)

225mL de EMEM (Lonza, Cat No. 06-174G), 20mL (8%) de suero fetal bovino, 2.5mL (1%) de antibióticos (penicilina/estreptomicina/anfotericina B) y 2.5mL (1%) de Glutamax-1 (GIBCO/Invitrogen, Cat No. 35050-061). Se alicuotó la solución en tubos Falcon estériles de 50mL y se almacenaron a -20°C.

Preparación del medio alto en calcio (1.3 mM Ca²⁺) (Solución de 100mL)

99.5mL de medio bajo en calcio (0.05mM Ca²⁺), 0.52 mL de solución de cloruro de calcio 0.25M (ANIARA, Cat No. AR002K). Se alicuotó la solución en tubos Falcon estériles de 50mL y se almacenaron a -20°C.

Preparación del medio de calcio para cultivo (0.2 mM Ca²⁺) (Solución de 100mL)

12.5mL de medio alto en calcio (1.3mM Ca²⁺), 87.5mL de medio bajo en calcio (0.05mM Ca²⁺). Se alicuotó la solución en tubos Falcon estériles de 50mL y se almacenaron a -20°C.

Preparación del KGF (Solución de 1mL)

Se utilizó un micro vial por 10µg de KGF liofilizado (Sigma Aldrich, Cat No.H666). Se centrifugó brevemente el micro vial antes de su preparación. Después, se restituyó en 1mL de agua estéril con concentración final de 10µg/mL. Luego, se alicuotó en tubos Eppendorf de a 100µL para luego ser adicionados a tubos de Falcón de 50mL con medio bajo en calcio (0.05 mM Ca²⁺) para el mantenimiento de los cultivos celulares con una concentración final de KGF de 10ng/mL. Los tubos Eppendorf y el micro vial se almacenaron a -20°C y los medios de cultivo con el KGF se almacenaron entre 2 a 8°C durante 3 semanas.

Nota: Los demás reactivos utilizados durante el protocolo, como: Tripsina sin EDTA 0,25% (Mediatech Cellgro, Cat No. MI 25-050-C1) y solución salina (0.9%) estéril, se alicuotaron en tubos Falcón de 50mL y se mantuvieron a -20°C y 20°C respectivamente.

2.4.3 Preparación de ratas recién nacidas para la remoción de la piel

Se sumergió la rata (o varias ratas) previamente decapitada en Iodopovidona durante 2 minutos en un tubo Falcón. Luego, se realizó lavado con etanol al 70% en otro tubo Falcón durante 2 minutos. Después de esto, se colocó en una bandeja metálica (previamente esterilizada) hasta el siguiente paso.

2.4.4 Remoción de la piel de ratas recién nacidas

Se realizó el procedimiento de remoción de la piel utilizando herramientas de disección estéril (tijeras, fórceps, pinzas, bisturí) en la superficie metálica esterilizada dentro de una cabina portátil con una simulación de ambiente estéril. Se cortaron las extremidades justo por encima de las articulaciones de la muñeca y el tobillo, dejando tocones visibles (**figura 3 a, b**). Después, se cortó la cola cerca del cuerpo, dejando un orificio fácilmente visible (**figura 3c**). Se sujetó el cuerpo firmemente entre un par de pinzas, y se insertó unas pequeñas tijeras afiladas a través del cuello (**Nota:** en caso de no estar decapitada la rata, realizar el corte desde el agujero visible de la cola) y cortar la piel de una forma suave a lo largo de la línea media dorsal del cuerpo hasta la punta del agujero de la cola (**figura 3d**). Con pinzas en cada mano, se aflojó suavemente la piel lejos de la línea media (**figura 3e**). Con las mismas pinzas, se empezó a retirar la epidermis suavemente sosteniendo el cuerpo con la ayuda de una de las pinzas (**figura 3f**). Luego de la remoción de la epidermis, se colocó sobre una caja Petri estéril con la dermis hacia abajo y se estiró completamente sin dejar algún borde doblado. (**figura 3g**).

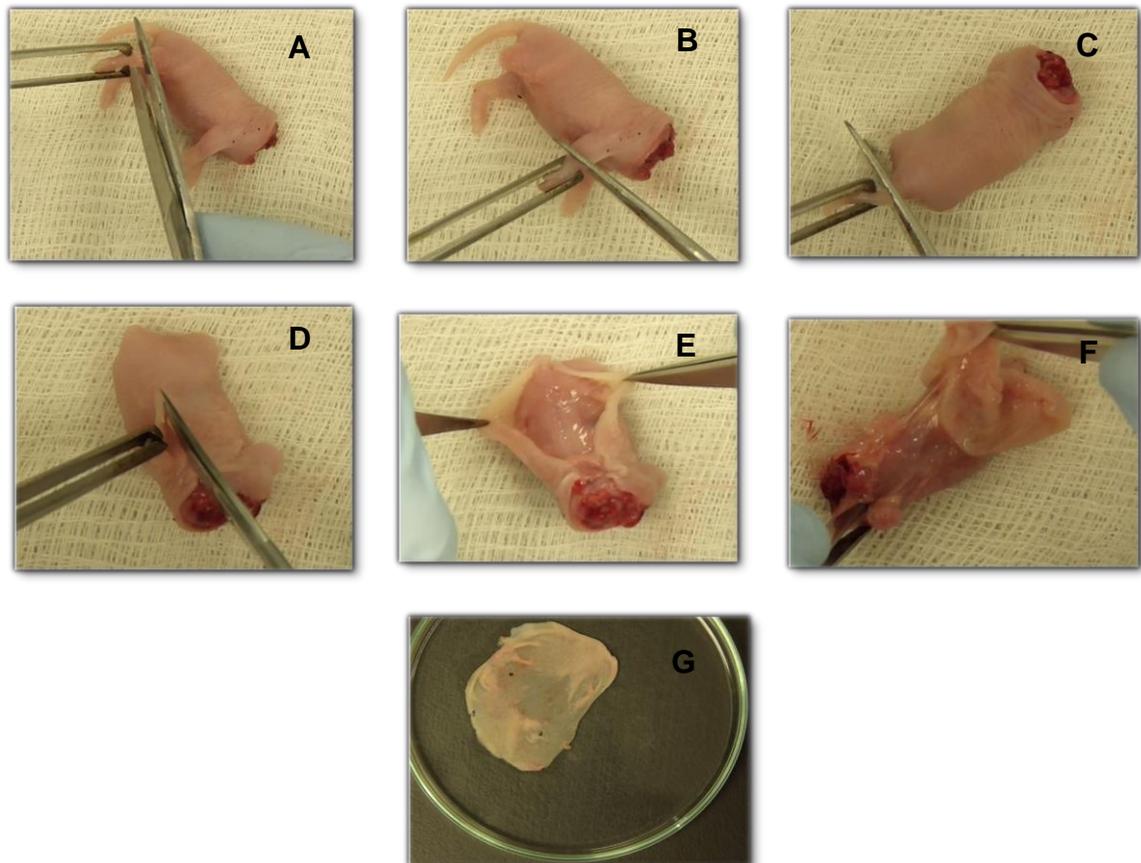


Figura 3. Procedimiento para la extracción de la epidermis en ratas neonatales.

2.4.5 Tratamiento de la epidermis con tripsina

En la cabina de flujo laminar se llevó a cabo el tratamiento enzimático con tripsina sin EDTA recién descongelada (0,25%). Primero se adicionó a una nueva caja Petri de 5cm o 10cm (dependiendo del tamaño de la epidermis) entre 2 a 3mL de tripsina. Se levantaron los extremos opuestos de un lado de la epidermis (completamente extendida en la caja de Petri) a otra caja de Petri (estéril) con la ayuda de unas pinzas, se levantó y se transfirió de manera que el lado de la dermis (boca abajo) tocara la tripsina, luego se bajó el resto de la piel suavemente hasta lograr que flotara en la tripsina (**figura 4 a, b**). Se almacenó la caja de Petri con la epidermis flotante a 4°C durante toda la noche (18 a 20h).

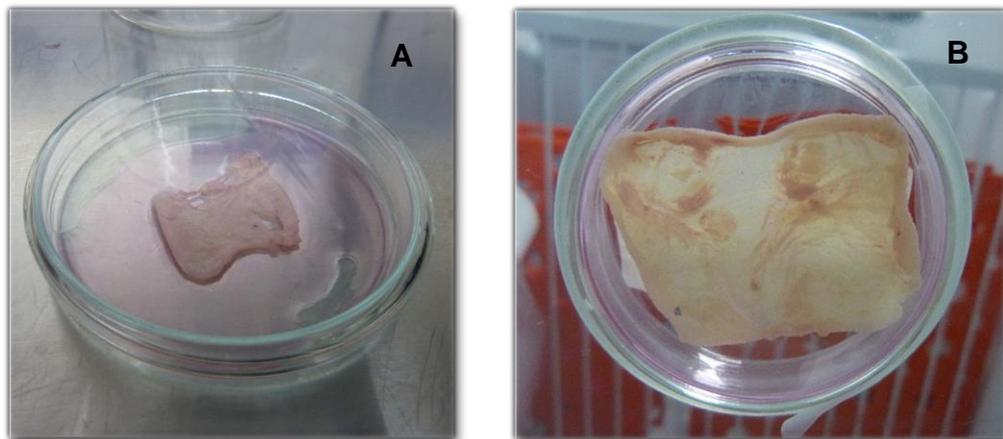


Figura 4. Tratamiento enzimático de la epidermis con tripsina sin EDTA.

2.4.6 Aislamiento de queratinocitos primarios de la epidermis de ratas recién nacidas

En la cabina de flujo laminar se llevó a cabo parte del aislamiento de queratinocitos. En una caja de Petri estéril se adicionó entre 1 a 2mL medio alto en calcio (1.3mM Ca^{2+}). Luego, en la caja de Petri donde se encontraba la epidermis con tripsina, se levantó cuidadosamente la epidermis de la superficie de la tripsina con las pinzas y se transfirió a la tapa de una caja de Petri seca, de modo que la epidermis hiciera contacto con la tapa (boca abajo) extendiéndola en su totalidad (**figura 5a**). Con ayuda de un bisturí se separó y removió la dermis (**figura 5b**) hasta quedar una hoja lisa de epidermis casi transparente sin restos de dermis o tejido adiposo. La epidermis limpia se transfirió a la caja de Petri con el medio alto en calcio, y se picó (bisturí o tijeras) hasta obtener pedazos pequeños dentro del medio alto en calcio (**figura 5c**). Después, se disgregó la suspensión resultante pipeteando arriba y abajo para tratar de liberar los queratinocitos (**figura 5d**), a

continuación, se transfirió la suspensión a un tubo Falcón de 50mL que se llevó a vórtex (marca Genie 2) durante unos 2 minutos a velocidad media (#3) para terminar de liberar todos lo queratinocitos posibles de la epidermis. (**figura 5e**). Se centrifugó la suspensión a 1500rpm durante 10 minutos. Pasado el tiempo de la centrifugación, se aspiró cuidadosamente el sobrenadante usando una pipeta Pasteur estéril. Se resuspendió el pellet en 2mL de medio alto en calcio, y luego se llevó nuevamente a centrifugación a 1500rpm, durante 5 minutos. El sobrenadante no se desechó, se adicionó a un tubo Falcón de 15mL y se procedió a realizar conteo celular para verificar que no se estaban eliminado las células de queratinocitos (de no ser así, se realiza cultivo con el sobrenadante). Finalmente, a partir del segundo centrifugado, se tomó una alícuota necesaria para realizar un recuento vital de células por el método de exclusión con azul de tripán usando un hemocitómetro (**ver 2.4.8**).

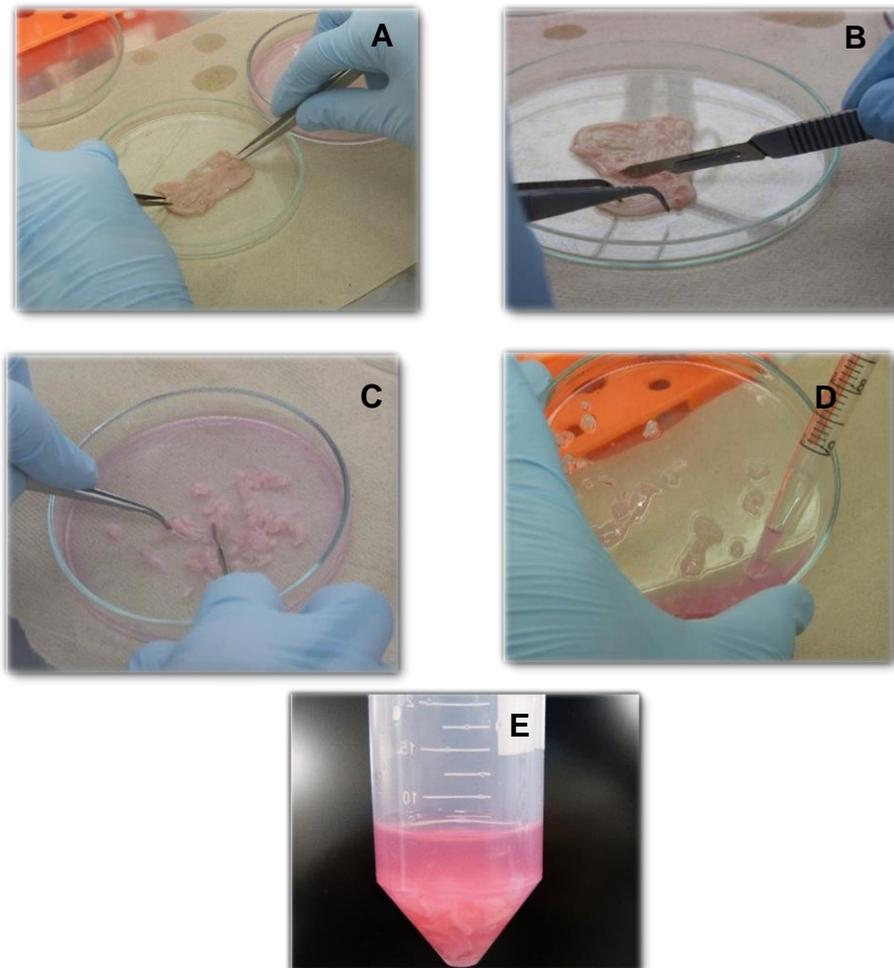


Figura 5. Procedimiento para el aislamiento de queratinocitos primarios a partir de epidermis de ratas neonatales.

2.4.7 Cultivo de queratinocitos primarios

Luego de realizar el conteo celular para estimar la cantidad presentes de células/mL y la viabilidad celular, se realizaron los respectivos cultivos en platos de cultivo de 75cm² y de 25cm² (dependiendo de la cantidad estimada de células). Se adicionó la alícuota necesaria de la suspensión celular a cada plato y se adicionó la cantidad suficiente de medio de cultivo 0.2mM de Ca²⁺ en cada plato de cultivo. Se llevaron a incubación a 37°C y una atmósfera de CO₂ al 5% durante toda la noche. Al día siguiente, se aspiró el medio de cultivo con las células que no se adhirieron al plato de cultivo y se lavó con solución salina. Luego, se realimentó el plato de cultivo con medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺) conteniendo 10ng/mL de KGF. Se realizaron cambios de medio cada 3 días o cuando era necesario (debido al cambio de color el medio de cultivo). Cuando se llegó a confluencia, se realizó subcultivo celular para mantener las células por más tiempo, hasta llegar a la senescencia.



Figura 6. Cultivo de queratinocitos primarios a partir de epidermis de ratas neonatales.

2.4.8 Determinación de Viabilidad celular

Este procedimiento se tomó siguiendo la guía: “*Pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba del MTT*” realizado por (González, 2012).

Se tomaron 90 μ L del colorante azul de tripán con la ayuda de una micropipeta, y se depositaron en un portaobjetos. Después se tomó 10 μ L de la suspensión celular (**ver 2.4.6**) y se adicionaron en el mismo portaobjetos y se homogenizó succionando hacia arriba y hacia abajo unas 40 veces para dispersar el colorante

con las células. Se sembró 10 µL en una cámara Neubauer y se llevó al microscopio para realizar el conteo de la siguiente manera:

Se contaron las células viables en los cuatro cuadrantes marcados A, B, C, D (**figura 7**). Las células teñidas de color azul, correspondían a las células muertas o no viables, mientras que las que permanecieron sin tinción (refringentes) eran las células viables. Se determinó el número total de células (viable y no viables) de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Cálculo para el número de células:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de células viables}}{\text{N}^\circ \text{ de cuadrantes}} \times 100.000 \times \text{volumen (mL) suspensión} \quad (1)$$

Cálculo para la viabilidad:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{N}^\circ \text{ de células totales (vivas+muertas)}} \times 100 \quad (2)$$

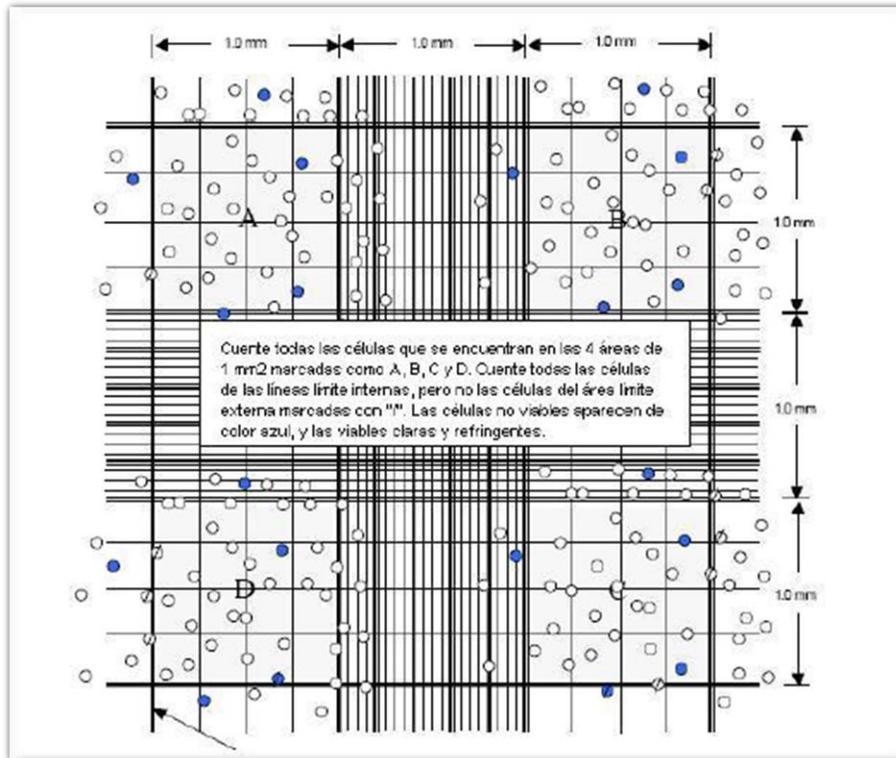


Figura 7. Esquema de una cámara Neubauer y distribución de los recuadros para el conteo. Fuente: (González, 2012)

2.5 Resultados

A continuación, se presentan los resultados obtenidos a partir del proyecto de investigación. Primero, se reportan en las siguientes tablas las características y duración de cada cultivo para cada epidermis tratada en el proyecto. Luego, se reportan las imágenes para cada epidermis y sus respectivos cultivos de queratinocitos y el seguimiento de los cultivos durante el tiempo de duración de la investigación. Por último, se reportan los cálculos y resultados del conteo celular y viabilidad celular para cada cultivo de epidermis.

Tabla 2 Características y tiempo de duración de cada cultivo de queratinocitos a partir de epidermis de ratas neonatales.

Número de epidermis	Estadio Rata	Aislamiento queratinocitos	Cultivo queratinocitos	Cantidad platos de cultivo	Duración del cultivo
Epidermis 1	P-2	27/04/2017	28/04/2017	2	38 días
Epidermis 2	P-2	02/05/2017	03/05/2017	6	32 días
Epidermis 3 y 4	P-2	04/05/2017	05/05/2017	3	31 días
Epidermis 5	P-2	09/05/2017	10/05/2017	1	25 días

Tabla 3 Subcultivo celular y tiempo de duración de cada cultivo de queratinocitos a partir de las epidermis tratadas.

Subcultivo	No. Pase	cantidad de platos de cultivo	Duración del cultivo
Epidermis 3 y 4	1	4	14 días
Epidermis 5	1	2	14 días

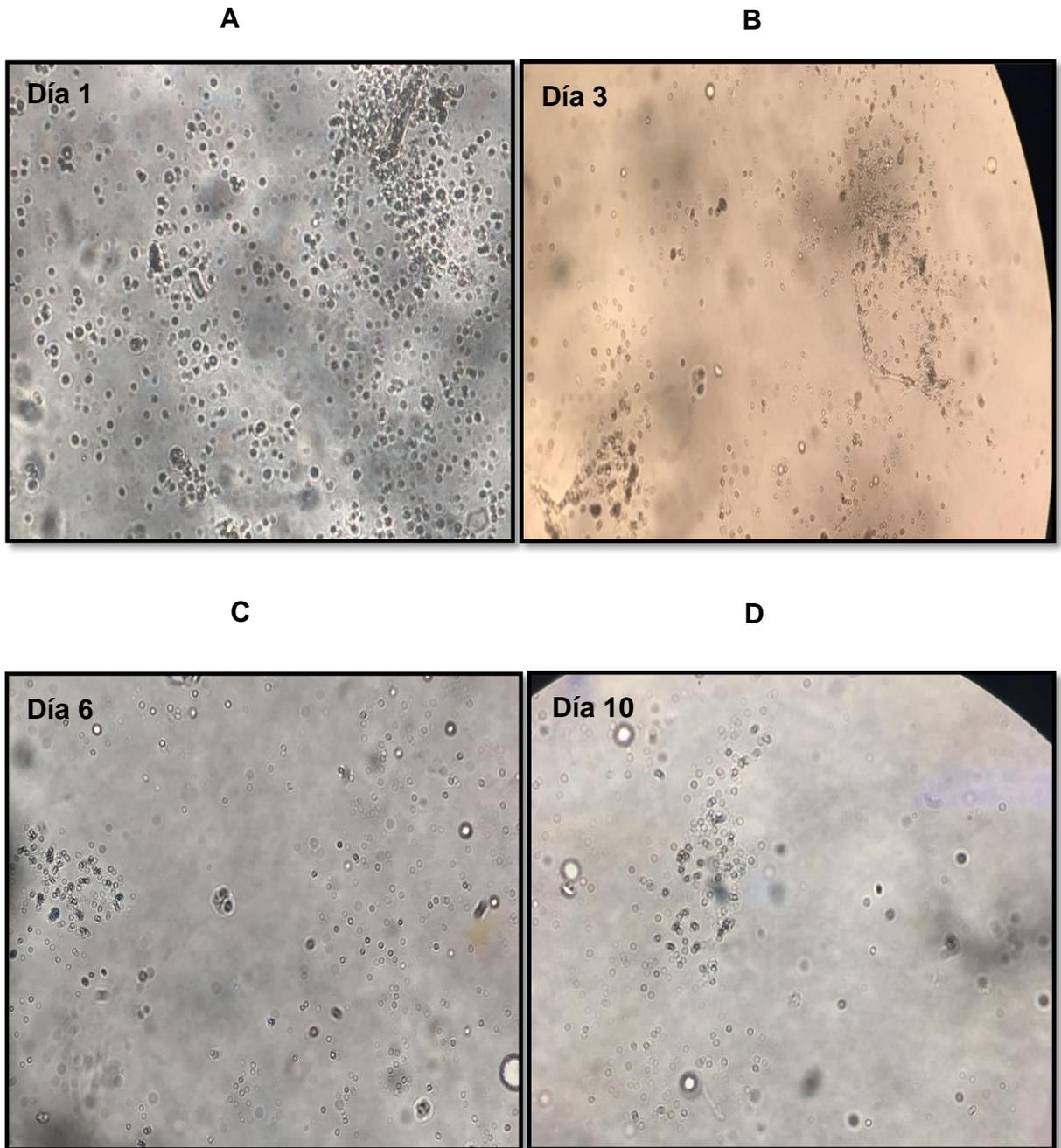
Tabla 4 Resultados de las concentraciones de células y viabilidad de los cultivos celulares de queratinocitos a partir del tejido epidérmico.

Número de epidermis	conteo celular antes de cultivar (inicio), células/mL	viabilidad celular, %	conteo celular después de cultivar (final), células/mL	viabilidad celular, %
Epidermis 1	N/A	N/A	$1,5 \times 10^5$	66
Epidermis 2	$13,75 \times 10^6$	93	$7,25 \times 10^5$	96
Epidermis 3 y 4	$24,5 \times 10^6$	91	$6,87 \times 10^6$	89
	$6,10 \times 10^6$	88		

Epidermis 5	20,5x10 ⁶	92	5,70x10 ⁶	98
Promedio, X		91		87
Desviación, SD		1,87		14

Cultivo de queratinocitos a partir de epidermis de ratas neonatales:

- **Epidermis 1:**



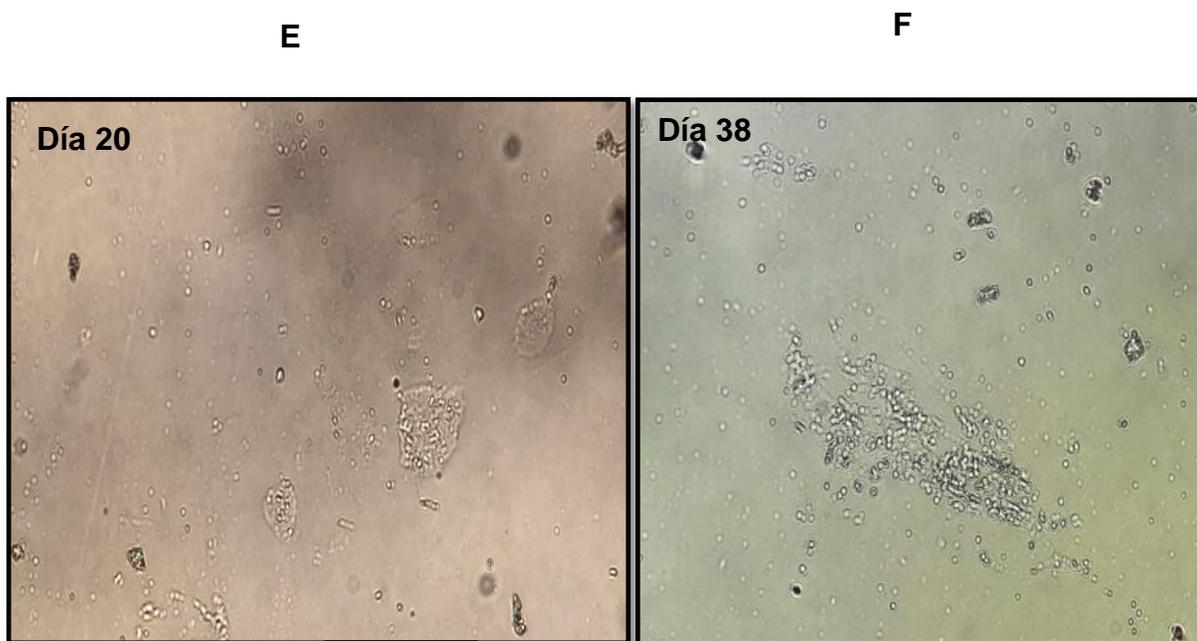
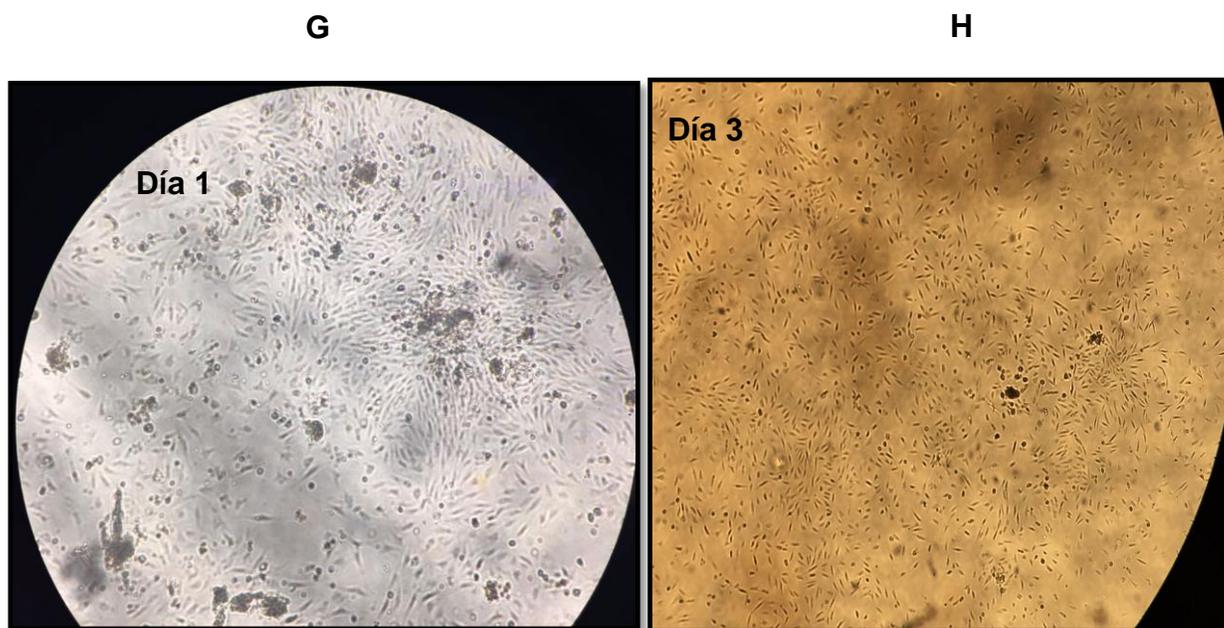


Figura 8. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 1 (plato de cultivo No. 1) en medio bajo en calcio ($0,05\text{mM Ca}^{2+}$ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (E) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x), (F) a los 38 días de cultivo (objetivo 10x).



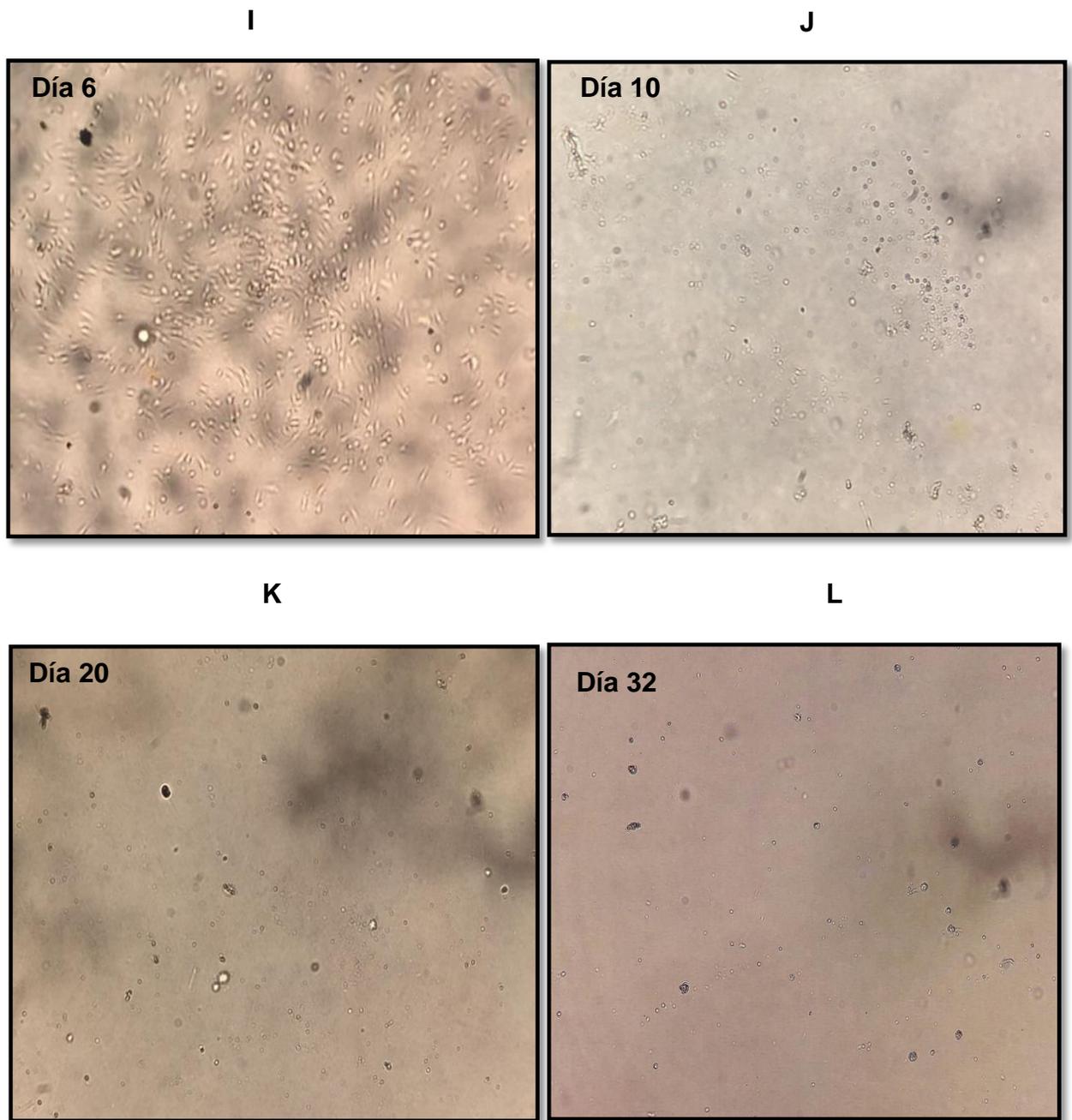
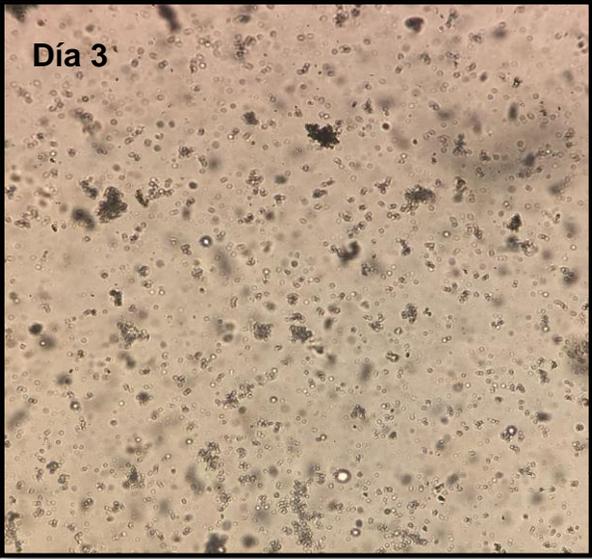
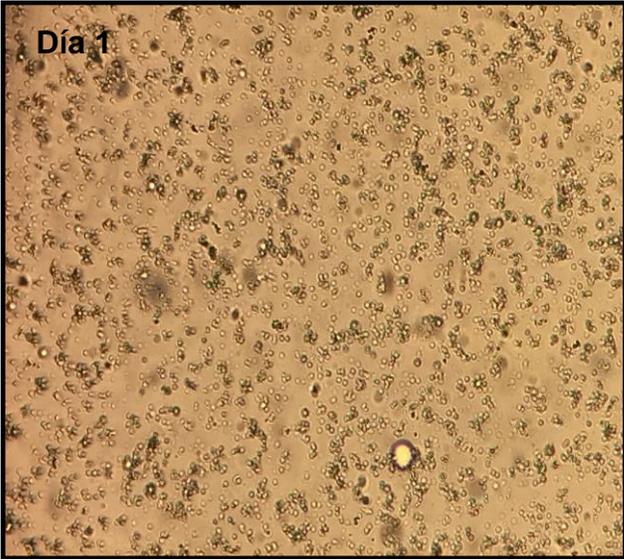


Figura 9. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 1 (plato de cultivo No. 2) en medio bajo en calcio (0,05mM Ca²⁺ suplementado con 10ng/mL de KGF) (G) queratinocitos y fibroblastos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (H) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (I) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (J) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (K) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x), (L) a los 38 días de cultivo (objetivo 10x).

- Epidermis 2:

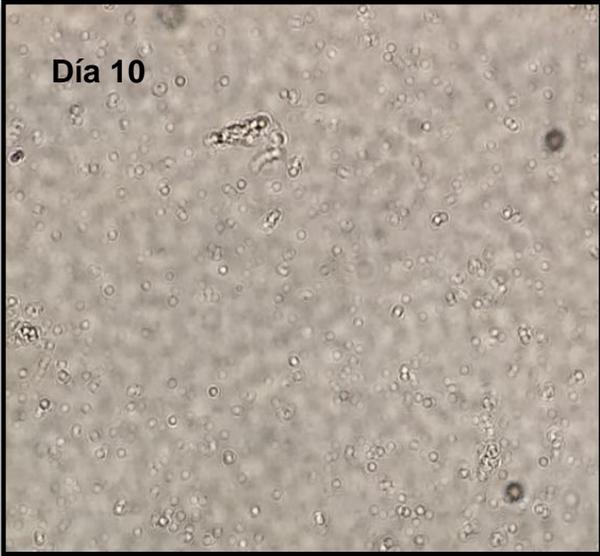
A

B



C

D



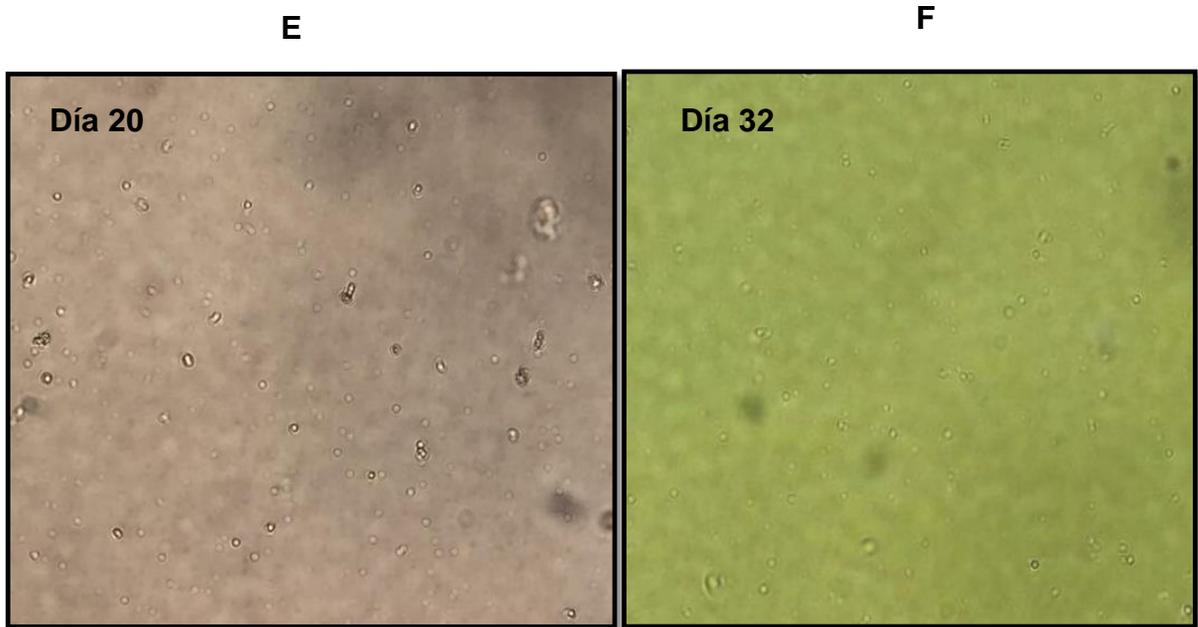
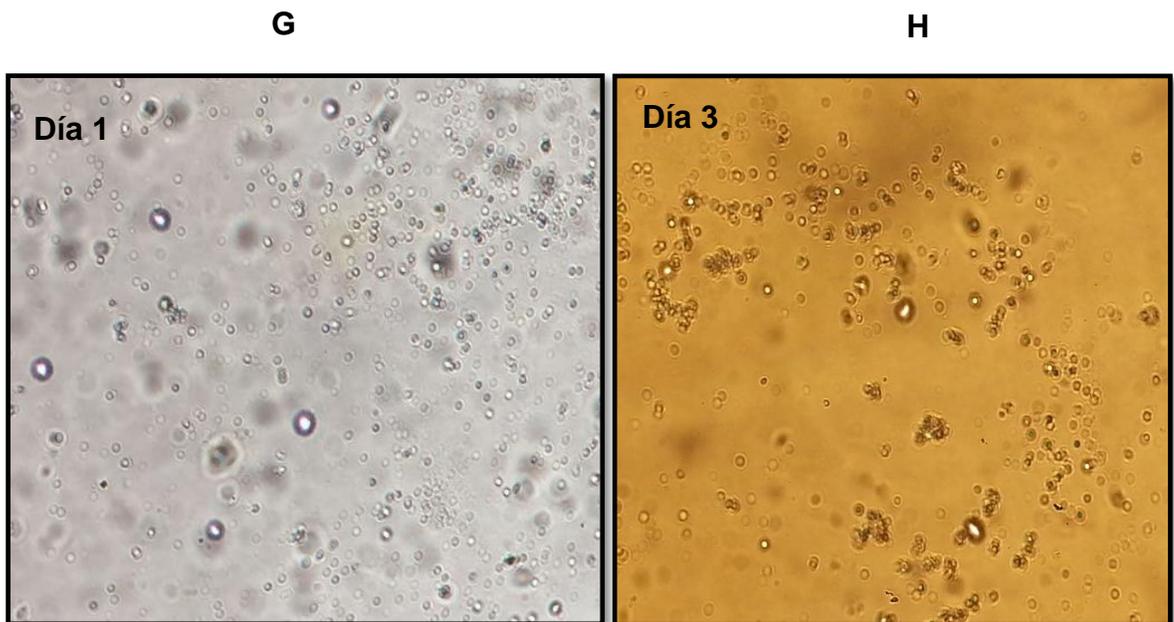


Figura 10. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 2 (plato de cultivo No. 1 centrifugado No. 1) en medio bajo en calcio ($0,05\text{mM Ca}^{2+}$ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (E) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x), (F) a los 32 días de cultivo (objetivo 10x).



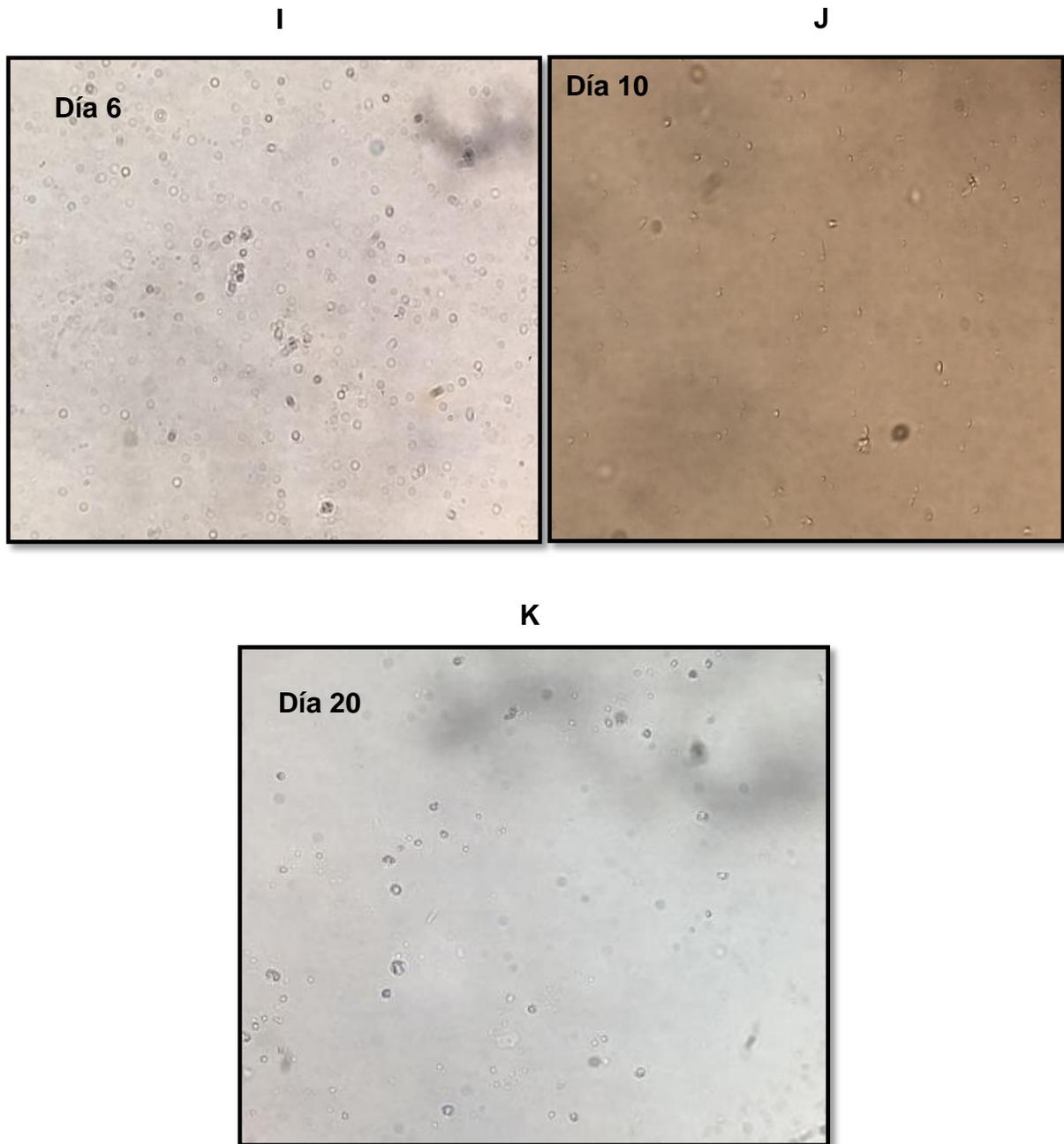
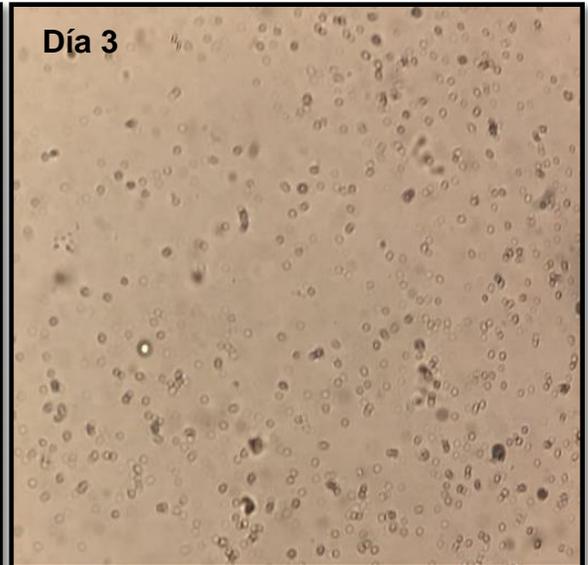
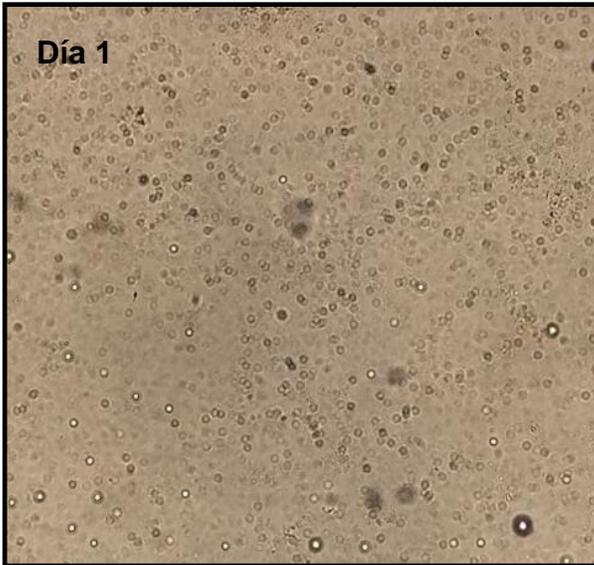


Figura 11. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 2 (plato de cultivo No. 2 centrifugado No. 2) en medio bajo en calcio ($0,05\text{mM Ca}^{2+}$ suplementado con 10ng/mL de KGF) (G) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (H) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (I) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (J) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (K) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x).

- Epidermis 3 y 4

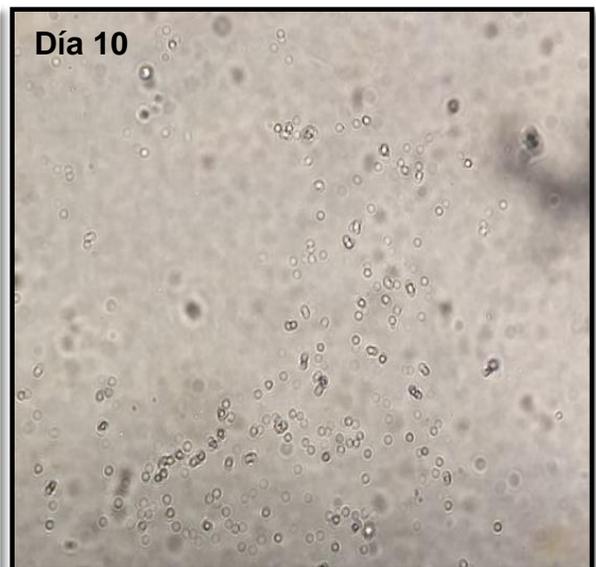
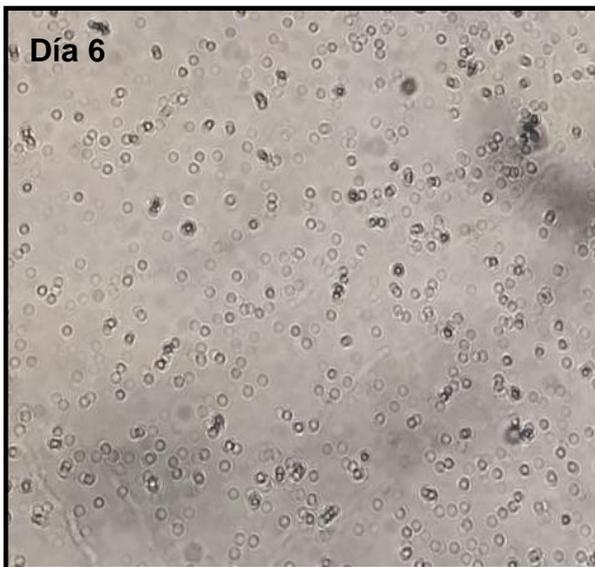
A

B



C

D



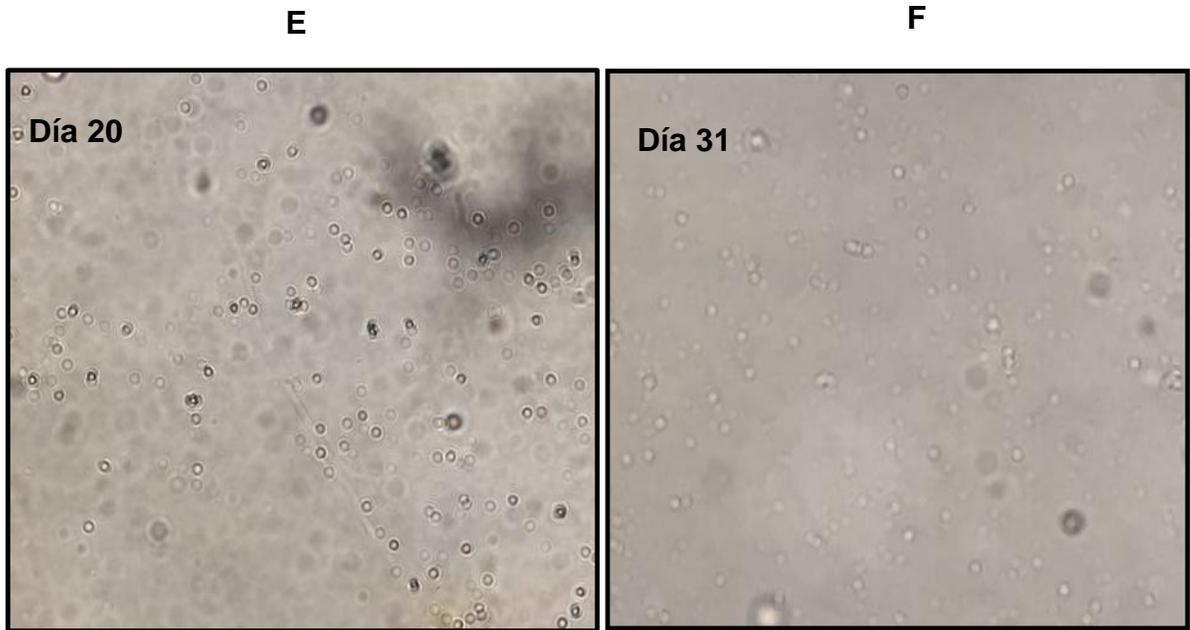
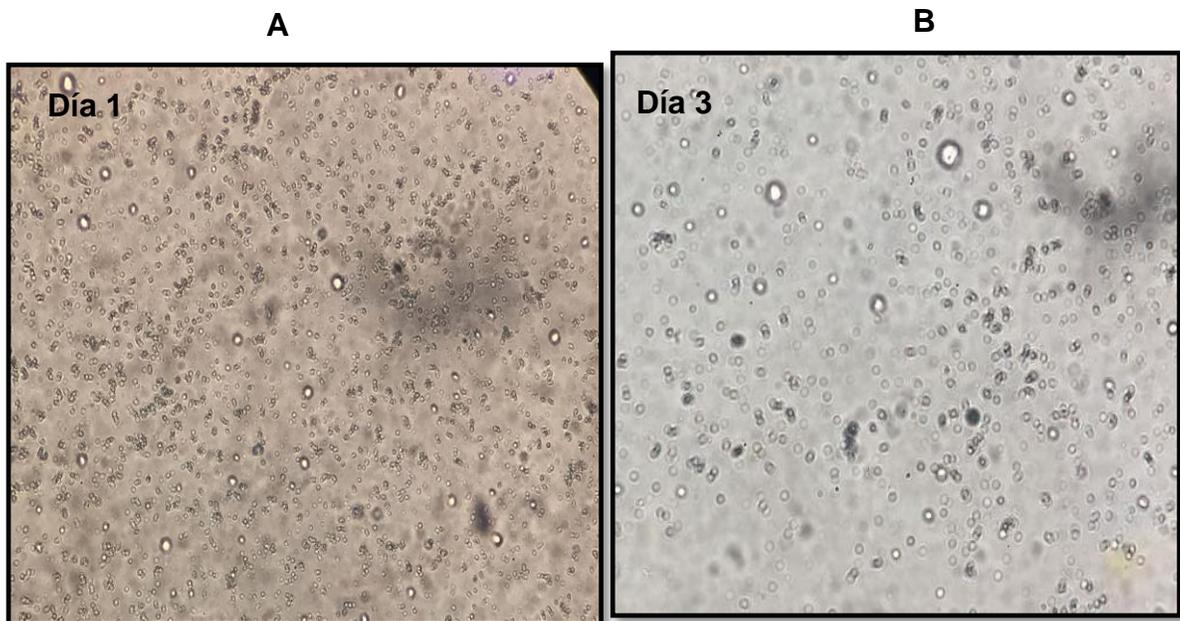


Figura 12. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de las epidermis 3 y 4 en medio bajo en calcio ($0,05\text{mM Ca}^{2+}$ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (E) a los 20 días de cultivo (objetivo 10x), (F) a los 31 días de cultivo (objetivo 10x).

- **Epidermis 5:**



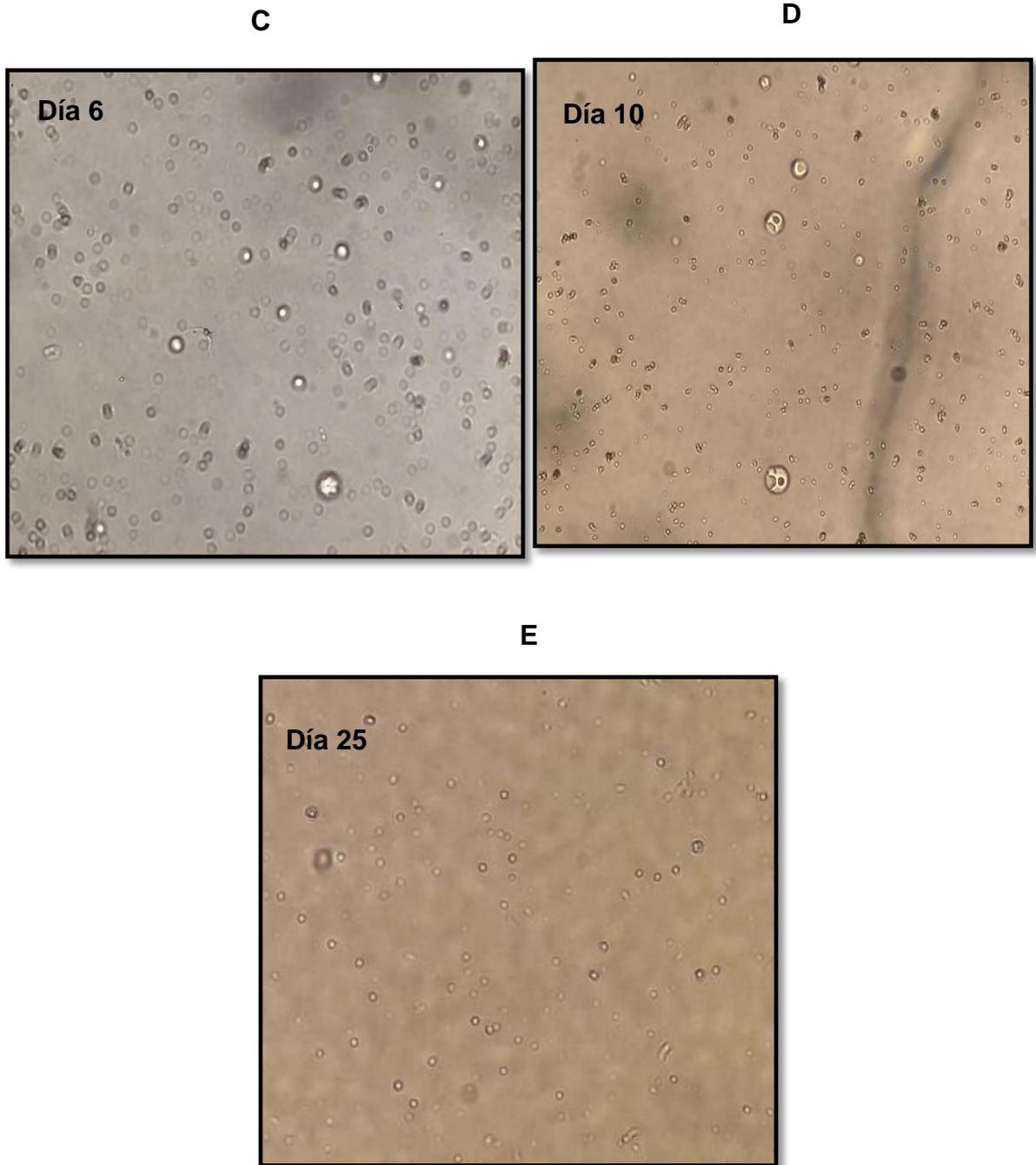


Figura 13. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de la epidermis 5 en medio bajo en calcio ($0,05\text{mM Ca}^{2+}$ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 6 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 10 días de cultivo (objetivo 10x), (E) a los 25 días de cultivo (objetivo 10x).

- Subcultivo epidermis 3 y 4:

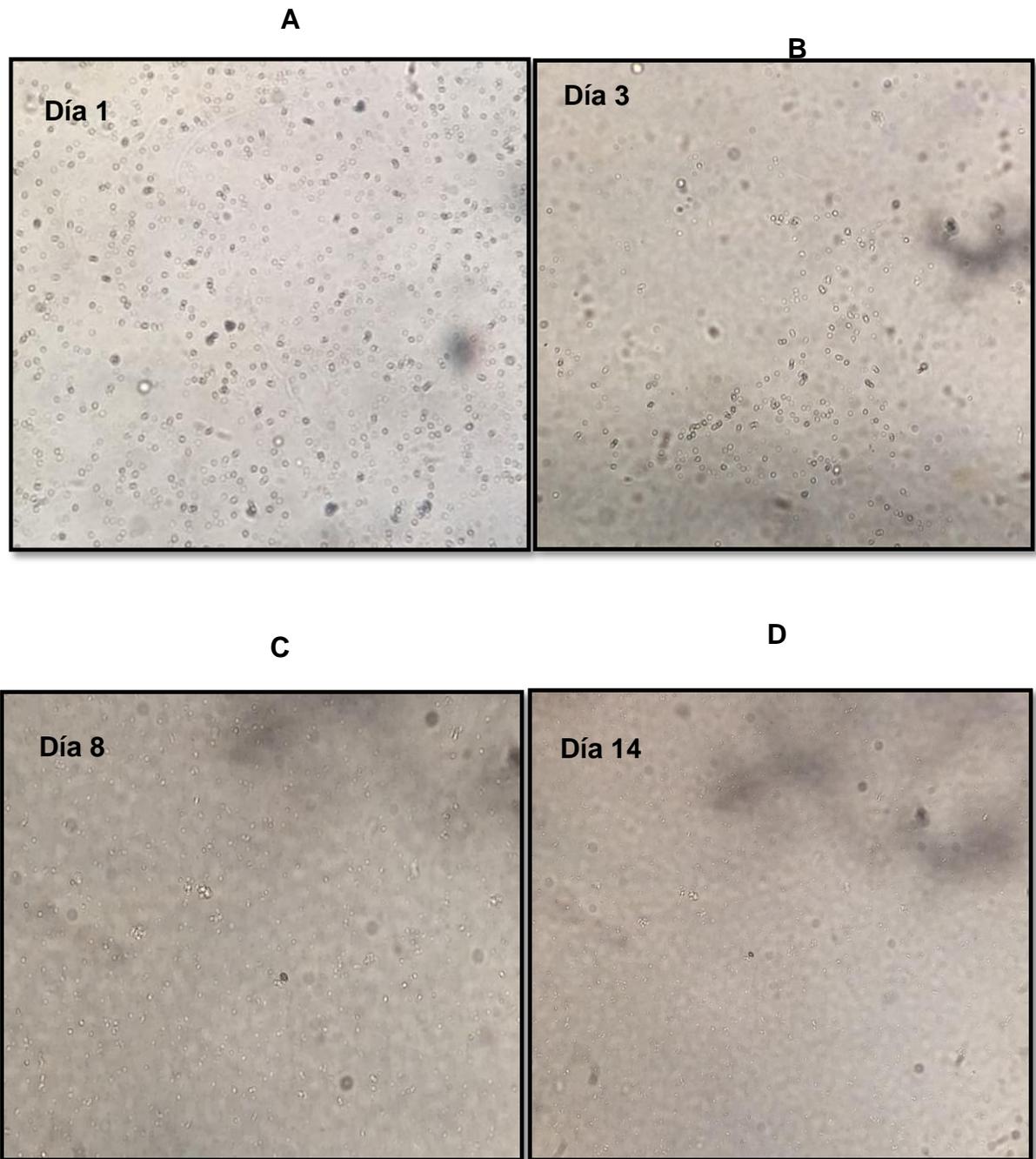


Figura 14. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos de subcultivo de epidermis 3 y 4 en medio bajo en calcio (0,05mM Ca^{2+} suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 8 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 14 días de cultivo (objetivo 10x).

- Subcultivo epidermis 5:

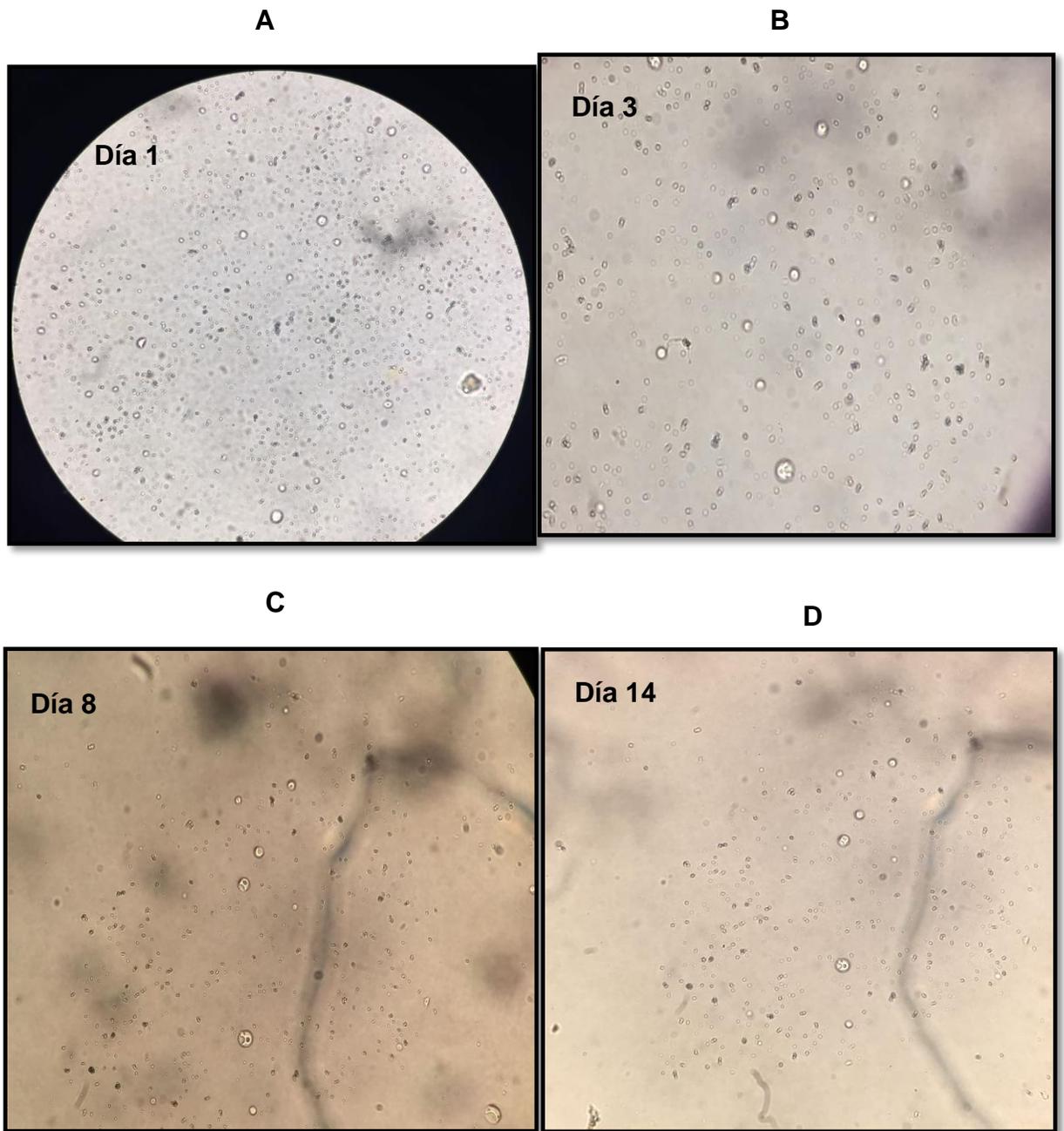


Figura 15. Imágenes del cultivo celular de queratinocitos del subcultivo de epidermis 5 en medio bajo en calcio ($0,05\text{mM Ca}^{2+}$ suplementado con 10ng/mL de KGF) (A) queratinocitos a las 24 horas del cultivo (objetivo 4x), (B) a los 3 días de cultivo (objetivo 10x), (C) a los 8 días de cultivo (objetivo 10x), (D) a los 14 días de cultivo (objetivo 10x).

De acuerdo a las ecuaciones 1 y 2, se realiza una muestra de cálculo (cultivo epidermis 2) para estimar el número de células presentes y viabilidad en cada cultivo. Los demás resultados se encuentran reportados en la tabla 4.

$$\text{número de células} = \frac{275}{4} \times 100.000 \times 2\text{mL} = 13,75 \times 10^6 \text{células/mL}$$

$$\text{viabilidad} = \frac{275}{298} \times 100\% = 93\%$$

2.6 Discusión

Las metodologías en el cultivo celular han facilitado las investigaciones moleculares de patologías de enfermedades como el cáncer. En el campo de la dermatología, los métodos de cultivo celular han permitido mejorar y desarrollar tecnologías en la ingeniería de genética, sobre todo en la ingeniería de tejidos, permitiendo alternativas para la recuperación de la piel en pacientes cuando han sufrido algún tipo de trauma o lesión en la piel (Hammiller, El-Abaseri, Dlugosz, & Hansen, 2015).

La epidermis, considerada la capa más externa de la piel y en donde se encuentran el 90% de queratinocitos (los cuales juegan un papel importante en los procesos de renovación, reparación y protección celular) es una de las más utilizadas como punto de partida para investigaciones clínicas y cosmética. Donde mediante algunas metodologías para aislar y cultivar células de queratinocitos, han proporcionado futuras herramientas que permitan mantener este tipo de células por un tiempo prolongado, conservando sus propiedades morfológicas, fisiológicas y fisicoquímicas para estudios *in vitro* alternativos en la industria cosmética, como resultado de ensayos preliminares de tolerancia y sensibilidad dérmica en los productos cosméticos.

Le epidermis es un epitelio estratificado escamoso formado de varias capas de queratinocitos que se encuentran en toda la base de la membrana separándola de la dermis subyacente. La capa basal de epidermis es una población heterogénea de células proliferativas y diferenciadas (Reisi et al., 2010). Anteriormente en los estudios de cultivos celulares de queratinocitos, el aislamiento y el cultivo a largo plazo han sido difíciles, debido primero a la complejidad de algunos protocolos en donde requieren capas de alimentación con fibroblastos, con poca reproducibilidad en el proceso de aislamiento y limitación en el subcultivo de las células entre 3 a 5 pasajes máximo (Zhang et al., 2002).

Este proyecto de investigación buscó principalmente estandarizar un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de queratinocitos a partir de epidermis de ratas neonatales. Para esto, se establecieron cultivos de queratinocitos primarios y con ayuda de promotores de crecimiento se quiso estimular el crecimiento de este tipo de células para aumentar su desarrollo y proliferación. Por último, se estimó la cantidad y viabilidad de los cultivos con el fin de determinar la reproducibilidad del protocolo de aislamiento. En primer lugar, se tuvo en cuenta que, para la extracción y aislamiento de los queratinocitos, era necesario separar el tejido epidérmico del conectivo (dermis), puesto que en este se encuentran otros tipos de células (fibroblastos en su mayoría) que fueron consideradas como contaminantes para el cultivo de queratinocitos y poder así obtener cultivos independientes y puros. Es por esto, que el primer paso fue el tratamiento con tripsina a 4 °C durante 18 a 20h, ya que esta es una enzima que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas de adherencia de la matriz extracelular, para poder así liberar los queratinocitos presentes en el tejido epidérmico.

De acuerdo a la literatura, esta enzima tiene una temperatura óptima de operación de 37°C, pero en el protocolo se utilizó a 4°C, esto con el fin de que la enzima penetrará lentamente el tejido epidérmico (con una mínima actividad trípica) y poder así liberar los queratinocitos y minimizar el proceso de estrés al cual se someten las células con este tipo de disgregación, aunque a 37°C es la temperatura más adecuada, esta puede afectar más rápido las células en cuanto al estrés mecánico que sufren porque se debe realizar constante agitación y esto puede conllevar a la muerte de las células y también perder la capacidad de formar colonias debido a la diferenciación terminal de las células por la enzima (Freshney, 2005).

Otro factor importante en el tratamiento de la epidermis con la tripsina, fue que la piel flotara en la tripsina y que no quedara sumergida en su totalidad, ya que esto compromete al proceso de tripsinización y por ende la separación de la dermis de la epidermis para facilitar el aislamiento de los queratinocitos. De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer cultivo al momento de extender la piel sobre la tripsina, esta no quedó en su totalidad flotando y parte de la tripsina tocó la superficie de la epidermis, afectando el proceso de tripsinización. Además de esto, pasado las 20 h el procedimiento de separación de la dermis fue muy difícil de acuerdo al protocolo usado, se tuvo que optar con la ayuda de un bisturí para poder remover la dermis y dejar la epidermis como una hoja lisa y casi transparente libre del tejido conectivo (ver **figura 5b**).

Después de esto, se trituró la piel quedando como suspensión y con ayuda de una pipeta se aspiró, lo cual fue difícil y parte del tejido epidérmico quedó dentro de la pipeta, afectando la cantidad de células obtenidas en el cultivo. En el aislamiento de queratinocitos de la primera epidermis, se realizó una segunda disgregación enzimática con tripsina, pero a 37°C, para comparar el proceso de disgregación con el del protocolo.

Es importante resaltar que para este tipo de células y para cultivos en general, la densidad de siembra del inóculo es crítica en el momento del cultivo celular. Una baja densidad de siembra, afecta la proliferación celular, ya que las células recién aisladas no se encuentran aún adaptadas para sobrevivir a las condiciones *in vitro*. Por tanto, se necesita una alta densidad de siembra para permitir una mayor probabilidad de adhesión y proliferación celular (Castro S. , 2009). En el tratamiento para la epidermis 1, no se pudo realizar un conteo celular antes de realizar el cultivo, debido a la gran cantidad de células obtenidas y fue muy difícil realizar el conteo en la cámara Neubauer. Para el resto de epidermis, el promedio de densidad de siembra fue entre 4.0×10^6 células/cm² para platos de cultivo de 25cm² y una densidad de 8×10^6 células/cm² para platos de cultivo de 75cm².

Para el cultivo celular de queratinocitos, antes se requerían capas de alimentación de fibroblastos para ayudar al crecimiento de las células, debido a que los queratinocitos *in vitro* requieren altas demandas nutricionales. Se ha reportado que solo del 3 al 4% de queratinocitos aislados logran tener la capacidad proliferativa, siendo estos los queratinocitos basales. De acuerdo a la literatura, los platos de cultivos deben ser revestidos un pretratamiento de revestimiento con colágeno tipo IV (forma la lámina basal de los epitelios) y fibronectina. Estas proteínas son fundamentales en la matriz extracelular, ya que ayudan a la adhesión de las células y crecimiento de los queratinocitos. Las células de queratinocitos poseen gran capacidad de expresar receptores de colágeno que les permiten mayor adhesión y ayudan a su diferenciación (Zhang et al., 2002). En este protocolo no se usó ningún tipo de revestimiento en las placas de cultivo. Por tanto, las células de queratinocitos aisladas en esta investigación en su mayoría permanecieron en suspensión, lo cual pudo verse afectada la diferenciación, crecimiento y proliferación de las células, que más adelante será explicado.

En cuanto a la morfología característica de lo queratinocitos *in vitro*, la población de queratinocitos cultivados van sufriendo el grado de diferenciación o queratinización, en donde las células se van estratificando desde su estado basal (forma poligonal con núcleo definido) hasta el estrato córneo (células sin núcleo largas y aplanadas) (Cancer & Pathology, 1975). Cuando no hay una adherencia total de las células de queratinocitos a la superficie de los platos de cultivo, estas no obtienen la forma poligonal característica, sino que permanecen con morfología circular, permaneciendo en suspensión como pequeños grupos de islas de células (Castro S. , 2009).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el cultivo celular de la epidermis 1 (ver **figura 8a y 9g**) se observó que para el cultivo con el tratamiento de tripsina a 4°C siguiendo el protocolo, se obtuvieron posibles células de queratinocitos basales, en forma de pequeños grupos de células aglomeradas con forma circular de acuerdo a lo reportado anteriormente. De la otra mano, se observó que en el cultivo con la segunda tripsinización a 37°C, hubo una gran cantidad de células en forma fusiforme alargadas correspondiente a fibroblastos, y pocas células

redondas (queratinocitos), concluyendo que se obtienen mejores resultados en cuanto a obtención de las células deseadas (queratinocitos) trabajando con la tripsina a 4 °C, que a 37°C ya que a esta temperatura también se disgrega y libera células de fibroblastos, que son el contaminante más común en este tipo de cultivos celulares. Otro factor importante en la obtención de fibroblastos en el cultivo de queratinocitos, pudo haber sido que no se separó completamente la dermis de la epidermis, quedando restos de esta en el tejido tratado con la tripsina.

En todas las demás epidermis (**figuras 8 a la 15**), también se observaron que, durante todo el tiempo de mantenimiento de las células, estas nunca cambiaron su morfología circular, por lo que se pudo inferir que se mantuvieron en suspensión y muy pocas lograron permanecer adheridas a la superficie. Esto, se puede explicar con lo dicho en la literatura, en donde con la ayuda de un pretratamiento a los platos de cultivo con colágeno tipo IV y fibronectina, las células de queratinocitos recién aisladas producen receptores de colágeno que les permite adherirse a la superficie de los platos, y poder así mantenerse y empezar a crecer y proliferar. Debido a esto, como se observó en los resultados, en todas las epidermis a partir del 3 día de cultivo, las células empezaron a decrecer en número y donde se evidenció que, al finalizar el estudio, en todos los cultivos quedaron muy pocas células adheridas, pero que se lograron mantener por un mes con una viabilidad mayor al 66%.

Otro factor que también pudo haber influenciado en las diferencias obtenidas de los conteos celulares al final del proyecto, fue que a partir del tratamiento de las pieles 2, 3, 4 y 5 se hicieron unas mejoras en cuanto a la extracción y aislamiento de los queratinocitos (**figuras 10a, 12a y 13a**). En primer lugar, se mejoró el proceso en el que flota la epidermis con la tripsina, cambiando a una caja Petri más pequeña donde al adicionar la tripsina se distribuyó mejor en toda la superficie de la epidermis, permitiendo que esta flotara con mayor facilidad. Segundo, en el proceso de separación de la dermis y epidermis, al mejorar la tripsinización, fue mucho más fácil separarlas. Por último, en el proceso de cortar la epidermis en pequeños pedazos, se utilizó la ayuda de un vórtex, para liberar la mayor cantidad de queratinocitos en el tejido epidérmico antes de la centrifugación y realizar el cultivo respectivo.

Cabe aclarar que, para determinar y caracterizar los queratinocitos aislados en esta investigación se usó microscopía de luz. Sin embargo, esta no es suficiente y se debe confirmar empleando ensayos de inmunohistoquímica. Estos no se pudieron llevar a cabo, ya que primero no era uno de los alcances de este proyecto (sólo aislamiento y mantenimiento de queratinocitos basales) y por el poco tiempo de la investigación no se contaban con los reactivos (anticuerpos específicos) necesarios en el laboratorio para llevarlos a cabo.

El tiempo que se demoran los queratinocitos en llegar a confluencia está entre 12 a 15 días teóricamente (Amortegui & Ramirez, 2008), puesto que este tipo de células *in vitro* se deben adaptar lentamente a las nuevas condiciones y empezar consumir los requerimientos nutricionales para su metabolismo y crecimiento. Los resultados de las epidermis 3, 4 y 5 (**figuras 12 y 13**) evidencian una mayor densidad celular comparado con las epidermis 1 y 2 (**figuras 8, 9, 10 y 11**), esto posiblemente debido a la falta de experiencia del investigador en el proceso de aislamiento, y las dificultades en la extracción y aislamiento en los primeros ensayos. Por otro lado, posterior al sexto día de cultivo se observó en las epidermis 3, 4, y 5 (**figuras 12c, 13c**) una mayor cantidad de células en suspensión y algunas adheridas al plato de cultivo, por lo que se consideró a los 10 días realizar el primer pasaje de células (**figuras 14 y 15**).

En los subcultivos realizados, estos duraron máximo 14 días hasta llegar a senescencia. Estudios han demostrado que el pasaje de las líneas de queratinocitos pueden ser hasta de 26 pasajes, manteniendo todas las condiciones establecidas en el protocolo (Zhang et al., 2002). También, explican que cuando se realizan subcultivos de queratinocitos, no hay necesidad de realizar pretratamiento de los platos de cultivos con colágeno tipo IV y fibronectina, puesto que las primeras células ya adheridas y confluentes, han sido activadas, lo cual sugiere que no necesitan estas proteínas exógenas para adherirse y proliferar en un nuevo pase. De acuerdo a esto, en los resultados obtenidos sólo se pudo realizar un pasaje para las epidermis 3, 4 y 5, ya que, aunque en éstas se aislaron en mayor cantidad de queratinocitos, no hubo mayor confluencia (explicado anteriormente) y el corto tiempo de la investigación no permitió realizar nuevos subcultivos. Adicionalmente, se observó, que tanto en todas las epidermis y en los subcultivos la densidad celular en suspensión y células adheridas se vio disminuida con el tiempo. Estos resultados no concuerdan con lo explicado por los autores, pero como se ha explicado anteriormente, en los primeros cultivos tampoco se utilizó ninguna matriz de revestimiento para ayudar a la adhesión de las células, estas en su mayoría se mantuvieron en suspensión, por tanto, ni proliferaron ni crecieron de acuerdo a la morfología típica de los queratinocitos, lo que generó a que en los subcultivos ocurriera lo mismo.

El rol de la regulación de calcio en el crecimiento, metabolismo y diferenciación de queratinocitos es un factor crítico en el control de la proliferación y diferenciación estratificada de este tipo de células. Ha habido pocos estudios referentes al efecto de la regulación de calcio en células epiteliales. Un estudio realizado por Hennigs y colaboradores demostraron que, cuando se mantenían las células epiteliales con un medio bajo en calcio (0.05-0.1mM) los queratinocitos proliferaban rápidamente con alta fracción, pero que no se llegaban a estratificar, es decir sin llegar a la diferenciación celular. Para esto, ellos compararon varios cultivos en donde en algunos mantenían las células a concentraciones entre 0.05 y 0.1mM y otros a 0.9 mM hasta 1.2mM. Por tanto, las células que se mantuvieron entre 0.05mM y 0,1mM proliferaron rápidamente formando monocapas, llegando a confluencia sin

estratificarse, manteniendo su forma poligonal con núcleo definido adhiriéndose a la superficie de los platos de cultivo. Mientras que, las células que se mantuvieron por encima de esta concentración (0.9 a 1.2 mM), estas se diferenciaron rápidamente perdiendo su forma poligonal a células aplanadas sin núcleo (estrato córneo), lo que ocasionó que no formaran monocapas y empezaron a decrecer en número después de 10 días de cultivo. Dicho lo anterior, todas las epidermis en esta investigación fueron mantenidas con el medio suplementado bajo en calcio (0.05 mM Ca²⁺) con 10ng/mL de KGF (Hennings et al., 1980).

De acuerdo a todos los resultados obtenidos en el mantenimiento de los cultivos de queratinocitos (**figuras 8 a la 15**) se evidenció que en ninguna de las epidermis se observó proliferación de las células de queratinocitos y solo algunas de estas (epidermis 3, 4 y 5) se estimó que llegaron a confluencia, lo que no concuerda con el resultado del estudio anterior. Esto, se pudo deber (aparte de las posibles causas explicadas anteriormente), a que el ion calcio como tiene influencia también en los procesos de adhesión de los queratinocitos al sustrato, al estar en bajas concentraciones en el medio, este no va a ayudar a que algunas proteínas de unión funcionen correctamente, puesto que muchas de estas dependen del calcio, y por tanto que no haya una interacción entre la célula y el sustrato o entre célula-célula (Castro S. , 2009).

Otra posible causa por la que las células de queratinocitos en todas las epidermis no proliferaron o crecieron, pudo ser al realizar el cambio de medio muy seguido. Ya que, muchas veces esto puede ser perjudicial para las células, pues estas son capaces de generar sus propios factores de crecimiento y poder así estimular su propio crecimiento. Entonces, al realizar un cambio de medio muy temprano, ocasiona que se eliminen muchos de estos factores, lo que produce un lento crecimiento. Sin embargo, realizar un cambio de medio tarde, también puede afectar a las células, ya que, al estar metabólicamente activas, van a generar gran cantidad de desechos que pueden ser perjudiciales para el crecimiento y supervivencia de las células, esto se puede observar con el cambio de color que se genera en el medio de cultivo (de rojo a naranja) indicando que las células han consumido todos los nutrientes contenidos en el medio (Castro S. , 2009). Se trató de realizar los cambios de medio cada 2 a 3 días para los cultivos de queratinocitos, pero muchas veces al pasar el segundo día se observó que algunos de los cultivos aún mantenían el color rojo del medio, indicando que aún las células no se habían consumido todos los nutrientes, entonces se dejaban de uno a dos días más para realizar el cambio de medio, por lo que esto pudo haber afectado a la proliferación de las células.

Por último, aparte de usar un medio suplementado bajo en calcio, también se adicionó el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF); sustancia que promueven el crecimiento de las células de queratinocitos, permitiendo obtener monocapas en un menor tiempo. Según la literatura, este tipo de sustancias, específicas para cada línea celular, facilitan en este caso, la obtención de cultivos

confluentes de queratinocitos en un menor tiempo. Dado los resultados obtenidos, no se vio ningún cambio en cuanto a la proliferación, crecimiento y mayor confluencia de todos los cultivos de queratinocitos al adicionar 10ng/mL de este factor en el medio de cultivo.

De acuerdo a la investigación realizada por (Hammiller & El-Abaseri, 2015) obtuvieron cultivos uniformes y confluentes gracias al uso de este factor de crecimiento utilizado en su protocolo para el cultivo de queratinocitos en ratas neonatales, permitiendo la proliferación de los cultivos a partir del sexto día de la adición del factor de crecimiento en el medio. Es claro, que en esta investigación no se obtuvo un buen resultado con el uso de este promotor de crecimiento, pero todo esto se pudo deber a las posibles causas explicadas anteriormente (pretratamiento de platos de cultivo con proteínas de adhesión, medio bajo en calcio, cambios de medio, alta densidad celular) en donde cada uno de estos factores, influyó de manera relevante en la investigación, ocasionando que no se viera ningún cambio notable con el uso del factor de crecimiento.

Como conclusión, aunque no se evidenció mayor proliferación de los queratinocitos, se lograron establecer los cultivos primarios de estos, aislarlos del tejido epidérmico y mantenerlos en condiciones *in vitro* durante aproximadamente un mes de estudio, proporcionando así un método sencillo bajo condiciones establecidas de laboratorio que puede ser utilizado y optimizado en futuras investigaciones en ciencias básicas y aplicadas.

2.7 Conclusiones

- Se estandarizó un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de líneas celulares primarias de queratinocitos *in vitro*.
- Se establecieron cultivos primarios de queratinocitos a partir de tejido epidérmico de ratas neonatales.
- No se logró estimular el crecimiento de los cultivos de queratinocitos con la ayuda de factores de crecimiento, debido a diversas causas correspondientes al pretratamiento de platos de cultivo, uso de medio bajo en calcio y cambios de medio, entre otros.
- Se estimó la cantidad de células cultivadas y la viabilidad de los cultivos después de un mes de investigación, obteniéndose cultivos con una viabilidad mínima del 66% y en promedio un 87 %.

2.8 Recomendaciones

- Realizar en el menor tiempo posible la remoción de la epidermis del modelo animal (después de su sacrificio), ya que esto evita la contaminación del tejido y obtención de las células de queratinocitos.
- Asegurar el proceso de flotabilidad de la epidermis en el tratamiento con la tripsina, ya que esto permite mejorar el proceso de separación de la dermis y epidermis, para así lograr obtener una alta cantidad de células de queratinocitos.
- Continuar con la optimización en el proceso de estandarización del protocolo con el pretratamiento de los platos de cultivo con colágeno tipo IV y fibronectina, para obtener cultivos adheridos de queratinocitos con una mayor confluencia.
- Realizar una buena disgregación de la epidermis en el proceso de aislamiento, para así obtener la mayor cantidad posible de queratinocitos basales para su cultivo.
- Confirmar a través de ensayos de inmunohistoquímica la caracterización morfológica de los cultivos obtenidos de queratinocitos basales.
- Realizar periódicamente y cuando sea necesario el cambio del medio de cultivo, ya que, al no realizarlo a tiempo, este puede llegar a afectar las células de queratinocitos y por tanto la viabilidad del cultivo.

2.9 Referencias

- Amortegui, A. X., & Ramirez, S. R. (2008). Cultivo primario de queratinocitos humanos sembrados en submucosa intestinal porcina. *Revista Ciencias de La Salud*, 6(3), 8–22.
- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). The Hippocampus Book . En P. Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, & J. O'Keefe, *The Hippocampus Book* (págs. 41-43). Oxford : Oxford University Press .
- Arroyo, V., Ortiz, B., & Gómez, L. (2014). Manual de prácticas cultivo de células animales.
- Briggaman, R. (1967). Preparation and characterization of a viable suspension of post-embryonic human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 48, 159-168.
- Cancer, G., & Pathology, E. (1975). N. E. FUSENIG' and P. K. M. WORST2 German Cancer Research Center, 'Institute for Biochemistry, ZInstitute for Experimental Pathology, 69 Heidelberg I, Im Neuenheimer Feld 280, BRD, 93, 443–457.
- Carrol, J., & Molés, J. (2000). A three-dimensional skin culture model for mouse keratinocytes: application to transgenic mouse keratinocytes. *EXPERIMENTAL DERMATOLOGY*, 6.
- Castaño, M. (2000). Cultivos celulares. En M. Castaño, *Cultivos celulares* (págs. 36-40). Biogénesis.
- Castro, S. (2009). Modelos experimentales para aislamiento y mantenimiento in vitro de queratinocitos y fibroblastos humanos y su utilización en una matriz con potencial en ingeniería de tejidos. Cartago.
- Castro, S. (2009). *modelos experimentales para el aislamiento de queratinocitos y fibroblastos in vitro*. Cartago.
- Chaudry, A. (2004). *Cell culture: The science cretive quarterly*. Obtenido de <http://www.scq.ubc.ca/cell-culture/>.
- Cruickshank, C. (1960). The cultivation of cells from. *J invest dermatol* 34, 339,342.
- cultek*. (17 de junio de 2016). Obtenido de cultek: www.cultek.com

- Eugenia, M. (s.f.). Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). *ArgenBio*, 6.
- FitzGerald, M., Gruener, G., & Mtui, E. (2012). Neuroanatomía Clínica y Neurociencia . En M. FitzGerald, G. Gruener, & E. Mtui, *Neuroanatomía Clínica y Neurociencia* (págs. 351-354). España: Elsevier .
- Freed, L., Biron, R., Eagles, D., & Lesnoy, D. (1994). Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. En L. Freed, R. Biron, D. Eagles, & D. Lesnoy, *Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering* (págs. 689-690). Reino unido: Nature Biotechnol.
- Freshney, I. (2005). Culture of animal cells: A manual of basic Thecnique. En I. Freshney, *Culture of animal cells: A manual of basic Thecnique* (pág. 217). Jhon Widley & sons.
- Fuesing, N. E. (1975). Mouse epidermal cell cultures. *Expermental cell research*, 15.
- G.Fiirstenberger, M. J. (1986). Isolation, characterization and in vitro cultivation of subtractions of neonatal mouse keratinocytes. *carninogénesis Vol.7*, 9.
- Gartner LP, H. J. (2002). Texto Atlas de Histología. En H. J. Gartner LP, *Texto Atlas de Histología* (págs. 311-312). México: Mc Grall Hill.
- Gil-Loizaga, P. (2011). Cultivo de células animales y humanas. En P. Gil-Loizaga, *Cultivo de células animales y humanas: aplicaciones en medicina regenerativa* (pág. 178). Madrid: visión.
- González, J. (2012). *Guía de laboratorio Biotecnología: pruebas de tamizaje para determinar efectos citotóxicos en extractos, fracciones o sustancias, utilizando la prueba MTT*. Cali.
- Hammiller, B. O., El-Abaseri, T. B., Dlugosz, A. A., & Hansen, L. A. (2015). A Method for the Immortalization of Newborn Mouse Skin Keratinocytes. *Frontiers in Oncology*, 5(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00177>
- Hennings, H., Michael, D., Cheng, C., Steinert, P., Holbrook, K., & Yuspa, S. H. (1980). Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19(1), 245–254. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(80\)90406-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(80)90406-7)
- Hernández, J., & Yvone, M. (2007). Programa interno para el cuidado y el uso de animales de laboratorio en las instituciones biomédicas docentes, de investigación científica e industria farmacéutica. *acta bioethica*, 9.

- L, B., & R, M. G. (2013). uso de animales de laboratorio en colombia: reflexiones sobre aspectos normativos y eticos. 7.
- Lichti, U., Andres, J., & Yuspa, S. (2008). Isolation and short-term culture of primary keratinocytes, hair follicle populations and dermal cells from newborn mice and keratinocytes from adult mice for in vitro analysis and for grafting to immunodeficient mice. *natura publishing*, 12.
- Mackneil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. En S. Mackneil, *Progress and opportunities for tissue-engineered skin* (pág. 874).
- Mast, A. (1992). The skin. In Wound Healing: Biochemical & Clinical aspects. En A. Mast, *The skin. In Wound Healing: Biochemical & Clinical aspects* (pág. 344). Filadelfia.
- Palastanga, N., Field, D., & Soamers, R. (2000). Anatomía y movimiento humano. En N. Palastanga, D. Field, & R. Soamers, *Anatomía y movimiento humano* (pág. 36). Barcelona: paidotribo.
- Rassner, G. (1999). Manual y atlas de dermatología. En G. Rassner, *Manual y atlas de dermatología* (págs. 5-6). Madrid: Harcuot.
- Reiisi, S., Esmaeili, F., & Shirazi, A. (2010). Isolation , culture and identification of epidermal stem cells from newborn mouse skin, 46(1), 54–59. <https://doi.org/10.1007/s11626-009-9245-y>
- Rheinwald, J., & Green, H. (1975). Formation of a keratinizing epithelium in culture by a clone cell line derived from teratoma. *The Cell.*, 317-330.
- Yuspa, S. (1970). The growth of fetal mouse skin in cell culture and transplantation to F1 mice. *J Invest Dermato*, 379-380
- Zhang, S., Yang, H., & Singh, L. (2002). An improved method for culture of epidermal keratinocytes from newborn mouse skin. *CEUR Workshop Proceedings*, 1225(February 2001), 41–42. <https://doi.org/10.1023/A>

ANEXOS

Anexo 1. Matriz de Marco Lógico.

Objetivo general: Estandarizar un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de líneas celulares primarias de queratinocitos <i>in vitro</i> .			
Objetivos específicos	Actividades	Supuestos	Indicadores
Establecer cultivos celulares primarios de tejido epidérmico en ratas neonatales.	<ul style="list-style-type: none"> • Obtener aprobación del comité de ética para el uso animal. • Revisión bibliográfica sobre protocolos para el aislamiento y cultivo de queratinocitos <i>in vitro</i> en ratas neonatales • Entrenamiento en el manejo de la asepsia, del cuarto de cultivo y equipos necesarios para la realización de los cultivos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Correcto funcionamiento de los equipos microscopio invertido y hemocitómetro. • Disponibilidad de los reactivos y materiales para la realización de los cultivos. • Contaminación microbiológica de los cultivos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Obtención de cultivos primarios de queratinocitos estables y reproducibles.

	<ul style="list-style-type: none"> • Planificar con el bioterio la obtención de las ratas neonatales para el tratamiento del tejido epidérmico. • Conseguir los reactivos y materiales estériles y posterior realización del protocolo (cultivo de queratinocitos) 		
<p>Estimular el crecimiento de las células primarias de queratinocitos a partir factores de crecimiento.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Adicionar factores de crecimiento específicos para queratinocitos para estimular la proliferación celular. • Verificar el crecimiento celular de los cultivos obtenidos. • Mantener el cultivo celular, renovando el 	<ul style="list-style-type: none"> • No exista proliferación del cultivo celular. • Crecimiento de otras líneas celulares en los cultivos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Obtener cultivos celulares de queratinocitos viables que se mantengan durante un tiempo establecido. • Porcentaje de crecimiento de células de queratinocitos en los platos de cultivo celular (confluencia)

	<ul style="list-style-type: none"> • medio de cultivo cada 3 días. 		
<p>Determinar la concentración de células y viabilidad del cultivo celular de queratinocitos a partir del tejido epidérmico.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Cuantificar las células en el cultivo utilizando colorantes de contraste 	<ul style="list-style-type: none"> • Baja concentración total de células de queratinocitos obtenidas en el cultivo. • Alto porcentaje de células muertas en el cultivo celular debido a falta de renovación del medio de cultivo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Recuento de número de células asiladas y porcentaje de células vivas no teñidas con el colorante Azul de tripán en el cultivo.

Anexo 2. Carta aprobación comité ética proyecto “Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la Enfermedad de Alzheimer” por el cual se utilizaron los tejidos epidérmicos sobrante de los biomodelos utilizados para la presente investigación.



Santiago de Cali, 05 de marzo de 2016
CICUAE 0011/2016

Sr(a). Alvaro Andres Barrera Ocampo
Investigador Principal- Universidad Icesi

ASUNTO: *Aprobación proyecto: “Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer”.*

El 18 de febrero del presente año, los miembros de CIECUAE de la Universidad Icesi revisaron y aprobaron el siguiente proyecto de investigación, dando cumplimiento a la ley 84 de 1989 y a la resolución de rectoría N° 847 (9 de Julio de 2012):

Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocampales a compuestos patogénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer”.

La presente se firma, el día (10), mes (Marzo), del año (2016)

Cordialmente,

Juliana Rengifo
Presidente –CIECUAE- Universidad Icesi

Calle 18 No. 122-135
PBX: (57-2) 555 2334, Fax (57-2) 555 2345
Cali - Colombia
www.icesi.edu.co