



**ESTANDARIZACION DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO
Y MANTENIMIENTO DE CÉLULAS PRIMARIAS DE FIBROBLASTOS DE
PIEL DE NEONATO DE RATA *IN VITRO***

Maria Constanza Bolaños Pava

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

**ESTANDARIZACION DE UN PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO, CULTIVO
Y MANTENIMIENTO DE CELULAS PRIMARIAS DE FIBROBLASTOS DE
PIEL DE NEONATO DE RATA *IN VITRO***

Maria Constanza Bolaños Pava

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

Tutor: Julián González Ospina M. Sc.

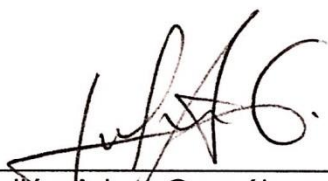
UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
CALI
2017



Aprobado por:



Alejandra Jerez
Evaluador



Julián Arbey González
Tutor del Proyecto

Santiago de cali, 09 Agosto 2017

AGRADECIMIENTOS

Le doy gracias en primer lugar a Dios por ser la fuerza que me guía cada día. Agradezco infinitamente a mis padres por todo su apoyo incondicional, por ser siempre la motivación para seguir adelante con mis proyectos, por todo su esfuerzo y dedicación para brindarme todo lo necesario en mi desarrollo personal y profesional, gracias por creer en mí.

Agradezco a mi tutor Julián González por la confianza que puso en mi para el desarrollo de este proyecto, al profesor Álvaro Barrera por los consejos y el apoyo durante el trabajo en el laboratorio, además por facilitar el recurso biológico utilizado durante todo el proyecto.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Steven David y Wyner Angulo por su apoyo y colaboración brindada durante el trabajo experimental, ya que fueron de vital importancia para la su culminación.

Finalmente agradezco a Juan Diego por su apoyo, por sus consejos, su paciencia y sus enseñanzas, gracias por ser una persona incondicional en todo momento. Y por último a mis amigos y compañeros de carrera, de cada uno aprendí algo especial y compartí momentos invaluable, que me permitieron llegar hasta donde estoy.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ANEXOS	8
GLOSARIO	10
RESUMEN DEL TRABAJO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUCCIÓN	13
2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO	14
2.1 Planteamiento y justificación del problema	14
2.2 Marco teórico y estado del arte.....	15
2.2.1 La piel: tejido conectivo	15
2.2.2 Fibroblastos.....	17
2.2.3 Cultivos celulares in vitro.....	18
2.3 Objetivos.....	21
2.3.1 Objetivo general	21
2.3.2 Objetivos específicos	21
2.4 Metodología.....	22
2.4.1 Animales Experimentales.....	22
2.4.2 Remoción de piel de rata neonatal.....	22
2.4.3 Alistamiento del area de trabajo	24
2.4.4 Disgregación enzimática con tripsina 0.25%.....	25
2.4.5 Disgregación enzimática con tripsina 24 horas a 4°C	25
2.4.6 Disgregación enzimática con collagenasa tipo IA y tripsina 0,05%....	26
2.4.7 Conteo y determinacion de viabilidad celular	26
2.4.8 Protocolo para el subcultivo celular.....	27
2.5 Resultados y discusión	28
2.5.1 Evaluación enzimática con tripsina 0,25%	29
.....	30
2.5.2 Evaluación enzimática con tripsina 24 horas a 4°C	34
2.5.3 Evaluación enzimática con Colagenasa tipo IA 1500 U/mg y Tripsina 0,05%	37
2.5.4 Evaluación morfológica de los fibroblastos aislados	40

2.5.5	Comparación estadística de los protocolos evaluados.....	41
2.6	Conclusiones	44
2.8	Recomendaciones	45
2.9	Referencias.....	46
ANEXOS		48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estructura anatómica de la piel.....	16
Figura 2. Morfología de fibroblastos.....	17
Figura 3. Procedimiento de lavado y desinfección del animal.	23
Figura 4. Procedimiento de remoción de la piel.	24
Figura 5. Evaluación de la disgregación enzimática con tripsina 0,25%.	30
Figura 6. Imágenes de cultivo celular primario de fibroblastos por el metodo de disgregación enzimática con tripsina 0,25%..	31
Figura 7. Imágenes de subcultivos de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con tripsina 0,25%.	33
Figura 8. Taza de crecimiento celular del cultivo aislado de fibroblastos.....	34
Figura 9. Evaluación de la disgregación enzimática con tripsina durante 24 horas a 4°C.....	35
Figura 10. Imágenes de cultivo celular primario de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con tripsina durante 24 horas.	36
Figura 11.Evaluación de la disgregación enzimática con collagenasa 1500 U/mg y tripsina 0,05%.	38
Figura 12. Imágenes de cultivo celular primario de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con collagenasa y tripsina.	39
Figura 13. Imágenes de subcultivos de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con collagenasa y tripsina.	40
Figura 14. Imágenes de cultivo celular de fibroblastos..	41
Figura 15. Comparación estadística del número de células totales obtenidas a partir del tratamiento realizado con tripsina 0,25% vs el tratamiento para queratinocitos (tripsina 24h 4°C).....	42
Figura 16. Comparación estadística del número de células totales obtenidas a partir del tratamiento realizado con tripsina 0,25% vs el tratamiento en combinación de collagenasa con tripsina.	43

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprobación comité de ética	48
Anexo 2. Matriz de marco lógico.....	49
Anexo 3. Análisis estadístico	51

GLOSARIO

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS - Fetal Bovine Serum

HEPES - Hydroxyethyl Piperazine-ethane-sulfonic Acid

HBSS - Hank's Balanced Salt Solution

MEM - Eagle Non-Essential Amino Acid Solution

NEAA – Nonessential Amino Acid Mixture

RESUMEN DEL TRABAJO

Los cultivos celulares consisten en el proceso que involucra el aislamiento de células o grupos celulares provenientes de un animal o planta y su consecuente crecimiento y desarrollo en un ambiente artificial favorable. Este tipo de sistemas funcionan como una herramienta importante de estudio en diferentes áreas de la ciencia básica y aplicada. Conjuntamente, en los últimos años ha crecido el auge del uso de estos modelos para el desarrollo de pruebas de toxicidad y sensibilidad *in vitro* de productos o ingredientes activos, como alternativa a las pruebas realizadas en modelos biológicos. Esto con el fin de reducir el uso de animales para la investigación.

Los fibroblastos son células presentes en mayor proporción en el tejido dérmico y son los responsables del soporte y la reparación de los tejidos. Este grupo celular cuenta con características morfológicas que le otorgan resistencia, además de que son células versátiles y presentan una notable capacidad para diferenciarse y vivir aislados de otros grupos celulares. estas características los hacen idóneos para el crecimiento *in vitro*.

El presente trabajo se centra en la realización y establecimiento de un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de líneas celulares primarias a partir de tejido dérmico proveniente de muestras de piel de neonatos de rata Wistar (P2-P8). Se realizaron diferentes repeticiones evaluando distintos métodos de obtención de fibroblastos basándose en protocolos encontrados en la literatura, cuya principal diferencia radicaba en las enzimas utilizadas en la etapa de disgregación.

Finalmente se logró establecer el método por el cual se obtiene la mayor cantidad de células con un alto porcentaje de viabilidad celular, el cual consiste en la utilización en conjunto de las soluciones de enzimas collagenasa tipo IA 1500 U/mg y tripsina 0,05%. Además, se realizaron subcultivos con el fin de establecer las mejores condiciones de desarrollo de los fibroblastos y con esto establecer el número total de pases posibles para realizar con este tipo de células.

Palabras clave: Cultivo celular primario, Fibroblastos, Neonato de rata, disgregación enzimática, Tripsina, Collagenasa tipo IA

ABSTRACT

Cell cultures consist in the process that involves isolating cells or cell groups from an animal or plant and its subsequent growth and development in a favorable artificial environment. These types of systems function as an important study tool in different areas of basic and applied science. In recent years, there has been a growing use of these models for the development of in vitro toxicity and sensitivity tests of active ingredients or products as an alternative to tests carried out on biological models. This in order to reduce the use of animals for research.

Fibroblasts are cells present in greater proportion in dermal tissue and are responsible for the support and repair of tissues. This cell group has morphological characteristics that give it resistance, as well as being versatile cells and have a remarkable capacity to differentiate and live isolated from other cell groups. These characteristics make them suitable for in vitro growth.

The present work focuses on the development and establishment of a protocol for isolation, culture and maintenance of primary cell lines from dermal tissue from skin samples from Wistar rat (P2-P8) neonates. Different replications were performed evaluating different methods of obtaining fibroblasts based on protocols found in the literature, whose main difference was in the enzymes used in the disintegration stage.

Finally, it was possible to establish the method by which the highest number of cells with a high percentage of cell viability is obtained, which consists of the use of enzyme solutions collagenase type IA 1500 U / mg and trypsin 0.05%. In addition, subcultures were performed in order to establish the best conditions for the development of fibroblasts and with this to establish the total number of passes possible to perform with this type of cells.

Key words: *Primary cell culture, Fibroblasts, Rat neonate, enzymatic digestion, Trypsin, Collagenase Type IA*

1 INTRODUCCIÓN

Los cultivos celulares son una de las principales herramientas utilizadas en biología celular y molecular, proporcionando excelentes sistemas modelo para el estudio de la fisiología y la bioquímica de las mismas. Este tipo de sistemas, hacen referencia al aislamiento de células de un animal o planta y su consecuente crecimiento en un ambiente artificial favorable (Alberts et al., 2002). Las células pueden ser extraídas directamente del tejido y disgregadas enzimática o mecánicamente.

Una de las principales ventajas que tiene la aplicación de cultivos celulares es que se permite realizar un control preciso del medio ambiente. Factores químicos como pH, temperatura, presión osmótica entre otros, pueden ser controlados, además de aspectos fisiológicos como crecimiento y densidad celular.

Uno de los aspectos que motivó más al desarrollo de este proyecto, fue desde la perspectiva ética, ya que anualmente se sacrifican miles de animales para la experimentación en distintas áreas. Aunque los cultivos celulares no pueden reemplazar los ensayos *in vivo* en todos los casos, representan una importante alternativa viable en muchos estudios.

En la actualidad el uso de cultivos celulares se ha extendido en diferentes campos como: la medición de los efectos de fármacos, ingredientes activos y compuestos tóxicos en las células; en la mutagénesis y carcinogénesis; en el desarrollo y detección de fármacos; y la fabricación a gran escala de compuestos biológicos como vacunas o proteínas terapéuticas. La principal ventaja del uso de cultivos celulares en cualquiera de estas aplicaciones es la consistencia y reproducibilidad de los resultados que pueden ser obtenidos (Gil-Loyzaga, 2011).

Este proyecto se centró en el establecimiento y la estandarización de un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de fibroblastos obtenidos a partir de tejido dérmico de neonato de rata *in vitro*. Los fibroblastos son el principal componente celular del tejido conectivo y la dermis, y cumplen con la función de soporte y reparación de tejidos y órganos. Además, cuentan con características que los hacen idóneos para promover su crecimiento *in vitro*. Es por esto que el desarrollo de este protocolo constituye una herramienta útil, no solo para futuros estudios de ciencia básica, sino como una alternativa para realizar ensayos *in vitro* de toxicidad e irritabilidad dérmica, reduciendo así el uso de biomodelos animales que usualmente son empleados en este tipo de pruebas.

2 DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO

2.1 Planteamiento y justificación del problema

La industria farmacéutica y cosmética dentro de los estudios de investigación y desarrollo de nuevos productos se ven obligados a evaluar diferentes características biológicas de los ingredientes activos y fármacos empleados en la fabricación de los mismos, incluyendo parámetros como eficacia y seguridad. Este tipo de ensayos en su mayoría son llevados a cabo en biomodelos animales, ya que constituyen una aproximación a los resultados que se pueden obtener en estudios con humanos.

La experimentación en animales es uno de los temas de mayor interés y polémica en los últimos tiempos. Si bien se sabe que existen varios casos en los cuales este tipo de estudios son necesarios, como los ensayos biomédicos, existen otros casos en los que es posible el uso de otras herramientas alternativas. Por esta razón, actualmente la ciencia ha avanzado en la implementación de opciones viables que representen una aproximación a los biomodelos animales. Dichas opciones se basan en el desarrollo de modelos *in vitro*, ya que estos cumplen con características que permiten tener resultados muy similares a los obtenidos por métodos *in vivo*.

Es aquí donde los cultivos celulares juegan un papel importante, ya que son la base de los estudios *in vitro* y se fundamentan principalmente en la reactividad de células aisladas. Esto constituye una herramienta útil no solo en el área de toxicología, sino también en el desarrollo de pruebas de sensibilidad e irritabilidad dérmica y ocular, de ingredientes activos cosméticos o farmacéuticos.

Desde el punto de vista ético, la sociedad se encuentra cada vez más sensibilizada en materia de experimentación animal. Por esta razón, los investigadores deben mantener el principio de las 3 R's planteado por Russel y Burch, el cual tiene en cuenta el refinamiento, la reducción y el reemplazo. Este modelo es una base para que se reduzca considerablemente el uso de animales en el laboratorio, disminuyendo así el daño producido a los mismos, y buscando métodos alternativos cuando sea posible.

Para hacer un aporte a la solución de esta problemática, este proyecto busca la estandarización de un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de fibroblastos. Estos, al ser un componente principal del tejido conectivo y de la dermis, pueden ser utilizados a futuro como una alternativa para realizar ensayos *in vitro* de toxicidad e irritabilidad dérmica.

2.2 Marco teórico y estado del arte

2.2.1 La piel: tejido conectivo

La piel es un órgano denso y elástico que cumple numerosas funciones de vital importancia para la homeostasis del organismo, es decir, el mantenimiento de su equilibrio interno. En primer lugar, regula el balance de los líquidos y electrolitos debido a la presencia de glándulas sebáceas y sudoríparas, las cuales permiten el paso de líquidos desde y hacia el interior de la piel, modulando así los cambios de temperatura corporal y contribuyendo a mantener el volumen vascular. En segundo lugar, funciona como barrera protectora de órganos internos contra agentes químicos, mecánicos y patógenos (Moini, 2015).

La piel está constituida por tres capas fundamentales: epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo (Figura 1). La dermis constituye la parte más voluminosa de la piel y aporta entre el 15 y 20% del peso total del cuerpo humano. Es en esta capa donde se encuentra la mayor proporción de folículos, glándulas sebáceas y sudoríparas. Además, allí se encuentran presentes diferentes poblaciones celulares tales como macrófagos, mastocitos, glóbulos blancos y en mayor proporción fibroblastos. El tejido dérmico está constituido principalmente por dos elementos: el tejido conectivo y la sustancia fundamental (Velez, Borrero, & Restrepo, 1990)

Todas las células que hacen parte de un organismo se pueden distribuir en diferentes poblaciones, las cuales a su vez se clasifican en tres grupos diferentes: intrínsecas o fijas, extrínsecas o migratorias, y extrínsecas transformadas. Las intrínsecas fijas o autóctonas son las células que nacen, viven y mueren en el tejido conectivo. A este grupo pertenecen las células adiposas, condroblastos, condrocitos, osteoblastos, y en mayor proporción los fibroblastos, motivo por el cual esta familia de células es la de principal interés para este proyecto (Gomez de Ferraris, 2009).

El tejido conectivo es un orden constitutivo supracelular conformado por poblaciones celulares que se encuentran inmersas en una matriz extracelular. Esta matriz está compuesta de material fibrilar diverso y sustancia fundamental amorfa que consiste en un conjunto de carbohidratos, proteínas y materiales lipídicos. Este tejido originado a partir del mesénquima embrionario, cumple la función de ser el sostén mecánico del organismo, la unión intertisular, el intercambio metabólico y energético, y la defensa y reparación orgánica (Gomez de Ferraris, 2009),

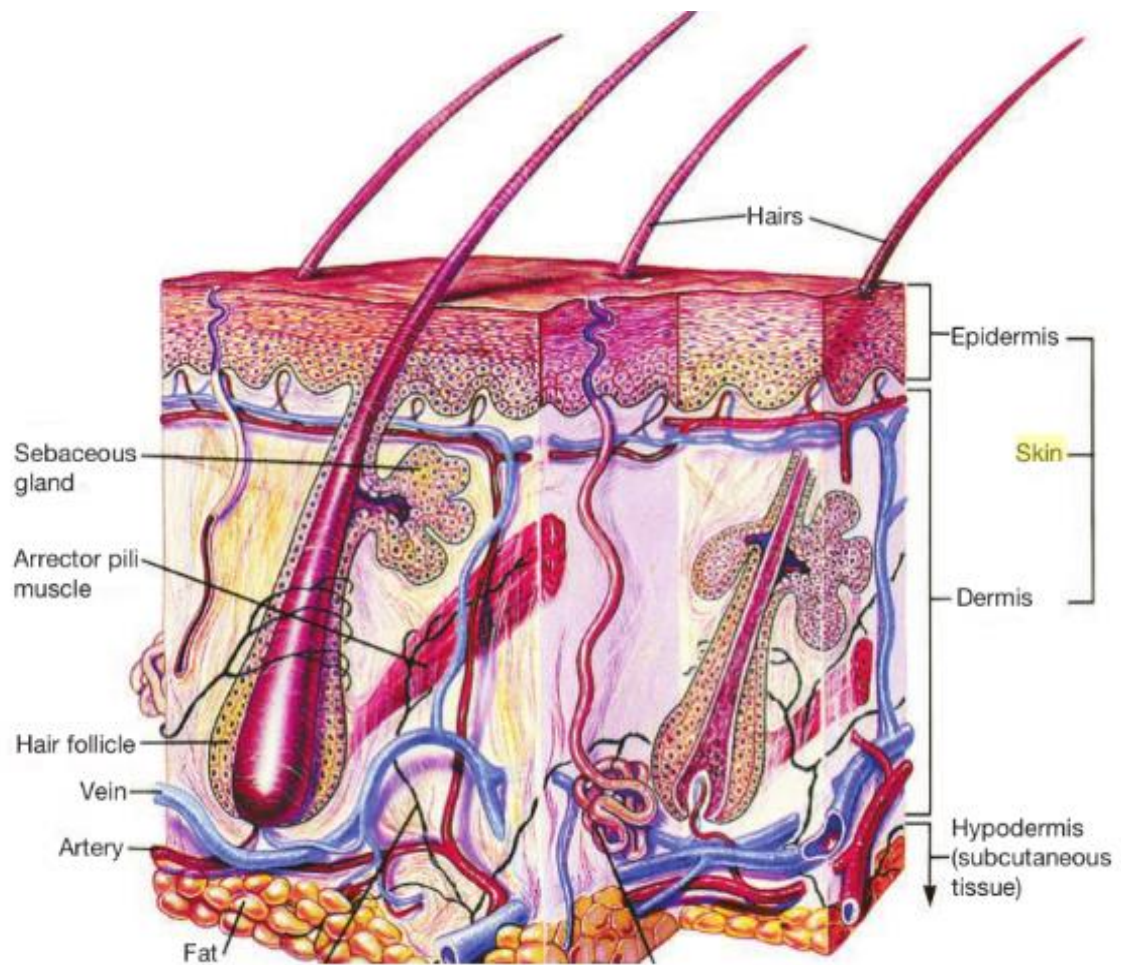


Figura 1 Estructura anatómica de la piel. Representación anatómica de las tres capas fundamentales constituyentes de la piel; epidermis, dermis y tejido celular subcutáneo. Imagen tomada de (Moini, 2015)

Existen distintas variedades de tejido conectivo, originadas por las diferentes proporciones y naturalezas de sus componentes. Se divide en tejido conectivo especializado y no especializado. Las características estructurales y morfológicas intrínsecas del tejido conectivo varían según la función de cada tipo. El desarrollo y mantenimiento de las células conjuntivas en condiciones *in vitro*, dependen de la posibilidad de reproducir las características funcionales que estas células tienen en el organismo (Gil-Loyzaga, 2011).

2.2.2 Fibroblastos

Las células del tejido conectivo juegan un papel muy importante en el soporte y la reparación de la mayoría de tejidos y órganos. Los fibroblastos son las últimas células especializadas que hacen parte de este grupo, y se encuentran distribuidos en el tejido conectivo a través del cuerpo, donde secretan una matriz extracelular no rígida que es rica en colágeno tipo I y III (Alberts et al., 2002).

Los fibroblastos son células basófilas, fusiformes, y de gran tamaño, con un núcleo esférico u ovoide y con numerosas prolongaciones que se extienden como fibras extracelulares que la misma célula sintetiza, tales como el colágeno y las glicoproteínas (Figura 2). La apariencia morfológica del fibroblasto varía de acuerdo con su estado funcional, por ejemplo, si la célula está fabricando activamente matriz extracelular, es más voluminosa y su núcleo es más laxo y prominente (Eynard, Valentich, & Rovasio, 2008). Las características morfológicas variadas de los fibroblastos se deben a que puede elaborar diferentes tipos de proteínas para exportación, como: topocolageno, elastina, diversas glucoproteínas, proteoglucanos y glucosaminoglucanos.

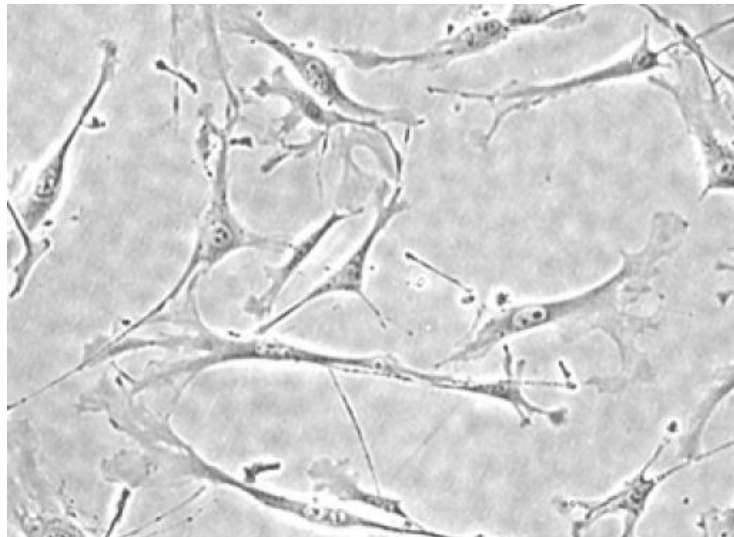


Figura 2. Morfología de fibroblastos. Cultivo de fibroblastos extraídos de pulmón de ratón, en crecimiento 100X. imagen tomada de (Seluanov, Vaidya, & Gorbunova, 2010)

Cuando un tejido está lesionado, los fibroblastos próximos a este proliferan y migran hacia el lugar de la herida, produciendo grandes cantidades de matriz de colágeno, lo que ayuda al aislamiento y la reparación del tejido dañado. En la etapa de cicatrización de una herida, los fibroblastos pueden cambiar la expresión del gen de actina y asumen algunas de las propiedades contráctiles de las células del músculo liso lo que contribuye a unir los bordes de la herida (Alberts et al., 2002).

Su habilidad para prosperar en el lugar de la lesión, así como su capacidad de vivir aisladas de otros grupos celulares, pueden explicar por qué los fibroblastos pueden crecer fácilmente en cultivos *in vitro*, una característica que las ha convertido en objeto de interés de estudios biológicos. Los fibroblastos también parecen ser las células más versátiles del tejido conectivo y representan una notable capacidad de diferenciarse en otros miembros de este grupo (Alberts et al., 2002)

2.2.3 Cultivos celulares *in vitro*

A mediados del siglo XIX tras el desarrollo de un gran número de estudios microscópicos y fisiológicos, aparecen los conocimientos conceptuales y técnicos que aporta la Embriología. Esto corresponde a uno de los principales factores que incentivaron el desarrollo de las técnicas de cultivos celulares. Los diferentes interrogantes que surgieron de las investigaciones con embriones, y que no podían ser respondidas solo con técnicas embriológicas, supusieron un gran impulso a los estudios *in vitro* (Gil-Loyzaga, 2011).

En 1885 el zoólogo y embriólogo Wilhelm Roux en su obra de la mecánica del desarrollo, quiso demostrar la actividad celular y sus interacciones durante el desarrollo embrionario. Fue así como se interesó por el aislamiento de células como un complemento adecuado a sus estudios de embriología, para lo cual utilizó fibroblastos de pollo y los cultivó en un medio con solución salina. Este bioensayo lo realizó con el fin de estudiar el comportamiento de la placa embrionaria *in vitro* (Gil-Loyzaga, 2011). Este experimento ha tenido un papel fundamental para los cultivos celulares, ya que fue el primero en establecer bases para entender el fenómeno del desarrollo celular bajo condiciones no fisiológicas.

Los cultivos de tejidos fueron ideados a principios del siglo XX como un método de estudio del comportamiento de las células animales, libre de variaciones sistemáticas que pudieran surgir *in vivo* durante la homeostasis normal, o bajo la presión de un experimento. Como su nombre lo indica, la técnica se elaboró primero con fragmentos de tejido sin disgregar, y el crecimiento se limita a la migración de las células a partir del fragmento de tejido (Freshney, 2005).

El primer cultivo celular fue realizado por el biólogo y anatomista Ross Harrison. En 1902 Harrison realizó el aislamiento de trozos de pared del tubo neuronal de embriones de rana y los mantuvo en un coágulo de un animal adulto, con esto pudo observar que a medida que pasaban los días, las células crecían y se diferenciaban hasta formar fibras nerviosas (Harrison, 1902). Estos estudios realizados por Harrison constituyen un pilar importante en el desarrollo de los cultivos de tejidos, y son la base de muchas investigaciones posteriores.

Unos años más tarde, Harrison en compañía de uno de sus discípulos Montrose Burrows, con el objetivo de obtener un medio de cultivo adecuado para la proliferación de células embrionarias, incorporaron plasma sanguíneo a cultivos de embrión de pollo, lo que favoreció el mantenimiento del cultivo celular.

En 1910, basado en los estudios de Burrows y Harrison, Alexis Carrel, un cirujano vascular e investigador francés, comenzó a investigar las técnicas de cultivo de tejidos. Fue así como inicio diversos trabajos experimentales que se basaron en el desarrollo del tejido conjuntivo, utilizando fibroblastos de embrión de pollo. Era de esperarse que el fin último de sus estudios *in vitro* (que continuaron hasta 1946), fuera la posible aplicación en cirugía. El aporte de Carrel a las técnicas de cultivos celulares fue muy amplio, comenzando por la mejora de técnicas de obtención y disección de los tejidos, aplicación de técnicas de asepsia, estudio y diseño de recipientes para el mantenimiento de los cultivos, y la obtención de medios de cultivo y los primeros factores de crecimiento (Carrel & Burrows, 1911).

En los años posteriores se inició el periodo de los cultivos de células disociadas en donde diferentes estudios permitieron comprender que, si se tenían las técnicas adecuadas, era posible mantener células eucariontes, procedentes de pluricelulares, en cultivo *in vitro*. Se iniciaron los procesos de incubación con tripsina, colágenas y pronasa, y poco a poco se han incluido otras enzimas no solo con fines de disociación celular, sino también para mejorar los propios cultivos como la DNAasa (E. N, 2015).

El término de cultivo celular actualmente hace referencia a un cultivo derivado de células dispersas tomadas del tejido original (un cultivo primario), o de una línea celular o cepa celular por disgregación enzimática, mecánica o química. Se diferencia de los cultivos de órganos, ya que estos consisten en un cultivo tridimensional de tejido disgregado *in vivo* (Freshney, 2005). Este conjunto de técnicas permite el mantenimiento de las células *in vitro* con todas sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. La suspensión celular puede ser cultivada como una monocapa adherente, o en suspensión en el medio de cultivo. En estos casos, a medida que transcurre el tiempo, se va perdiendo la heterogeneidad celular inicial, ya que predominan en el cultivo los tipos celulares con mayor tasa de crecimiento (Cultek, 2007).

Existen diferentes tipos de cultivos celulares que se realizan rutinariamente. Estos se pueden dividir en cultivos primarios y cultivos de líneas celulares establecidas. Los cultivos primarios pueden consistir en el cultivo de un órgano complejo o de una sección de un tejido, de una mezcla definida de células, o de células purificadas y aisladas directamente del organismo. Mas comúnmente, es posible emplear técnicas para purificar el tipo celular de interés y comenzar un cultivo primario que consista en su mayoría de dicho tipo celular (Jennie & Roberts, 1998).

Los cultivos primarios de células y órganos tienen la ventaja de que al ser removidos recientemente de su ubicación *in vivo* se podría esperar que se asemejen más a la función fisiológica original. La desventaja es que este tipo de cultivos reacciona constantemente a cambios del entorno durante los primeros días o semanas *in vitro*. Esto incluye el daño sufrido durante la extracción celular y la recuperación parcial de este daño, los cambios en el ambiente desde el animal hasta el cultivo *in vitro*, y el cambio de composición del cultivo cuando algunas células mueren, mientras que otras proliferan o se diferencian (Jennie & Roberts, 1998).

Actualmente, la aplicación de estas técnicas sigue en constante aumento. El desarrollo de los cultivos celulares en los últimos tiempos ha permitido alcanzar metas en numerosas disciplinas tanto en las Ciencias Básicas (Bioquímica, Biología Celular, Fisiología, Genética) como en las Ciencias de la Salud (Oncología, Toxicología, farmacología). Además, este tipo de investigaciones ha impulsado el uso de estas metodologías en el desarrollo de industrias que se especializan en la síntesis molecular de anticuerpos o fármacos (Gil-Loyzaga, 2011).

Es importante resaltar el uso de los cultivos celulares en áreas como la toxicología, donde son ampliamente empleados los modelos que se basan en la reactividad de las células aisladas, a pesar de las restricciones con respecto a la aproximación directa que se pueden realizar a los modelos *in vivo*. Las técnicas de toxicidad *in vitro*, han tenido un gran auge en los últimos tiempos, teniendo como base el concepto de la Dosis Letal 50 (DL-50), la cual representa la capacidad de inhibición del 50% de la proliferación celular. Este avance ha permitido que se utilicen estos modelos *in vitro*, como una alternativa viable al uso de biomodelos animales, no solo en el área de toxicología, sino en la realización de pruebas de irritabilidad y sensibilidad dérmica y ocular de ingredientes activos farmacéuticos o cosméticos. El desarrollo de estas técnicas ha tenido una gran acogida entre los movimientos de defensa animal, ya que se reduce considerablemente el número de animales empleados para estas pruebas. Además de que, en el marco reglamentario de ciertos países, sobre todo en Europa, ya se prohíbe el testeo en animales de productos cosméticos.

2.3 Objetivos

2.3.1 Objetivo general

Estandarizar un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento células primarias de fibroblastos de piel de rata neonatal *in vitro*.

2.3.2 Objetivos específicos

- Aislar células primarias de fibroblastos a partir de piel de neonato de rata *in vitro*, a partir de tres procedimientos diferentes.
- Promover el crecimiento y desarrollo de fibroblastos primarios *in vitro*.
- Cuantificar la tasa de crecimiento y la viabilidad celular del cultivo aislado de fibroblastos.

2.4 Metodología

La siguiente metodología se basa en dos procedimientos diferentes para la obtención de cultivos de fibroblastos a partir de tejido dérmico de neonato de rata. Dichos procedimientos difieren principalmente en las enzimas utilizadas durante la etapa de disgregación.

Los procedimientos seguidos para el presente trabajo se basan en los trabajos realizados por (Hansen, Girirajan, & Canfield, 2011) y (Takashima, 1998). Cada uno plantea un protocolo para el cultivo de fibroblastos. Se describirán más adelante.

2.4.1 Animales Experimentales

La investigación se realizó en ratas Wistar procedentes del Bioterio de la Universidad Icesi. Mantenido a una temperatura de 22 ± 2 °C, como comida y agua *libitum*. Las ratas se seleccionaron bajo las siguientes condiciones: Neonatos P2 – P8 (2 a 8 días post-natal).

2.4.2 Remoción de piel de rata neonatal

Los cuerpos donados para el proceso de extracción de la piel fueron obtenidos desde el momento de la decapitación según el protocolo del proyecto de investigación *“Evaluación de la vulnerabilidad de poblaciones de neuronas hipocámpales a compuestos patogénicos relacionados con la enfermedad de alzheimer”* bajo la tutoría del profesor Álvaro Barrera Ph.D. El procedimiento se describe a continuación.

Posterior al sacrificio del animal, se sumerge el cuerpo en yodopovidona (Figura 3. a y b) y se realiza un lavado. Después se retira el exceso de yodopovidona de la piel con etanol al 70% (Figura 3.c).

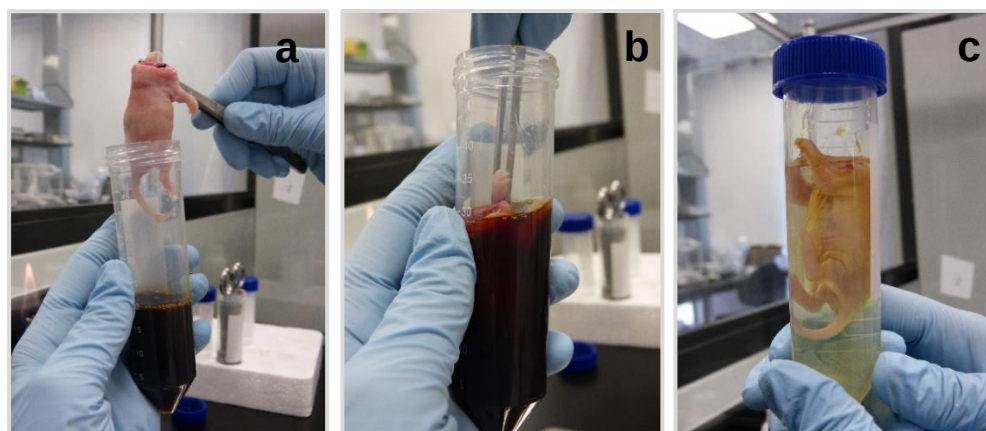


Figura 3. Procedimiento de lavado y desinfección del animal. Pasos a) y b), lavado con yodopovidona. c) desinfección con etanol 70%

Para la remoción de la piel, en primer lugar, se cortaron las extremidades por encima de las articulaciones de muñecas y tobillos (Figura 4.a), seguido de la cola (Figura 4.b), utilizando tijeras estériles. En segundo lugar, se realizó un corte perpendicular de la piel, introduciendo las tijeras desde el extremo del cuello hasta el agujero de la cola, a lo largo de la línea dorsal, sujetando el cuerpo firmemente con ayuda de pinzas (Figura 4.c). Posteriormente con el uso de pinzas se tomaron los extremos del corte y suavemente se afloja la piel lejos de la línea media (Figura 4.d). A continuación, se sujetó el cuerpo con una pinza y la piel con otra y se tiró suavemente por encima de los muñones hasta ser retirada totalmente del cuerpo (Figura 4.e y f). La piel removida se sumerge en un tubo falcon con solución salina. Finalmente, la muestra de tejido se trasladó a la cabina de flujo laminar donde se extendió en una caja de Petri previamente esterilizada, con la epidermis hacia abajo, de esta forma, se retiraron los contaminantes macroscópicos y el tejido adiposo presente. Con el uso de pinzas y escalpelo se realizó un raspado de la dermis y se descartó el tejido epidermico. La muestra de dermis fue diseccionada en fragmentos.

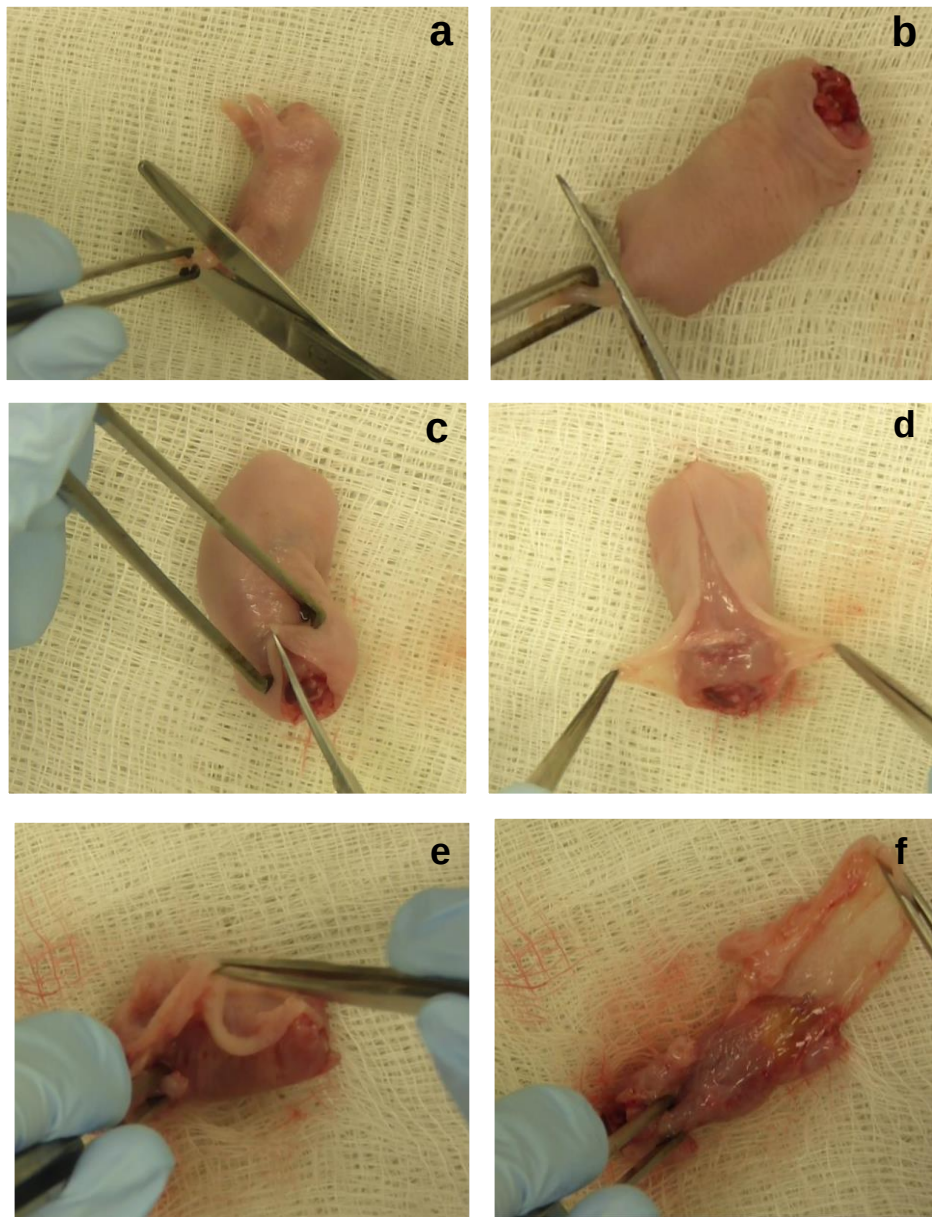


Figura 4. Procedimiento de remoción de la piel. a) corte de extremidades. b) corte de cola. c) corte del tejido por la línea dorsal. d) separación del tejido desde los extremos dorsales. f) remoción final de la piel.

2.4.3 Alistamiento del área de trabajo

El cuarto de cultivo debe ser un área que cuente con condiciones asépticas, es decir que tenga una carga microbiológica mucho más baja comparada con otras áreas del laboratorio, con el fin de evitar la contaminación de los cultivos celulares

y los demás procedimientos que se realizan en esta área. Para esto, se debe ingresar al cuarto siguiendo las normas establecidas en cuanto al uso de bata y zapatos exclusivos para este lugar, además de gorro y tapabocas. Adicional a esto, se realiza mensualmente la limpieza de todo el cuarto incluyendo la cabina de flujo laminar siguiendo el protocolo estandarizado para este proceso.

Todos los elementos que ingresan a la cabina de flujo laminar son sanitizados con etanol al 70%, estos elementos han sido previamente esterilizados en autoclave. Una vez realizado esto, se configuró la cabina para la exposición del material de trabajo a luz UV durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo se dio inicio al sistema de ventilación durante 10 minutos, en este momento se ingresaron los reactivos previamente sanitizados con etanol al 70% tales como medios de cultivo y soluciones enzimáticas.

2.4.4 Disgregación enzimática con tripsina 0.25%

Los fragmentos de tejido dérmico se adicionaron a un tubo Falcon con 3 mL de tripsina 0,25% y se incubaron durante 10 minutos en baño de agua a 37°C, transcurrido este tiempo, se adicionaron 3 mL de medio de inactivación (DMEM + PBS 10%). Se homogenizó la mezcla con el uso de vortex (Vortex Genie®2, velocidad 5) y con el uso de pipeta Pasteur se realizó la disgregación mecánica del tejido pipeteando 15 a 20 veces aproximadamente para romper los agregados. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 1200 rpm y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 2 mL de medio de cultivo suplementado (DMEM + FBS 10%, HEPES 1%, NEAA 1%, L-glutamina 1%, penicilina/estreptomicina 1%, Piruvato de sodio 1%) y se realizó el conteo celular con el colorante azul de tripán como se ampliará más adelante, finalmente se sembró en frascos de cultivo y se incubó a 37°C, 5% CO₂.

Se realizaron cambios de medio suplementado realizando un lavado previo de las células con solución salina cada 3 días

2.4.5 Disgregación enzimática con tripsina 24 horas a 4°C

Se realizaron dos ensayos siguiendo un procedimiento adicional para la obtención de fibroblastos utilizando el material dérmico sobrante de otro proyecto de investigación titulado *“Estandarización de un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de células primarias de queratinocitos in vitro”* (Angulo, 2017). En el cual, después de retirada la piel esta se somete a un tratamiento con tripsina por 24 horas a 4°C, que consiste en suspender la piel retirada de la rata en una caja Petri que contenía tripsina, solo haciendo contacto con la dermis, como se describe en el protocolo publicado por (Lichti, Anders, & Yuspa, 2008). Después

de transcurrido este tiempo se siguió el procedimiento mencionado en el numeral anterior.

2.4.6 Disgregación enzimática con collagenasa tipo IA y tripsina 0,05%

Los fragmentos de tejido dérmico se adicionaron a un tubo Falcon con 0,5 mL de solución de Collagenasa tipo IA y se incubaron durante 25 minutos a 37°C en un baño de agua. Transcurrido este tiempo, se centrifugó el contenido durante 5 minutos a 1000 rpm y se descartó el sobrenadante resultante. Se realizó un lavado al pellet con 3 mL de HBSS y se realizó nuevamente el proceso de centrifugación en las condiciones mencionadas. Se descartó el sobrenadante y se adicionaron 0,5 mL de tripsina al 0,05% y se incubó durante 20 minutos a 37°C en baño de agua. Posteriormente se realizó otro proceso de centrifugación en las mismas condiciones y finalmente se resuspendió el pellet en 1 mL de medio de cultivo suplementado (DMEM + FBS 10%, MEM 1%, penicilina/estreptomicina 1%). Se realizó el conteo celular con el colorante azul de tripán, se sembró en frascos de cultivo y se incubó a 37°C 5% CO₂ 3% O₂.

Se realizaron cambios de medio suplementado realizando un lavado previo de las células con solución salina cada 3 días

2.4.7 Conteo y determinación de viabilidad celular

Para el conteo y la determinación de la viabilidad celular de los cultivos realizados a partir de los procedimientos anteriores, se realizó el ensayo con azul de tripán, un colorante azoico derivado de la toluidina. Esta permite la evaluación de viabilidad celular por exclusión de captación, ya que este colorante no puede penetrar y teñir a las células vivas con membranas integrales.

Para realizar este procedimiento, en primer lugar, se tomó una alícuota de 90 µL de colorante azul de tripán. Posteriormente se le adicionó una alícuota de 10 µL de la suspensión celular obtenida previamente tras la resuspensión del pellet con medio de cultivo suplementado. Esta mezcla se homogeneizó pipeteando varias veces y finalmente se tomó una alícuota de 10 µL la cual se dispuso en una cámara de Neubauer, para ser observada bajo un microscopio óptico invertido.

Para determinar el porcentaje de viabilidad celular a partir del conteo del número de células vivas y muertas, se tuvo en cuenta la siguiente ecuación.

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{número de células vivas totales}}{[\text{número de células totales (vivas+muertas)}]} \times 100 \quad [1]$$

2.4.8 Protocolo para el subcultivo celular

Cuando se llegó a la confluencia celular, se realizó el procedimiento para el subcultivo con el fin de determinar el número de pases posibles antes de llegar al fenómeno de senescencia. En primer lugar, dentro de la cabina de flujo laminar, se retiró el medio de cultivo con el uso de pipeta y se descartó. Se realizó un lavado con 5 mL de solución salina a los frascos de cultivo varias veces y se descartó. Se adicionó 1 mL de tripsina/EDTA al 0,25% a cada frasco y se distribuyó uniformemente. Posteriormente se incubó a 37°C durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se verificó que las células se encontraran completamente desadheridas, se procedió a adicionar 4 mL de medio de inactivación (solución salina + FBS 5%) y se transfirió a un tubo Falcon. A continuación, se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet con 2 mL del medio de cultivo suplementado y se realizó el procedimiento para el conteo celular y se realizaron los cálculos pertinentes para determinar la cantidad de células a sembrar en cada frasco. Finalmente se completó el volumen adicionando 7 mL de medio suplementado después de la siembra en cada frasco. Se incubaron los frascos obtenidos a 37°C 5% CO₂.

Este procedimiento fue realizado cada 2-3 días según se incrementará confluencia celular.

2.5 Resultados y discusión

Los fibroblastos son el principal componente del tejido conectivo, donde juegan un papel importante manteniendo la integridad estructural. A pesar de que existen algunas diferencias en la composición total de la piel de ratas y humanos, la dermis, es un tejido conectivo fibroso y filamentoso que contiene una composición similar en ambos casos de fibroblastos, células endoteliales, macrófagos y ocasionalmente leucocitos. Es por esto que es posible realizar cultivos celulares a partir de tejido dérmico de rata, que pueden ser comparables con los resultados que puedan ser obtenidos a partir de tejido humano. Esto los hace idóneos como alternativa para futuros ensayos de toxicidad e irritabilidad dérmica de productos cosméticos (Schuhmachers & Xu, 1995).

A pesar de la complejidad de la composición celular, se pueden obtener cultivos de fibroblastos relativamente puros a partir de especímenes de piel sin un proceso sofisticado de purificación. Esto se debe al hecho de que los fibroblastos crecen rápida y continuamente cuando se cultivan en presencia de suero, al contrario de otros grupos celulares que requieren adicionalmente factores de crecimiento específicos (Schuhmachers & Xu, 1995).

A continuación, se describen y analizan los resultados obtenidos para el aislamiento de fibroblastos primarios a partir de tejido dérmico de neonato de rata Wistar (P2-P8) a partir de diferentes métodos, variado principalmente las enzimas usadas para la disgregación del tejido y los medios de cultivo.

La disgregación del tejido al igual que el subcultivo celular, son etapas en las que se requiere la separación de las células entre si y de un sustrato, teniendo en cuenta que se debe mantener la viabilidad de las mismas. Para esto se tiene que romper la malla de proteínas que forman la matriz extracelular que las mantiene unidas. Generalmente esto se consigue por tres posibles métodos o una combinación de los mismos: mecánicos, químicos o enzimáticos (Cultek, 2007). En el caso del presente trabajo, se evaluaron 3 técnicas de disgregación enzimática, basándose en trabajos publicados previamente y teniendo en cuenta la naturaleza del tejido con el que se iba a trabajar.

En primer lugar, se realizó una evaluación de cada método por separado teniendo en cuenta el número total de células obtenidas en cada repetición y su respectiva viabilidad. Finalmente se realizó un análisis comparativo de los tres métodos con el fin de determinar cuál fue el más idóneo para la obtención de fibroblastos a partir de tejido dérmico.

2.5.1 Evaluación enzimática con tripsina 0,25%

Con el fin de evaluar el efecto de la actividad enzimática de la tripsina en el tratamiento para el aislamiento de fibroblastos de piel de neonato de rata, se realizaron 5 ensayos diferentes, utilizando en cada uno, el tejido dérmico de 5 animales distintos (Ratas Wistar P2-P8). En la figura 5 se observan los gráficos obtenidos del número de células aisladas del tejido y el porcentaje de viabilidad celular en cada caso.

La tripsinización es un método por el cual se ha demostrado que es posible obtener células vivas mono dispersas a partir de un tejido animal, en este caso, la muestra animal consistía en tejido dérmico de neonato de rata Wistar, debido al tipo de células de interés para el aislamiento. Esta enzima, puede degradar diferencialmente la matriz proteica que permite la unión de las células con el tejido. De esta forma, se puede liberar estas células en suspensión evitando que se generen daños importantes en las mismas (Gio, 1964). Es por esta razón, que la tripsina ha sido la enzima de elección para la disgregación en la mayoría de líneas celulares.

Un paso determinante del éxito y el correcto aislamiento de los fibroblastos a partir del tejido dérmico es entonces esta etapa de digestión enzimática. Los investigadores, además de lo mencionado anteriormente, pueden necesitar comparar varias condiciones (por ejemplo, lotes de tripsina, concentraciones de tripsina y períodos de incubación) para maximizar el rendimiento celular mientras se mantiene la viabilidad celular (Takashima, 1998).

En el caso del presente trabajo, se utilizó la tripsina procedente del mismo lote y con la misma concentración (0,25%), con el fin de evitar que estas variaciones afectaran los resultados. De igual forma, en cada uno de los ensayos se verificó el tiempo y la temperatura de incubación para que siempre fuera el mismo en cada caso (10 minutos a 37°C).

En la Figura 5, A se puede observar el número de células obtenidas a partir del tejido disgregado. En la gráfica se puede ver que el número de células varía en un rango desde 2×10^6 hasta 3.8×10^6 aproximadamente. En los resultados planteados para el seguimiento del protocolo por Takashima y colaboradores, que fue tomado como base para esta parte del trabajo, sugieren que se pueden obtener entre $1-3 \times 10^6$ células por muestra de piel, lo cual se encuentra dentro del rango de los resultados obtenidos en este trabajo.

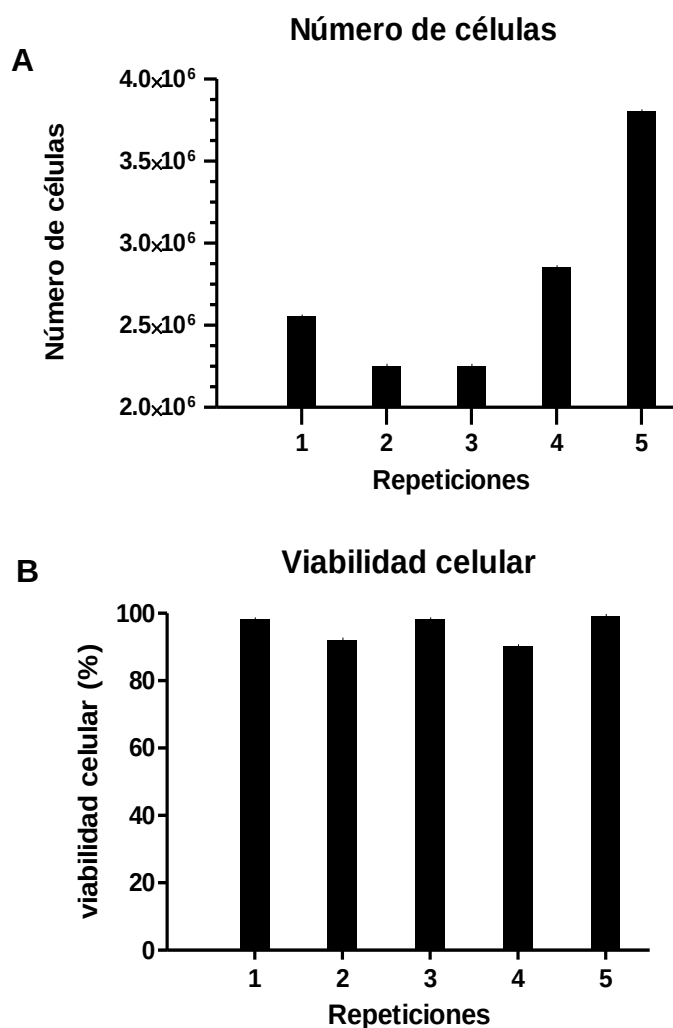


Figura 5. Evaluación de la disgregación enzimática con tripsina 0,25%. A) número de células obtenidas en las diferentes repeticiones. **B)** porcentaje de viabilidad celular obtenido para cada repetición

Es necesario tener en cuenta que además de las variables mencionadas anteriormente, existe una variable ajena al proceso de tripsinización que de todas formas afecta el resultado del número de células, se trata de la cantidad de sustrato, es decir de la muestra de tejido que será sometida al proceso de disgregación (Gio, 1964). esto puede explicar el rango de variabilidad del número de células obtenido en cada repetición (Figura 5,A). Ya que, en el momento de realizar el raspado de la dermis de la muestra de piel completa removida del animal, es un proceso que por las condiciones de trabajo puede llegar a ser muy variable, ya que, aunque se use la misma hoja para el escarpelo, no puede asegurarse que la cantidad de dermis extraída sea la misma, ya sea porque el

tamaño de la muestra de piel varíe, o existan pérdidas del tejido cuando se realiza la limpieza del mismo.

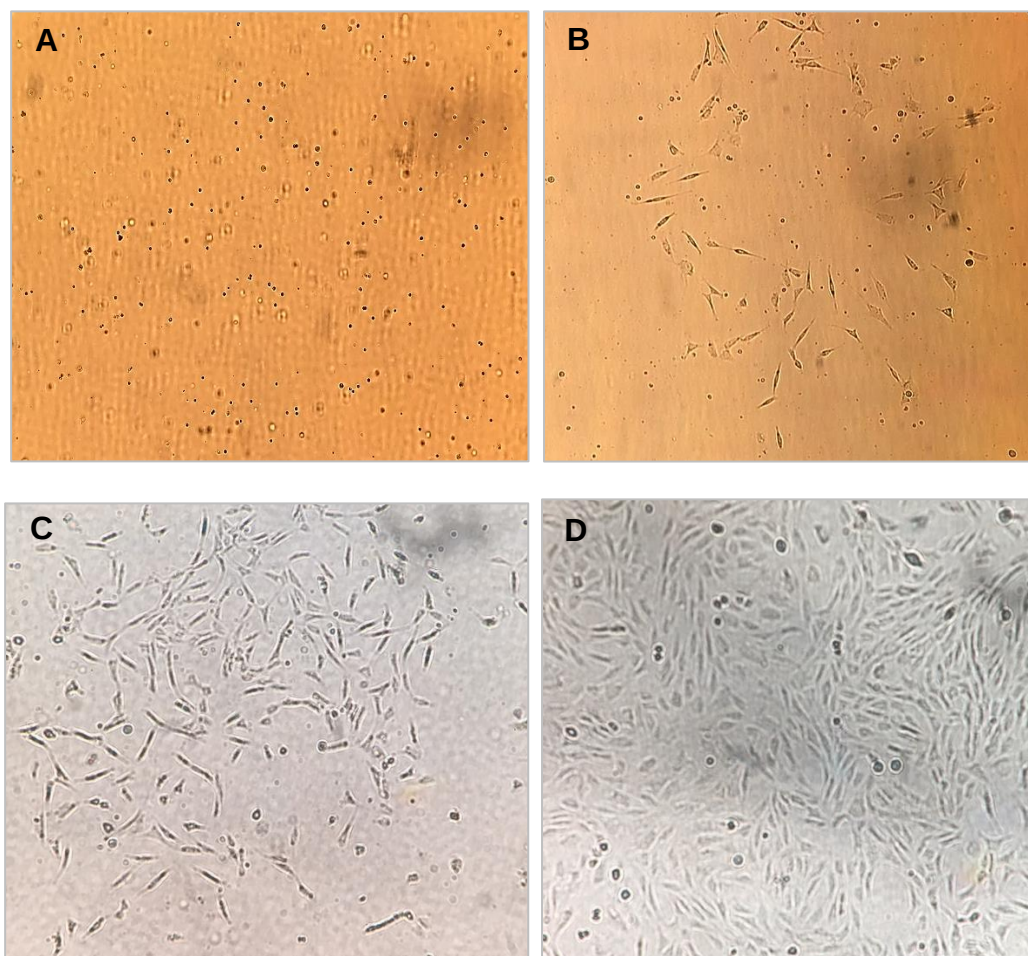


Figura 6. Imágenes de cultivo celular primario de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con tripsina 0,25%. A) Día 0, objetivo 4X. B) Día 1. Objetivo 4X. C) Día 3, objetivo 4X. D) Día 6, objetivo 10X.

Además de lo mencionado anteriormente, la condición estructural de la dermis no permite seccionar homogéneamente la muestra, ya que la dermis consiste en una capa viscosa y difícil de expandir en su totalidad, lo que dificulta medir el área de cada sección y a su vez garantizar que todas sean iguales. Es importante resaltar el efecto que tiene el tamaño de los fragmentos de tejido seccionados, ya que a menor tamaño, se puede optimizar más la concentración de enzima y el periodo de incubación (Takashima, 1998). Lo que de alguna forma refuerza el hecho de obtener variabilidad en cada una de las repeticiones realizadas para este procedimiento.

En cuanto a la viabilidad celular, como se puede observar en la Figura 5.B, los resultados para todas las repeticiones se encuentran entre 90-100% lo que representa un resultado favorable para este método, ya que lo que se busca es que la cantidad de células extraídas de la muestra de tejido puedan ser cultivadas y mantenidas satisfactoriamente en el tiempo.

Por otra parte, en la figura 6, se pueden observar las imágenes correspondientes a uno de los cultivos primarios obtenidos por este método a través de los días. Se observa en primer lugar (Figura 6.A) la morfología de las células sembradas inmediatamente después del proceso de aislamiento. En esta etapa las células presentan forma redondeada pues aún no se encuentran adheridas al frasco de cultivo. Al transcurrir el tiempo (Figura 6.B,C) se evidencia el cambio en la morfología de las células, se ven más alargadas y con protuberancias como se describen en la literatura (Figura 2), además se puede ver el aumento en el número de células presente en el plato de cultivo. Finalmente se puede ver el fenómeno de confluencia celular que ocurre después de la replicación de las células hasta formar una monocapa que cubre toda la superficie del frasco de cultivo (Figura 6,D). Es en esta etapa donde se realiza el proceso de subcultivo.

En la figura 7, se tienen las imágenes correspondientes a los subcultivos realizados a partir del cultivo primario. Se puede observar que en el día 1 las células sembradas se encuentran totalmente adheridas y en el día 3 se logra llegar a la confluencia celular (Figura 7, A,B). Por otra parte, se hace evidente el cambio en la morfología a medida que aumenta el número de pases. En la figura 7,C se pueden observar cambios en la forma y tamaño de las células comparándolas con las células del cultivo primario o incluso con pases de menor número. De la misma manera en el pase 10 (Figura 7,D) se ve que la forma alargada de los fibroblastos originales ha cambiado notablemente, además de el hecho de que se evidencia el deterioro celular mostrando una membrana menos definida. Es en este punto donde se llega al fenómeno de senescencia, que hace referencia al momento en que se detiene la reproducción y el crecimiento celular en respuesta al estrés y el daño celular producido por el tiempo y la cantidad de subcultivos realizados (Klaus & Klaus, 1979).

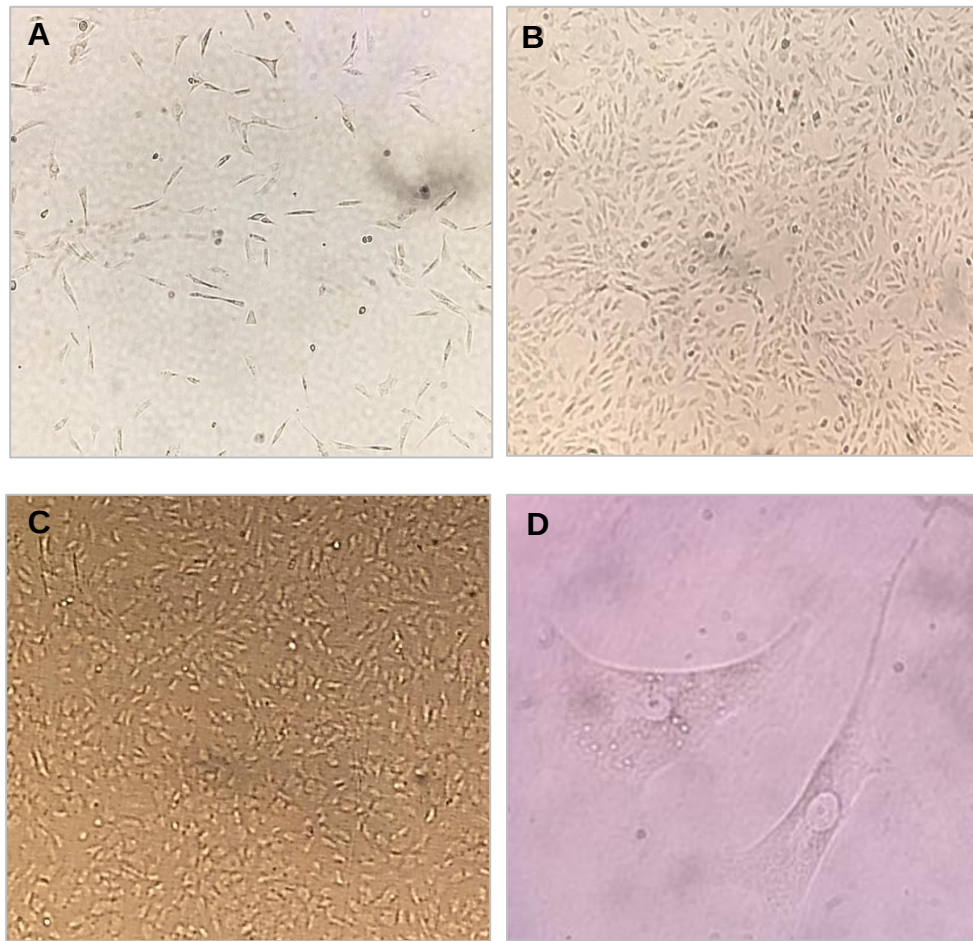


Figura 7. Imágenes de subcultivos de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con tripsina 0,25%. A) P1 día 1, objetivo 4X. B) P1 día 3. Objetivo 4X. C) P5 día 2, objetivo 4X. D) P10 día 2, objetivo 100X.

Finalmente en la Figura 8 se puede observar el grafico obtenido que representa la taza de crecimiento celular del cultivo aislado de fibroblatos por el metodo de disgregacion enzimatica con tripsina. En el eje "x" se representa el numero de pases y en el eje "y" la cantidad de células determinadas en el conteo celular. Como se muestra en la linea de tendencia, se presenta un crecimiento exponencial del numero de células entre los pases 2 y 3, a partir de este se muestra otro aumento menos marcado del numero de células hasta presentar una disminucion gradual de las mismas.

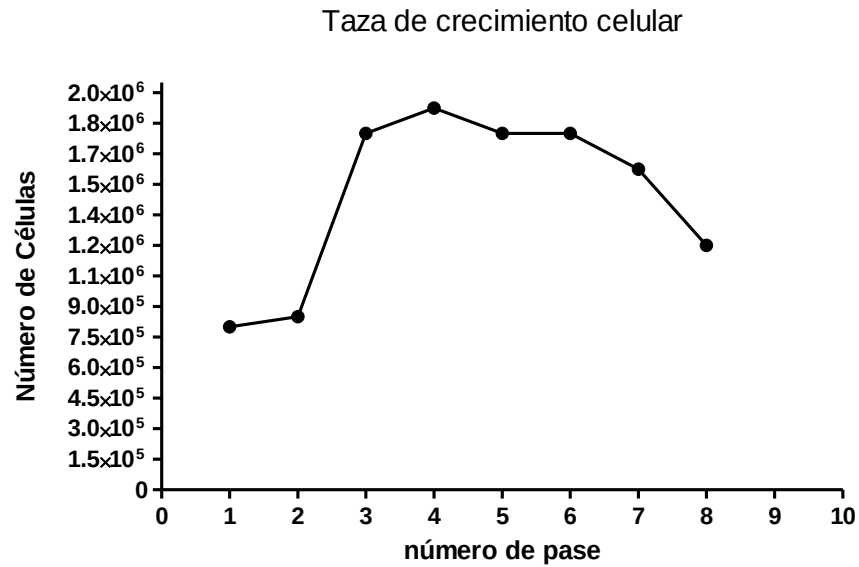


Figura 8. Taza de crecimiento celular del cultivo aislado de fibroblastos.

2.5.2 Evaluación enzimática con tripsina 24 horas a 4°C

Como se explicó en el numeral **2.4.5** se realizaron dos ensayos sometiendo la muestra de piel (dermis y epidermis) suspendida en tripsina durante 24 horas a 4°C. Se quería verificar si era posible obtener una cantidad significativa de fibroblastos por este método, ya que, de ser así, se podría plantear un protocolo en el cual se obtengan de manera simultánea, fibroblastos y queratinocitos aislados, utilizando la misma muestra de tejido.

En la Figura 9 se observa el número de células obtenidas a partir de este método y su respectiva viabilidad. Como se puede ver, el número de células se encuentra en un intervalo de 100000 células de diferencia, lo que puede significar cierta homogeneidad en los resultados con este método, sin embargo, no se puede asegurar esto debido a las pocas repeticiones realizadas para el mismo.

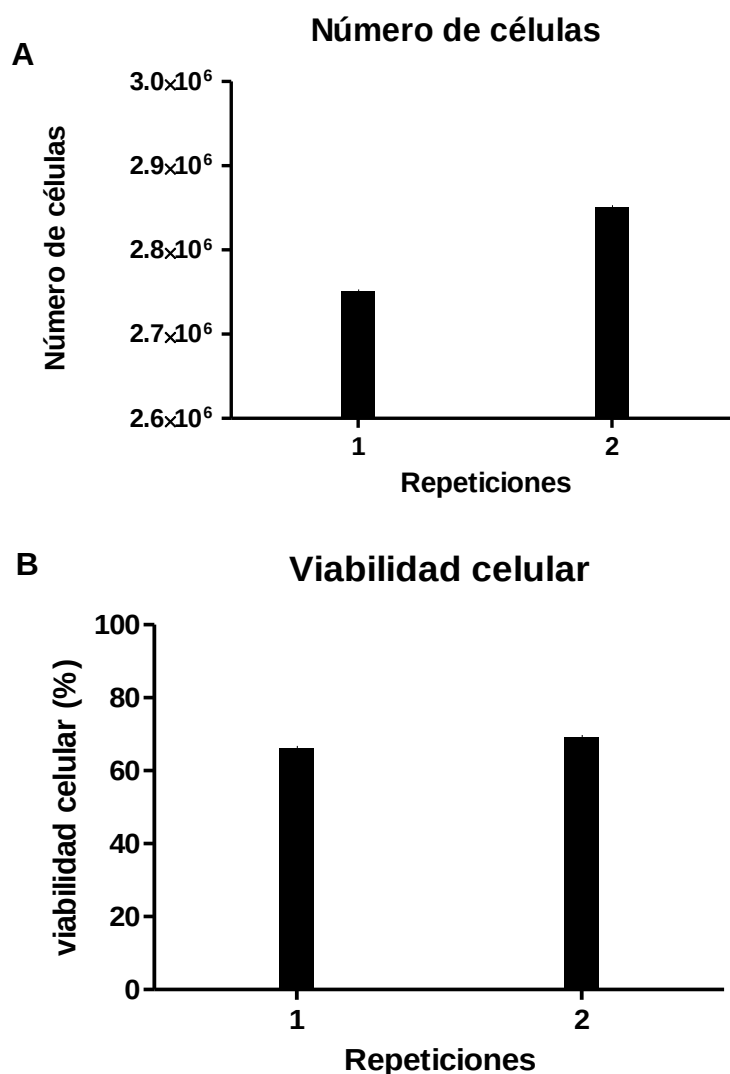


Figura 9. Evaluación de la disgregación enzimática con tripsina durante 24 horas a 4°C. A) número de células obtenidas en las diferentes repeticiones. B) porcentaje de viabilidad celular obtenido para cada repetición.

El motivo principal de no realizar más repeticiones para este tratamiento, se debe a los resultados obtenidos de la viabilidad celular en ambos casos, ya que como se puede observar en la Figura 9,B, el porcentaje de viabilidad es <70% por el método de exclusión con azul de tripán, esto indica sobredigestión del tejido (Takashima, 1998).

El tiempo en el que se somete el tejido a la disgregación con tripsina es la etapa más crítica en este proceso, lo que afecta directamente a la viabilidad celular. En este caso, al someter el tejido 24 horas suspendido en tripsina, se puede evidenciar en los resultados que los fibroblastos presentes en este fueron

disgregados en mayor proporción debido al aumento en el tiempo de contacto de estos con la tripsina. Es por esto que se puede concluir que no es viable utilizar este método para el aislamiento de fibroblastos primarios.

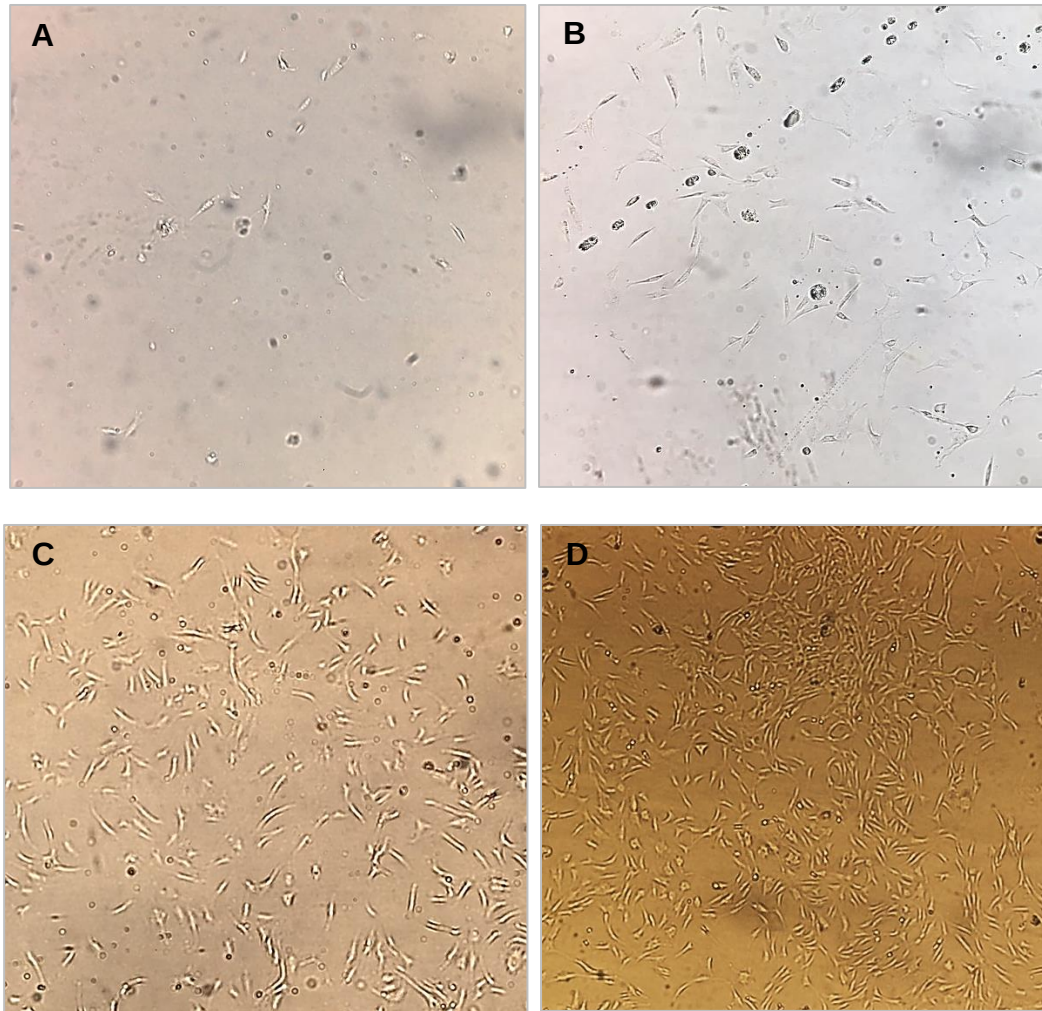


Figura 10. Imágenes de cultivo celular primario de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con tripsina durante 24 horas. A) Día 2, objetivo 4X. B) Día 5. Objetivo 4X. C) Día 8, objetivo 4X. D) Día 10, objetivo 4X.

Otro aspecto a tener en cuenta es el evidenciado en la figura 10. El crecimiento y tiempo de duplicación de los fibroblastos obtenidos fue mucho más lento comparado con el método descrito en el numeral **2.5.1**. En el día 10 (Figura 10,B), aunque se ve un gran número de células, todavía no se observa una monocapa uniforme en el frasco de cultivo, lo que quiere decir, que no se ha llegado a la confluencia celular. En este orden de ideas se concluyó que éste protocolo no es el idóneo para el aislamiento de fibroblastos de tejido dérmico de neonato de rata.

2.5.3 Evaluación enzimática con Colagenasa tipo IA 1500 U/mg y Tripsina 0,05%

Con el fin de evaluar el efecto de la actividad enzimática de la colagenasa en combinación con tripsina en el tratamiento para el aislamiento de fibroblastos de piel de neonato de rata, se realizaron 4 ensayos diferentes, utilizando en cada uno, el tejido dérmico de 4 animales distintos (Ratas Wistar P2-P8). En la Figura 11 se observan los gráficos obtenidos del número de células aisladas del tejido y el porcentaje de viabilidad celular obtenido en cada caso.

Como se ha mencionado anteriormente, en los protocolos planteados para el aislamiento celular de tejidos, se utilizan diferentes métodos de disgregación y dentro de los enzimáticos se plantean procedimientos con combinación de diferentes enzimas con el fin de aprovechar las características de cada una y así optimizar la obtención de células viables.

Es por esto que para este proyecto se tomó como base el procedimiento para la obtención de fibroblastos a partir de muestras de tejido de ratones adultos desarrollado en la universidad de Washington, departamento de ciencias genómicas. Ya que para la etapa de disgregación enzimática proponen el uso concomitante de tripsina y colagenasa tipo IA, en diferentes etapas de disgregación como se describe en la metodología (Hansen et al., 2011). Esta combinación de enzimas se propone para cultivos formados por múltiples capas de células, especialmente en cultivos productores de colágeno (Cultek, 2007), como es el caso de los fibroblastos.

Como se puede evidenciar en el gráfico A de la Figura 11, existe gran variabilidad en el número total de células obtenidas para cada una de las repeticiones realizadas por este método. Como se mencionó anteriormente para el caso de la tripsina, una etapa determinante en este procedimiento es el raspado de la dermis que permite obtener el tejido de interés, y evitar la contaminación de los cultivos con otros grupos celulares presentes en otras capas de la piel. En este caso, al someter la muestra a dos procesos de disgregación enzimática, puede acrecentar la desviación de los resultados y hacer más crítico este factor al igual que el de las dimensiones de los cortes del tejido dérmico, ya que, como se mencionó anteriormente, al ser más pequeños los cortes, habrá más sitios de acción para las enzimas, así como también la habilidad del investigador.

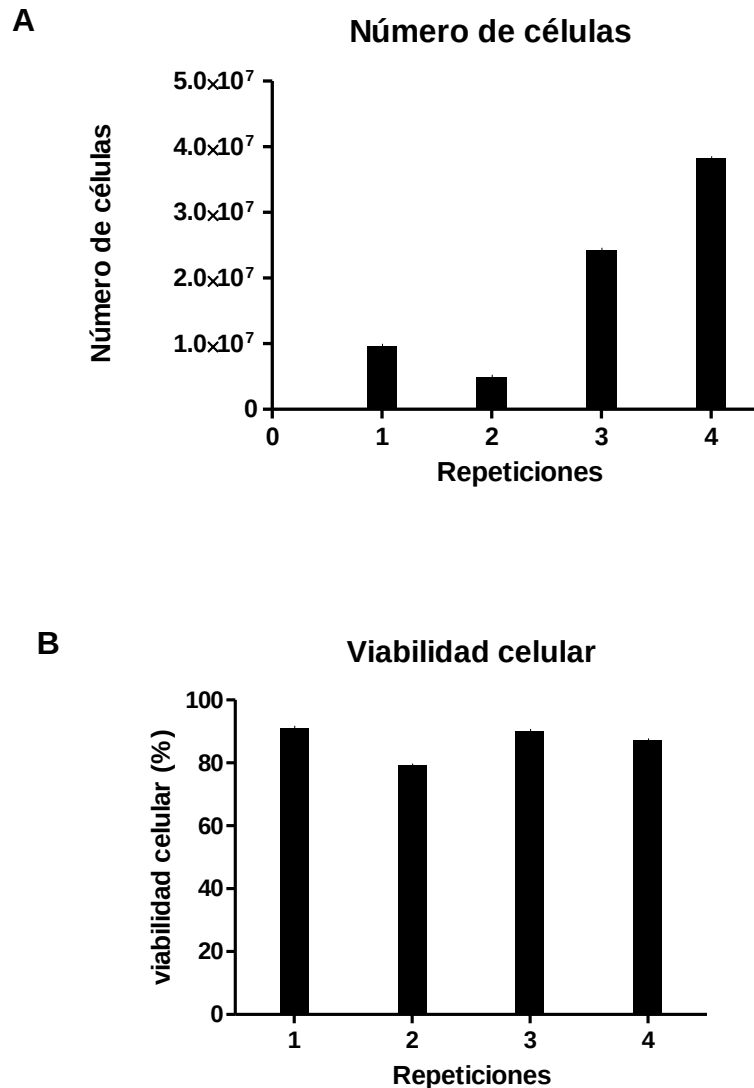


Figura 11. Evaluación de la disgregación enzimática con collagenasa 1500 U/mg y tripsina 0,05%. A) número de células obtenidas en las diferentes repeticiones. **B)** porcentaje de viabilidad celular obtenido para cada repetición.

Sin embargo, a pesar de la variación, se puede evidenciar el notorio aumento en el número de células obtenidas por este método. Ya que cada una de las enzimas implicadas cumple un papel importante y que puede ser aprovechado satisfactoriamente en este procedimiento. En el caso de la collagenasa, por si sola no dará una sola suspensión celular si hay células epiteliales presentes, pero de esta forma la enzima puede ser menos dañina para las células. Por el contrario, la tripsina ofrece una disgregación más completa, sin embargo, esta enzima puede ser más citotóxica, es decir, que puede producir mayor daño a la integridad de las células (Freshney, 2005). Es así como la combinación de estas dos enzimas

favorece la optimización de los resultados, teniendo en cuenta el número de células totales aisladas de cada muestra de piel, así como del porcentaje de viabilidad obtenido para cada una de las repeticiones realizadas por este método (Figura 11.B), el cual se encuentra dentro de los límites satisfactorios para una línea celular viable.

Por otra parte, en la Figura 12 se pueden apreciar las imágenes obtenidas de uno de los cultivos celulares primarios realizados por este método. En el día 2 (Figura 12.A) se observa una gran cantidad de células adheridas al frasco de cultivo, que conservan las características morfológicas descritas en la literatura para los fibroblastos, en el día 3 (Figura 12. B,C) se observa una monocapa uniforme de células que permite reconocer el momento en el que se ha llegado a la confluencia y se requiere hacer un subcultivo de las células.

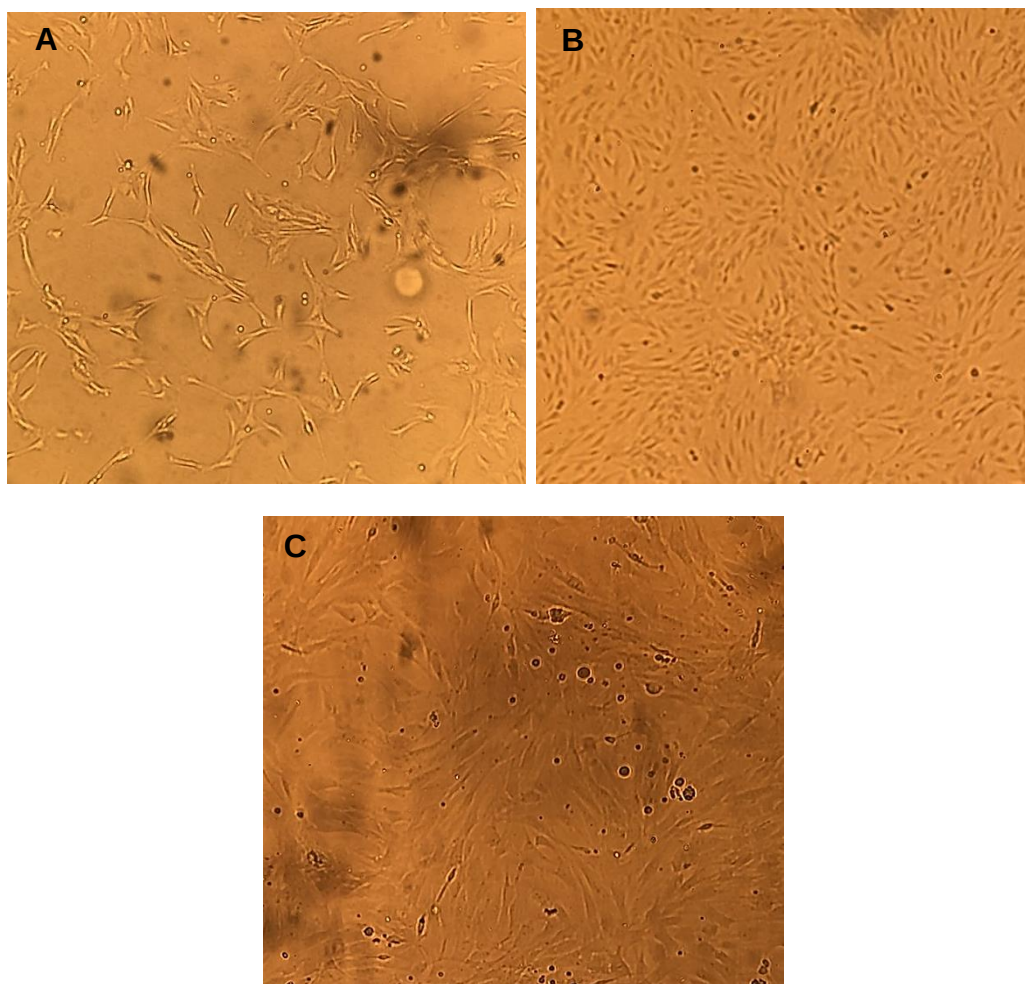


Figura 12. Imágenes de cultivo celular primario de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con colagenasa y tripsina. A) Día 2, objetivo 4X. B) Día 3. Objetivo 4X. C) Día 3, objetivo 10X.

En el caso de los subcultivos o pases realizados por este método (Figura 13), se puede evidenciar que la morfología aun corresponde con lo descrito para los fibroblastos, es decir que, en este aspecto, el uso de dos enzimas no afecta negativamente al desarrollo normal del cultivo primario ni de los subcultivos siguientes.

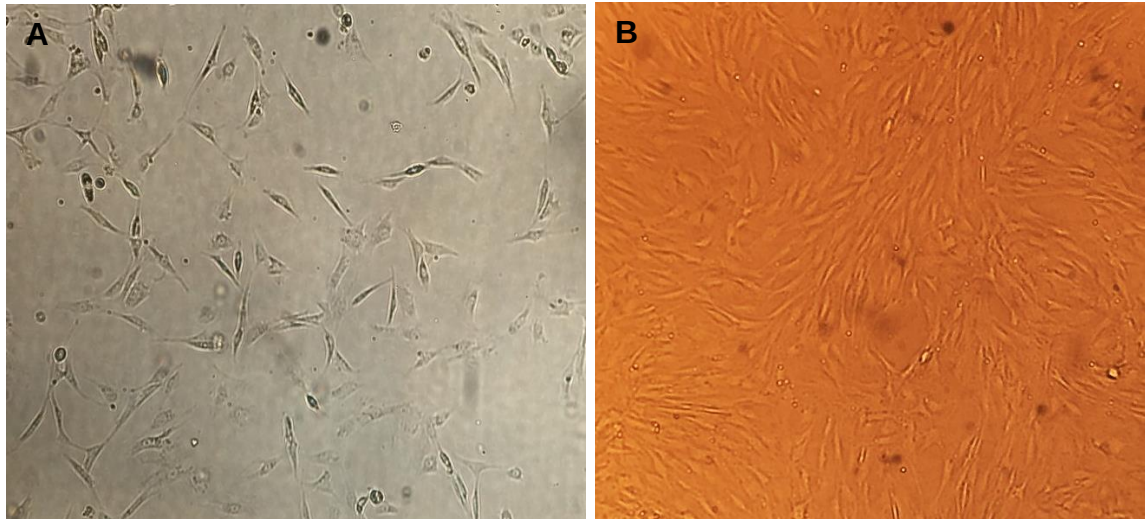


Figura 13. Imágenes de subcultivos de fibroblastos por el método de disgregación enzimática con colagenasa y tripsina. A) P1 día 1, objetivo 10X. B) P1 día 3. Objetivo 10X.

Finalmente, es importante tener en cuenta que en este caso no fue posible realizar la misma cantidad de subcultivos sucesivos que en el caso del procedimiento descrito en el numeral **2.5.1**, debido a que no se contaba con el tiempo suficiente para llevarlo a cabo, este inconveniente se debe a que los reactivos necesarios para la realización del proyecto tardaron en el proceso de importación. Sin embargo, las células obtenidas por este método se almacenaron en nitrógeno líquido tras realizar el protocolo descrito para la criopreservación de las mismas. De esta forma será posible realizar subcultivos y realizar estudios posteriores a partir de estas células.

2.5.4 Evaluación morfológica de los fibroblastos aislados

Los fibroblastos normales son células grandes con núcleo esférico u ovoide y prominentes protuberancias (lamelipodios) que corresponden a prolongaciones de la membrana celular producidas por la acción de microfilamentos de actina, y por la producción de colágeno y glicoproteínas (Seluanov et al., 2010). Los fibroblastos crecen en una monocapa y cuando se presenta gran densidad celular se puede apreciar una apariencia fusiforme en los mismos.

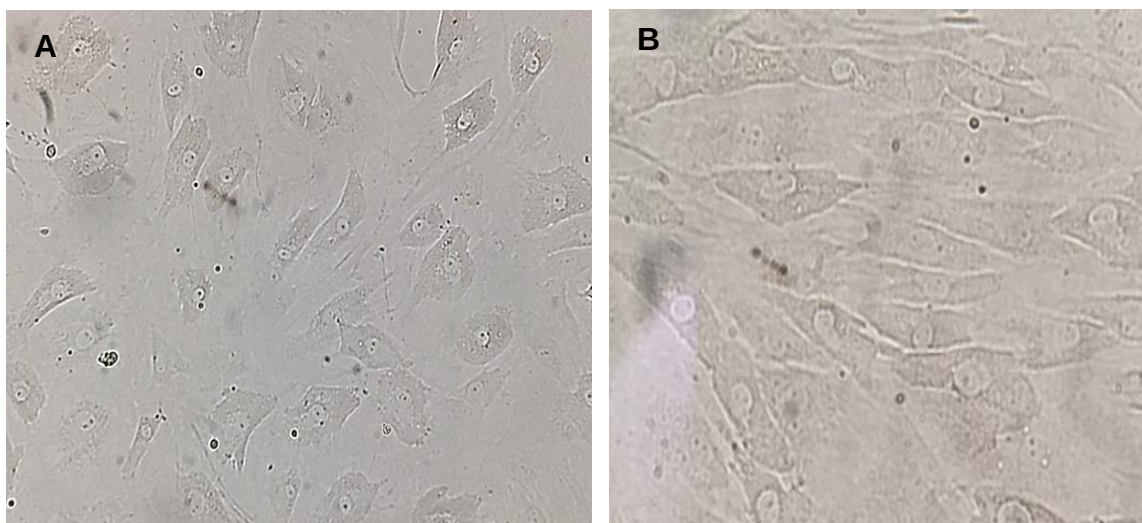


Figura 14. Imágenes de cultivo celular de fibroblastos. A) cultivo en crecimiento, objetivo 40X. **B)** cultivo en confluencia celular. Objetivo 40X.

En la Figura 14, se pueden observar las imágenes de un cultivo celular aislado de fibroblastos con vista ampliada por aumento de 40X. en la imagen A se observa un grupo de células en crecimiento, mientras que en la imagen B se aprecia la morfología de las células en estado de confluencia. Teniendo en cuenta la descripción de la morfología de los fibroblastos normales encontrada en la literatura se asemeja en gran proporción a la presentada en las figuras 6, 7, 10, 12 y 14, por lo que se puede inferir que las células obtenidas y aisladas por los diferentes métodos corresponden con fibroblastos.

Cabe destacar el hecho de que la morfología original de los fibroblastos no solo cambia según la etapa de crecimiento en que se encuentre, como se ve en las imágenes, sino que también puede variar según el tejido y la especie de la que fueron aislados (Takashima, 1998).

2.5.5 Comparación estadística de los protocolos evaluados

Se realizó la comparación estadística del número de células totales obtenidas a partir de los tres métodos descritos anteriormente. Teniendo en cuenta que los datos del segundo método son muy pocos ($n=2$), y que los 3 tratamientos tienen diferente número de repeticiones, para realizar un análisis que tenga mayor significancia y validez estadística, se realizó un ANOVA simple comparando el tratamiento 1 (Tripsina 0,25%) con los tratamientos 2 (Tripsina 24h 4°C) y 3 (Colagenasa + Tripsina).

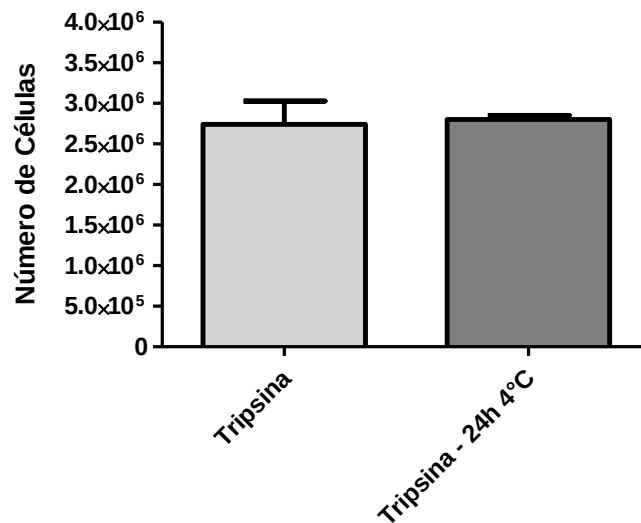


Figura 15. Comparación estadística del número de células totales obtenidas a partir del tratamiento realizado con tripsina 0,25% vs el tratamiento para queratinocitos (tripsina 24h 4°C)

El ANOVA muestra con un nivel de confianza del 95% que los tratamientos 1 y 2 no presentan diferencias significativas debido a que el valor p obtenido es de 0,9057, mayor al nivel de significancia ($p > 0,05$). Por lo tanto, teniendo en cuenta solamente el número de células totales se podría inferir que cualquiera de los tratamientos ofrecería resultados similares. Sin embargo, si se tiene en cuenta los valores obtenidos de viabilidad celular para ambos casos (Figuras 5,B y 9,B), el tratamiento en que se somete la muestra a 24h en una suspensión de tripsina no ofrece resultados óptimos para el proceso de aislamiento de fibroblastos a partir de tejido dérmico de rata neonatal, debido a su bajo porcentaje de viabilidad.

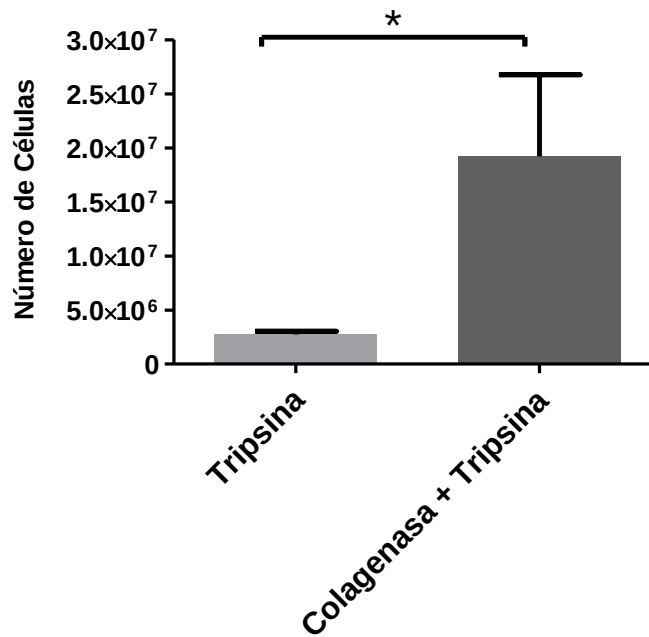


Figura 16. Comparación estadística del número de células totales obtenidas a partir del tratamiento realizado con tripsina 0,25% vs el tratamiento en combinación de colagenasa con tripsina.

El ANOVA muestra con un nivel de confianza del 95% que los tratamientos 1 y 3 presentan diferencias significativas debido a que el valor p obtenido es de 0,0419, menor al nivel de significancia ($p < 0,05$). Es decir, que aunque existe un amplio rango de variación en los resultados, se puede asegurar que el tratamiento que utiliza la combinación de las enzimas colagenasa y tripsina, permite la obtención de mayor número de células totales aisladas, comparado con el tratamiento que utiliza sólo tripsina para la disgregación enzimática, esto se puede complementar con lo mencionado en los numerales **2.5.1 y 2.5.3**, teniendo en cuenta principalmente el alto porcentaje de viabilidad celular que se presenta en ambos casos.

2.6 Conclusiones

- Se aislaron células primarias de fibroblastos a partir de piel de neonato de rata *in vitro*, siguiendo tres procedimientos diferentes. Determinando que el método que utiliza la combinación de collagenasa tipo IA y tripsina es el que ofrece mejores resultados, en cuanto a número de células aisladas del tejido y viabilidad celular.
- Se logró promover el crecimiento y desarrollo de fibroblastos primarios aislados, utilizando los medios de cultivo idóneos y manteniendo las condiciones ambientales óptimas para su normal desarrollo *in vitro*.
- Se cuantificó la tasa de crecimiento, el número total de células aisladas del tejido y la viabilidad celular de los cultivos primarios de fibroblastos.

2.8 Recomendaciones

- Realizar la caracterización de las células aisladas por inmunohistoquímica u otros métodos que confirmen que las células obtenidas correspondan con fibroblastos.
- Realizar mayor número de ensayos para el método de disgregación enzimática con la combinación de colagenasa tipo IA y tripsina, con el fin de estandarizar la cantidad de muestra de tejido dérmico necesaria para reducir el rango de variación del número de células totales aisladas.
- Realizar limpieza del cuarto de cultivo rutinariamente según lo descrito en los protocolos establecidos y trabajar en condiciones de asepsia, con el fin de evitar la contaminación de los cultivos o del material y reactivos del laboratorio.
- Para evitar la poca cantidad de células aisladas del tejido, se recomienda realizar cortes pequeños del tejido dérmico con el fin de optimizar el proceso de disgregación enzimática.
- Realizar el proceso de remoción de la piel lo más pronto posible después del sacrificio del animal, no más de dos horas desde este momento. Además, tener en cuenta de ser ágil en la etapa de aislamiento del tejido dérmico con el fin de obtener mejores resultados y evitar contaminación.
- Mantener en adecuadas condiciones de almacenamiento los reactivos según la especificación de los proveedores, especialmente las soluciones de enzimas, ya que estas son susceptibles a degradarse si no se encuentran en la temperatura adecuada. Para esto se pueden realizar alícuotas del volumen suficiente para cada ensayo con el fin de que solo se descongele la proporción que se va a utilizar.

2.9 Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the cell* (4th ed.). New York: Garland Science.
- Angulo, W. (2017). *Estandarización de un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de células primarias de queratinocitos in vitro*. Universidad Icesi, Cali-Valle.
- Carrel, A., & Burrows, M. T. (1911). Cultivation of Tissues in Vitro and Its Technique. *The Journal of Experimental Medicine*, XIII(4), 387–406.
- Cultek. (2007). Cultivos Celulares. Retrieved from www.cultek.com
- E. N, W. (2015). *Cells and Tissues in Culture*. London: Academic Press.
- Eynard, A. R., Valentich, M. A., & Rovasio, R. A. (2008). *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. (E. Panamericana, Ed.).
- Freshney, I. R. (2005). *culture of animal cells: A manual of basic techniques* (Fifth edit). Jhon Wiley & Sons Inc.
- Gil-Loyzaga, P. E. (2011). *cultivo de celulas animales y humanas: aplicaciones en medicina regenerativa*. Madrid: Editorial Vision Libros.
- Gio, B. G. (1964). Trypsinization of Animal Tissues for Cell Culture: Theoretical Considerations and Automatic Apparatus. *American Society for Microbiology*, 12(2), 115–121.
- Gomez de Ferraris, M. E. (2009). Histology, embryology and oral tissue engineering. In *Ed. Medica Panamericana* (pp. 64–65).
- Hansen, S., Girirajan, S., & Canfield, T. (2011). *Cell Culture SOP: Establishment and Propagation of Adult Mouse Fibroblasts*. Washington D.C.
- Harrison, R. G. (1902). An Experimental Study of the Relation of the Nervous System to the Developing Musculature in the embryo of the frog. *American Journal Of Anatomy*, III, 197–220.
- Jennie, M., & Roberts, P. (1998). *Introduction to Cell and Tissue Culture: Theory and echnique*. New York: Library of Congress.
- Klaus, K., & Klaus, B. (1979). The cellular Aging of Rat Fibroblasts in vitro Is a Differentiation Process. *Gerontology*, 25(9), 261–274. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- Lichti, U., Anders, J., & Yuspa, S. H. (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 © 2008 Nature Publishing Group <http://www.nature.com/natureprotocols>, 3(5), 799–810. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.50>
- Moini, J. (2015). Anatomy and Physiology for Health Professionals. In *Jones & Bartlett Publishers* (pp. 108–114).
- Schuhmachers, G., & Xu, S. (1995). Identity and functional properties of novel skin-derived fibroblast lines (NS series) that support the growth of epidermal derived dendritic cell lines. *Journal of Investigative Dermatology*, 105, 225–230.
- Seluanov, A., Vaidya, A., & Gorbunova, V. (2010). Establishing Primary Adult Fibroblast Cultures From Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, 44(2033).
- Takashima, A. (1998). Establishment of Fibroblast Cultures. *Current Protocols in Cell Biology*, 2(1), 1–12. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0201s00>
- Velez, H., Borrero, J., & Restrepo, J. (1990). *Fundamentos de Medicina: Dermatología* (cuarta). Medellin: Corporacion para Investigaciones Biologicas.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprobación comité de ética

Se solicitó al comité de ética la ampliación del alcance del proyecto del Profesor Álvaro Barrera Ocampo *“Evaluación de la Vulnerabilidad de población de neuronas hipocampales o compuestos patogénicos relacionados con la enfermedad de Alzheimer”* para el uso de los mismos animales en el presente proyecto.



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

Anexo 2. Matriz de marco lógico

Objetivo General: Estandarizar un protocolo para el aislamiento, cultivo y mantenimiento de líneas celulares primarias de fibroblastos de piel de rata neonatal <i>in vitro</i> .			
Objetivo	Actividades	Supuestos	Indicadores
Aislar células primarias de fibroblastos a partir de piel de neonato de rata <i>in vitro</i> .	- Aprobación del comité de ética. - Realizar una revisión bibliográfica de los protocolos que existen para el aislamiento y cultivo de fibroblastos primarios <i>in vitro</i>. - Obtener todos los reactivos e insumos necesarios para el aislamiento y cultivo de fibroblastos de piel de neonato de rata. - Realizar el aislamiento de fibroblastos primarios a partir de tejido epidérmico de neonato de rata. - Caracterizar morfológicamente las células de fibroblastos obtenidas en los cultivos.	- No aprobación del comité de ética. - Disponibilidad de los reactivos necesarios para el aislamiento celular. - Disponibilidad de recurso animal (neonatos de rata Wistar) para la obtención de explantes de tejido epidérmico. - Contaminación de las células aisladas de fibroblastos por factores microbiológicos.	Caracterización morfológica de las células obtenidas a partir del tejido dérmico de neonato de rata.
Promover el crecimiento y desarrollo de fibroblastos	Determinar los factores necesarios para el crecimiento de fibroblastos <i>in vitro</i>.	- No exista proliferación de fibroblastos en los cultivos celulares. - Crecimiento de líneas	Porcentaje de crecimiento de fibroblastos en los cultivos celulares.

primarios <i>in vitro</i> .	• Adicionar a los cultivos factores de crecimiento selectivos para fibroblastos. • Determinar las condiciones óptimas para el mantenimiento de los cultivos a través del tiempo.	celulares diferentes a fibroblastos. • Contaminación de los cultivos por microorganismos. • Los cultivos celulares obtenidos no se mantienen a través del tiempo.	
Cuantificar la tasa de crecimiento y viabilidad celular de los cultivos aislados de fibroblastos.	• Determinar el número de células vivas en los cultivos mediante el uso de colorantes de contraste (azul de tripán).	• Bajo porcentaje de fibroblastos vivos en los tejidos. • El método de contraste por colorante no arroja resultados concluyentes de confluencia celular.	• Porcentaje de confluencia celular. • Porcentaje de células vivas en los cultivos (no teñidas por el colorante azul de tripán).

Anexo 3. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico se realizó por medio del programa GraphPad Prism

Anova: esta prueba se lleva a cabo según se cumplan los siguientes supuestos:

Supuesto 1: homogeneidad de varianzas

H₀: Las varianzas son iguales

H_a: Las varianzas no son iguales

Supuesto 2: Los datos tienen una distribución normal

H₀: Los datos tienen una distribución normal

H_a: Los datos no tiene una distribución normal

(Se rechaza H₀ si: valor p < 0,05)

Column A vs Column C	Tripsina vs Colagenasa + Tripsina
Unpaired t test	
P value	0,0419
P value summary	*
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=2.484 df=7
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	2740000 ± 287400 N=5
Mean ± SEM of column C	19220000 ± 7542000 N=4
Difference between means	-16480000 ± 6633000
95% confidence interval	-32160000 to -7926000
R squared	0,4686
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	551.0, 3, 4
P value	< 0.0001
P value summary	***
Are variances significantly different?	Yes

Column A vs Column B	Tripsina vs Tripsina - Queratinocitos
Unpaired t test	
P value	0,9057
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
t, df	t=0.1246 df=5
How big is the difference?	
Mean $\pm$ SEM of column A	2740000 $\pm$ 287400 N=5
Mean $\pm$ SEM of column B	2800000 $\pm$ 50000 N=2
Difference between means	-60000 $\pm$ 481600
95% confidence interval	-1298000 to 1178000
R squared	0,003094
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	82.60, 4, 1
P value	0,1646
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Prueba ANOVA

Comparación estadística de los tratamientos Tripsina y Colagenasa + tripsina

Number of values	5	4
Minimum	2,250e+006	4,875e+006
25% Percentile	2,250e+006	6,056e+006
Median	2,550e+006	1,691e+007
75% Percentile	3,325e+006	3,469e+007
Maximum	3,800e+006	3,818e+007
Mean	2,740e+006	1,922e+007
Std. Deviation	642651	1,508e+007
Std. Error	287402	7,542e+006
Lower 95% CI of mean	1,942e+006	-4,785e+006
Upper 95% CI of mean	3,538e+006	4,322e+007
KS normality test		
KS distance	0,2321	N too small
P value	> 0.10	
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	
P value summary	ns	
Sum	1,370e+007	7,688e+007

Comparación estadística de los tratamientos tripsina y tripsina- 24h 4°C

Number of values	5	2
Minimum	2,250e+006	2,750e+006
25% Percentile	2,250e+006	2,750e+006
Median	2,550e+006	2,800e+006
75% Percentile	3,325e+006	2,850e+006
Maximum	3,800e+006	2,850e+006
Mean	2,740e+006	2,800e+006
Std. Deviation	642651	70711
Std. Error	287402	50000
Lower 95% CI of mean	1,942e+006	2,165e+006
Upper 95% CI of mean	3,538e+006	3,435e+006
KS normality test		
KS distance	0,2321	N too small
P value	> 0.10	
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	
P value summary	ns	
Sum	1,370e+007	5,600e+006