



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
Coordinación Académica



# MANUAL DE TÉCNICAS BÁSICAS DEL CULTIVO CELULAR

ELIZABETH MERENTES



CARACAS, 2016



# Manual De Técnicas Básicas Del Cultivo Celular

Elizabeth Merentes



Caracas, 2016



**Sello Editorial Ediciencias-UCV**  
**Universidad Central de Venezuela**  
**Facultad de Ciencias**  
**Coordinación Académica**

**Editor Jefe:**

Héctor Finol

**Editores del Área:**

Blas Dorta; Guillermina Alonso

**Coordinación Editorial:**

Carmen Marrero

**Editado por:**

Fundación Amigos de la Facultad de Ciencias

Fondo Editorial de la Facultad de Ciencias

**Diseño, ilustración, edición electrónica y diagramación:**

Carlos Raúl Pérez

© 2016, Elizabeth Merentes

**Manual de técnicas Básicas del Cultivo Celular**

**Depósito Legal: DC2017000405**

**ISBN: 978-980-00-2848-3**

## CONTENIDO

### CAPITULO 1

#### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

1.1 Introducción.....	1
1.2 Procedimiento.....	3
a) Preparación PBS.....	3
b) Preparación DMEM.....	4
c) Medios condicionados.....	6
1.3 Pruebas de esterilidad.....	7
a) Caldo nutritivo de infusión de corazón (DIFCO).....	7
b) Tioglicolato de sodio.....	8
1.4 Otras soluciones.....	9
1.5 Bibliografía del capítulo.....	11

### CAPITULO 2

#### ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS POR EXPLANTES Y DISGREGACIÓN ENZIMÁTICA A PARTIR DE FETOS DE RATÓN.SUBCULTIVOS DE LINEAS CELULARES

2.1 Introducción.....	11
2.2 Materiales.....	13
2.3 Soluciones y medio de cultivo .....	14
2.4 Procedimiento.....	14
a) Disección del ratón y aislamiento de los fetos de los cuernos del útero .....	14
b) Obtención y establecimiento de cultivos primarios a partir de ex plantes.....	16
c) Obtencion y establecimientos de cultivos primarios a partir de disgregación enzimática.....	17

---

2.5 Subcultivos de líneas celulares.....	19
2.5.1 Materiales.....	19
2.5.2 Soluciones y medios de cultivo.....	20
2.5.3 Procedimiento.....	20
2.6 Bibliografía del capítulo.....	21

## **C A P I T U L O 3**

### **DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR**

3.1 Introducción.....	22
3.2 Materiales.....	23
3.3 Soluciones y medios de cultivo.....	23
3.4 Métodos para determinar la proliferación celular.....	24
3.4.1 Determinación de la curva de crecimiento por contaje celular con hemocitómetro.....	24
3.4.2 Método MTT.....	25
3.4.3 Población celular acumulativa.....	27
3.5 Bibliografía de capítulo.....	29

## **C A P I T U L O 4**

### **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E INMUNOHISTO- QUÍMICA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO**

4.1 Introducción.....	31
4.2 Materiales.....	32
4.3 Soluciones y medios de cultivos.....	32
4.4 Coloración histológica de rutina MAY-GRÜNWARD-GIEMSA.....	33
4.5 Coloración Sudan III.....	34
4.6 Rojo de alizarina.....	34

---

4.7 Caracterización inmunohistoquímica.....	35
4.8 Bibliografía del capítulo.....	39

## **C A P I T U L O 5**

### **MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN CELULAR Y DES- CONGELACIÓN**

5.1 Introducción.....	40
5.2 Congelación Tradicional.....	41
5.2.1 Procedimiento.....	41
5.3 Vitricación de Células.....	42
5.3.1 Procedimiento.....	42
5.4 Vitricación de Tejidos.....	43
5.5 Bibliografía del capítulo.....	43

## **C A P I T U L O 6**

### **UTILIZACIÓN DE BIOMATRICES NATURALES PARA CULTIVAR CÉLULAS MESENQUIMALES**

6.1 Introducción.....	44
6.2 Obtención de Colágeno Tipo 1 a partir de la cola de rata.....	46
6.2.1 Procedimiento.....	46
6.3 Células embebidas en Colágeno Tipo 1.....	47
6.3.1 Procedimiento.....	47
6.4 Bibliografía del capítulo.....	48

## **C A P I T U L O 7**

### **CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES DEL TE- JIDO ADIPOSEO HUMANO**

7.1 Introducción.....	50
7.2 Materiales.....	52

---

7.3 Procedimiento.....	53
7.4 Bibliografía del capítulo.....	54

## **C A P I T U L O 8**

### **CULTIVO DE CÉLULAS DE CARTÍLAGO NASAL HUMANO**

8.1 Introducción.....	56
8.2 Materiales.....	57
8.3 Procedimiento.....	57
8.4 Bibliografía del capítulo.....	60

## **C A P I T U L O 9**

### **CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA PIEL**

9.1 Introducción.....	61
9.2 Materiales.....	63
9.3 Procedimiento.....	64
9.3.1 Obtención de las células epidérmicas.....	64
9.3.2 Cultivo de células dérmicas humanas.....	67
9.4 Queratinocitos subcultivados sobre equivalentes dérmicos.....	67
9.5 Bibliografía del capítulo.....	69

## **C A P I T U L O 10**

### **ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES**

10.1 Introducción.....	70
10.2 Materiales.....	72
10.3 Procedimientos.....	73
10.3.1 Obtención de los blastocitos.....	73
10.3.2 Preparación de monocapas de fibroblastos.....	74



---

10.3.3 Cultivo de blastocitos y aislamiento de las líneas celulares	
Embrionarias.....	74
10.4 Bibliografía del capítulo.....	77

## **C A P I T U L O   1 1**

### **ESTABLECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE MESEN- QUIMALES PROVENIENTES DEL CORDÓN UMBILICAL HUMANO**

11.1 Introducción.....	78
11.2 Materiales.....	80
11.3 Procedimientos.....	81
11.3.1 Obtención y establecimiento del cultivo primario a partir de las células mesenquimales del cordón umbilical humano.....	81
11.3.2 Subcultivos.....	82
11.4 bibliografía del capítulo.....	84



## **PREFACIO**

*Las técnicas de cultivo celular son una herramienta esencial en la investigación básica y aplicada. Con la implementación de esta tecnología se han logrado grandes avances, creando modelos in vitro que han permitido generar un mayor conocimiento en áreas básicas, tales como la biología del desarrollo. Por ejemplo, se tiene una mayor comprensión de los mecanismos de diferenciación de las células madre adultas y su aplicabilidad en la ingeniería de tejidos. Este es un campo emergente que tiene un enorme potencial médico y se presenta como un método alternativo para la sustitución de tejidos dañados en el humano, ya que se pueden reconstruir tejidos y órganos in vitro a partir de células obtenidas del mismo paciente.*

*En este manual presentamos los trabajos de laboratorio que se han llevado a cabo a través de los diferentes cursos de la materia electiva “Cultivo de Tejidos Animales” del Departamento de Zoología de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Igualmente, describiremos las metodologías que se han estandarizado y desarrollado para obtener cultivos primarios y subcultivos de células de tejidos adultos y embrionarios, realizados en el La-*

*laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental de la UCV.*

*La Profesora Mercedes Urbaneja fue la fundadora de este laboratorio y en el año de 1975, junto con las Profesoras Mireya Gugig y Rosaura Bello, publicaron un folleto denominado “Cultivo de Tejidos Animales. Trabajos de Laboratorio”, el cual permitió tener una guía que contemplaba los aspectos básicos y generales de este tipo de técnicas y que hasta ahora ha sido de gran utilidad para estudiantes y profesionales que desean introducirse en este campo.*

*Sin embargo, es fundamental la actualización y adecuación de un manual de cultivo celular, que comprenda, además de las técnicas básicas, las nuevas metodologías de biotecnología del cultivo, que tienen una gran relevancia en la bioingeniería de tejidos y su aplicación terapéutica. He allí el aporte que ofrece la presente obra.*

## CAPÍTULO I

## PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

**1.1 Introducción**

Las soluciones y medios que se utilizan en cultivo de células y tejidos son diversas y deben ser seleccionadas dependiendo del tejido u órgano que se requiere cultivar.

Las soluciones salinas balanceadas están constituidas por los iones necesarios para el buen funcionamiento de las células *in vitro*. Hay una diversidad de soluciones (ver Tabla I) y las más usadas son la solución tampón fosfato (PBS) de Dulbecco para la disección de tejidos y/o lavado de células. Otra es la solución de Hank's que contiene como fuente de energía, la glucosa, ampliamente recomendada para el aislamiento de ciertos tejidos, tales como el muscular.

En relación con los medios nutritivos, éstos deben ser isotónicos, con capacidad amortiguadora de pH y ser específicos para el tipo de cultivo que se quiere realizar. Ellos contienen todos los elementos para el mantenimiento y crecimiento de las células *in vitro*.

Inicialmente en cultivo de tejidos se utilizaron medios naturales, tales como coagulo de plasma, sueros sanguíneos y extractos de embriones. Posteriormente se produjeron los medios sintéticos definidos donde se conoce cuál es la composición de los elementos que lo conforman. Éstos contienen una serie de aminoá-

cidos que van a variar dependiendo del tipo de medio (DMEM, F12, RPMI, 199), además tienen un conjunto de sales, las cuales mantienen un balance osmótico, proporcionando los elementos necesarios para la adhesión celular.

Asimismo, pueden actuar como cofactores en muchas reacciones enzimáticas. Otros constituyentes son las vitaminas principalmente del complejo B y una fuente de energía, la glucosa.

El medio es suplementado con suero de origen animal de diversos tipos: bovino, equino, humano, los cuales se utilizan a diferentes concentraciones. Ésta es una mezcla muy compleja indefinida y que varía dependiendo de los lotes y de la casa comercial. Suministra factores de crecimiento, hormonas, que estimulan la proliferación celular, así como también factores de adhesión y de matriz tales como la fibronectina. Además contiene inhibidores de proteasas ( $\alpha_2$ macroglobulina) que se usan para inactivar la tripsina que es una enzima ampliamente usada para la disgregación de los tejidos y para subcultivar, así de esta manera se evita que se dañen las células una vez que están dissociadas.

También se pueden utilizar medios condicionados, donde se han cultivado las células en un tiempo dado y donde se encuentra una serie de factores de crecimiento que pueden estimular la proliferación, diferenciación y mantener la morfología sin rasgos aparentes de senescencia de otros tipos de células a cultivar (Rodríguez, 2010).

**Tabla 1. Soluciones Salinas Balanceadas**

Composición de las soluciones salinas balanceadas (g/L)							
	Ringer	Tyrode	Gey	Earle	Puck	Hanks	Dulbecco (PBS)
NaCl	9,00	8,00	7,00	6,80	8,00	8,00	8,00
KCl	0,42	0,20	0,37	0,40	0,40	0,40	0,20
CaCl <sub>2</sub>	0,25	0,20	0,17	0,20	0,012	0,14	0,40
MgCl <sub>2</sub> •6H <sub>2</sub> O		0,10	0,21			0,10	0,10
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O			0,07	0,10	0,154	0,10	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •12H <sub>2</sub> O			3,00		0,39	0,12	2,9
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> •H <sub>2</sub> O		0,05		0,125			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>			0,03		0,15	0,06	0,20
NaHCO <sub>3</sub>		1,00	2,27	2,20		0,35	
Glucosa		1,00	1,00	1,00	1,10	1,00	
Rojo fenol				0,05	0,005	0,02	
Atmósfera	aire	aire	95% aire/ 5% CO <sub>2</sub>	95% aire/ 5% CO <sub>2</sub>	aire	aire	aire
Esterilización	autoclave	filtración	filtración	filtración	filtración	filtración	autoclave

## 1.2 Procedimiento

### a) Preparación de la solución PBS libre de calcio y magnesio

1. Pesar las sales en una balanza analítica y se añaden a una fiola.
2. Añadir el 80% del volumen final de agua destilada en relación con el volumen final a preparar. Es importante usar agua destilada de alta calidad, bidestilada y deionizada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>).
3. Disolver las sales con magneto usando el agitador magnético.
4. Ajustar el pH a 7.4 con 1 M HCl o 1 M NaOH (según sea necesario).
5. Aforar la solución con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> al volumen final requerido.
6. Esterilizar en autoclave.

**b) Preparación del medio de cultivo DMEM base** (ver composición en la Tabla 2)

1. Pesar 3,7 g de bicarbonato de sodio y añadirlo en una fiola que contiene un volumen de 100 mL de agua bidestilada desionizada y disolver con un magneto usando el agitador magnético.
2. El medio en polvo se disuelve en 500 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>.
3. Añadir los 100 mL de la solución de bicarbonato de sodio.
4. Ajustar con 400 mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> hasta completar el volumen final de 1 litro.
5. Esterilizar por filtración en un filtro Millipore estéril que contiene una membrana de 0,20 μm (Figura 1).
6. El medio estéril se coloca en frascos de 500 mL y se realizan pruebas de esterilidad (ver más adelante).
7. Suplementar el medio con Suero Fetal de Bovino. Generalmente se usa a la proporción de 10%, añadiendo los antibióticos-antimicóticos al 1% (100.000 unidades de penicilina, 100.000 μg estreptomycin y 2000 μg anfotericina B) para prevenir la contaminación (Tabla 3) y la glutamina a 2 mM (ésta es inestable en el medio y debe ser añadida al medio base)

**Figura 1. Equipo de Filtración**



Filtro Millipore (1Litro)

Bomba de vacío



**Tabla 2. Medio de cultivo Eagle Modificado por Dulbecco's (DMEM) (Referencia del catálogo GIBCO).**

<b>Catálogo 2004</b>		
<b>Código</b>	<b>31053</b>	<b>31600</b>
<b>Componentes</b>	<b>1X líquido mg/mL</b>	<b>Polvo mg/mL</b>
<b>SALES INORGÁNICAS</b>		
CaCl <sub>2</sub> (anhidro)	200	200
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O	0,1	0,1
KCl	400	400
MgSO <sub>4</sub> (anhidro)	97,67	97,67
NaCl	6,400	6,400
NaHCO <sub>3</sub>	3,700	-
NaH <sub>2</sub> P04·H <sub>2</sub> O	125	125
<b>OTROS COMPONENTES</b>		
D-Glucosa	4,500	1000
Rojo fenol	-	15
Piruvato de sodio	-	110
<b>AMINOÁCIDOS</b>		
L-Arginina · HCl	84	84
L-Cistina · 2HCl	63	63
L-Glutamina		584
Glicina	30	30
L-Histidina ·HCl ·H <sub>2</sub> O	42	42
L-Isoleucina	105	105
L-Leucina	105	105
L-Lisina	146	146
L-Metionina	30	30
LFenilalanina	66	66
L-Serina	42	42
L-Treonina	95	95
L-Triptofano	16	16
L-Tirosina ·2Na ·H <sub>2</sub> O	104	104
L-Valina	94	94
<b>VITAMINAS</b>		
D·Ca pantotenato	4	4
Cloruro Colina	4	4
Ácido Fólico	4	4
Inositol	4	4
Niacinamida	7.2	7.2
Riboflavina	0.4	0.4
Tiamina · HCl	4	4
Piridoxina · HCl	4	4

**Tabla 3. Antibióticos y antimicóticos utilizados en cultivo**

	Concentración final	Espectro
Sulfato de Estreptomicina	50-100 µg/ml	Bacterias Gram Positivas y negativas
Penicilina G	50-100U/ml	Bacterias Gram negativas
Neostatina	100 U/ml	Hongos y levaduras
Sulfato de Neomicina	50 µg/ml	Bacterias Gram Positivas y negativas
Sulfato de Kanamicina	100 µg/ml	Bacterias Gram Positivas y negativas, Micoplasmas
Sulfato de Gentamicina	5-50 µg/ml	Bacterias Gram Positivas y negativas, Micoplasmas
Anfotericina B	0,5 – 3 µg/ml	Hongos y levaduras

### c) Medios condicionados

1. Obtener el medio del cultivo donde están creciendo las células. Debe estar confluyente o semiconfluyente y colocarlo en un tubo de centrífuga.
2. Centrifugar a 618 g por 5 minutos y extraer el sobrenadante.
3. Filtrar a través de una membrana de 0,20 µm estéril.
4. El medio condicionado obtenido debe ser guardado en un congelador a -20 °C.

### 1.3 Pruebas de esterilidad

Después de haber esterilizado una solución o medio de cultivo, deberán ser sometidos a pruebas de esterilidad para comprobar que los procedimientos han sido efectuados correctamente. Para hacer dichas pruebas se usan sustancias utilizadas generalmente en microbiología, como son: Caldo nutritivo de infusión de corazón, tioglicolato y otras, que comprueban la presencia de bacterias, hongos y levaduras (Urbaneja y col., 1975). Se preparan las muestras agregando 100  $\mu\text{L}$  de la solución a controlar al medio de cultivo estéril que se han preparado previamente en tubos de ensayo. Posteriormente se incuban a 37 °C y se dejan por 5 o 7 días. Si el resultado es negativo, esto nos indica que la solución está estéril y, por consiguiente, se puede utilizar; pero si es positivo, es conveniente desechar la solución o medio.

#### **a) Caldo nutritivo de infusión de corazón (DIFCO)**

Es un medio líquido adecuado para el enriquecimiento y cultivo de bacterias aerobias y anaerobias, muy rico en nutrientes, que proporciona un adecuado desarrollo microbiano.

La mezcla contiene los siguientes componentes (g/L):

- ◆ Infusión de corazón de vacuno 500 g
- ◆ Bacto-Triptosa 10 g
- ◆ Cloruro de sodio 5 g.

Esta prueba de esterilidad se prepara diluyendo 25 g/L de la mezcla en agua bidestilada desionizada, seguidamente se colo-

ca 1 mL por tubo de ensayo y se esteriliza en autoclave a 121 °C por 15 minutos, luego se guarda a 4 °C.

La siembra se realiza agregando a los tubos que contienen el caldo nutritivo aproximadamente 1 mL de la solución a controlar e incubándola a 37 °C. Posteriormente, los tubos son examinados para evaluar el crecimiento de microorganismos por turbidez (bacterias y levaduras) o por la presencia de hifas (hongos).

### **b) Tioglicolato de sodio**

Es un medio que se utiliza en el cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios, y también en las pruebas de esterilidad de muestras biológicas y farmacéuticas. Este medio de cultivo permite el desarrollo de una amplia variedad de microorganismos, incluidos los nutricionalmente exigentes y se observa que las bacterias estrictamente aerobias crecen en la parte superior, mientras que las anaerobias facultativas o anaerobias estrictas crecen en la región inferior del medio.

La mezcla contiene los siguientes componentes (en gramos por litro):

- ◆ Tioglicolato de sodio 0,5 g
- ◆ Extracto de levadura 5 g
- ◆ Caseína 15 g
- ◆ Cloruro de sodio 2,5 g
- ◆ L-Cisteína 0,5 g
- ◆ Glucosa 5,5 g

- ◆ Resarzurina 0,001 g
- ◆ Agar 0,75 g.

Esta prueba se prepara mezclando 29,8 g/L del medio de cultivo deshidratado en agua destilada y calentando hasta ebullición. Posteriormente, se distribuye en tubos de ensayo y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos para luego conservarlos en la nevera a 4 °C protegidos de la luz. Si el medio presenta una coloración rosa nos indica que está oxidado y que se deben restablecer las condiciones anaerobias colocando los tubos en el baño de María.

La siembra se realiza agregando a los tubos aproximadamente 1 mL de la solución a controlar e incubándola a 37 °C.

Finalmente, los tubos son examinados para evaluar el crecimiento de microorganismos por turbidez.

## **1.4 Otras soluciones**

### **L-Glutamina 200 mM (100X)**

Preparar una solución de concentración final 29,2 mg/ml en solución de PBS. Disolver y filtrar a través de una membrana de 0,20 µm. Mantener el stock concentrado y congelado a -20 °C.

**Antibióticos y antimicóticos**

Concentraciones finales utilizadas en el medio nutritivo:

Penicilina G 100 unidades/mL

Estreptomicina 100 µg/mL

Anfotericina 2 µg/mL.

Preparar la solución de antibióticos-antimicóticos a 100X y almacenar a -20 °C.

**Rojo Fenol 0,5%**

Disolver 0,5 gr en 100 mL en solución PBS, filtrar y guardar a 4 °C.

**Azul Tripano**

Solución A: 0,2 % azul tripano (0,2 g/100 mL H<sub>2</sub>O)

Solución B: PBS

Solución de uso: 4A:1B.

**Stock de mercaptoetanol 10<sup>-4</sup> mM 100X (D: 1.12 g/mL)**

Preparar 100 mL del stock para lo cual se diluye 70 µL de 2-mercaptoetanol en 100 mL de solución de PBS en una campana de extracción, almacenar a 4 °C.

**Mitomicina C**

Preparar una solución stock 50X: Agregar 1 mg mitomicina en 10 mL de solución salina balanceada (PBS) y

almacenar a 4 °C en un frasco ámbar.

La concentración recomendada para su uso en las células es de 2 µg/mL. La solución una vez diluida puede ser usada por una semana. Para periodos más largos se debe almacenar a -20 °C.

### **1.5 Bibliografía del capítulo**

- Freshney I. (2000). Culture of animal cells. A manual of basic technique. Editorial Wiley-Liss, Cuarta Edición, Toronto, Canadá.
- Rodríguez, M. (2010). Estudio comparativo del potencial de diferenciación hacia el linaje epitelial de las células mesenquimales provenientes del tejido adiposo de ratón y humano. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela.
- Urbaneja, M., De Gugig, M., Bello, R. (1975). Cultivo de Tejidos Animales. Caracas, Venezuela.

## CAPÍTULO 2

### ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS POR EXPLANTES Y DISGREGACIÓN ENZIMÁTICA A PARTIR DE FETOS DE RATÓN. SUBCULTIVOS DE LINEAS CELULARES

#### 2.1 Introducción

El cultivo primario es el cultivo obtenido directamente a partir de tejidos u órganos. Éstos conservan las características fisiológicas y fenotípicas similares al tejido de origen y mantienen su cariotipo diploide. Además están formados por una población celular heterogénea de la cual posterior y progresivamente irán sobreviviendo las células más competentes dando origen a una población más homogénea. La proliferación es baja hasta que las células se adapten al microambiente donde han sido sembradas o cultivadas. Ellas deben restablecer los componentes de superficie y de matriz, así como el citoesqueleto dañado durante el proceso de disgregación.

Las células provenientes de cultivos primarios son las que presentan un mejor patrón de crecimiento en ambientes funcionales *in vitro*, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal original. No presentan transformación, evitando así problemas de inestabilidad genética producto de aberraciones cromosómicas, mutaciones espontáneas y/o células mutantes no eliminadas.



Se utilizan dos estrategias para establecer el cultivo primario por explantes procedentes de una disgregación mecánica, o de una suspensión celular derivada de una disociación con enzimas o agentes químicos (Freshney, 2010). Las enzimas se usan para digerir las sustancias intracelulares a nivel de proteínas y específicamente a nivel de los enlaces peptídicos adyacentes a la unidad de arginina y lisina, degradando las proteínas y componentes que sirven de unión entre las células y el tejido, liberándolas en suspensión (Urbaneja y col., 1975).

Una de las más usadas es la tripsina, que degrada las proteínas de superficie que une a las células entre sí, mientras que el EDTA es una solución de sales sódicas del ácido etilendiaminotetracético que además de ser un agente quelante de iones divalentes como el calcio y el magnesio, necesarios para la adhesión célula-célula, célula-sustrato, actúa como inhibidor de metaloproteasas implicadas en la hidrólisis o descomposición específica de proteínas, proceso necesario para que, entre otras cosas, ocurra la activación o desactivación de esas proteínas. Ambas soluciones trabajan rápidamente para remover las células ancladas y producir una suspensión celular. La tripsina es inactivada rápidamente por los inhibidores que se encuentran en el suero fetal de bovino (Herrero, 2004).

## 2.2 Materiales

- ◆ Material biológico: Ratones hembras con 15-16 días de gestación de la cepa NMRI
- ◆ Pinzas de puntas finas rectas y curvas

- ◆ Tijeras de punta fina rectas y curvas
- ◆ Placas de Petri de 60 mm de diámetro
- ◆ Placas plásticas de 35 mm de diámetro
- ◆ Frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup>
- ◆ Pipetas de 5 y 10 mL
- ◆ Frasco de vidrio
- ◆ Magnetos
- ◆ Tubos de centrífuga de 15 mL
- ◆ Hemocitómetro.

### **2.3 Soluciones y medio de cultivo**

Etanol al 70%

Solución Buffer Fosfato libre de calcio y magnesio

Medio de cultivo Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM) (Gibco) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco) y mezcla de antibióticos-antimicóticos.

Solución de Tripsina- EDTA (0,125%, 0,02%).

### **2.4 Procedimiento**

#### **a) Disección del ratón y aislamiento de los fetos de los cuernos del útero**

1. Sacrificar al ratón por dislocación cervical colocando al animal sobre una superficie donde se sostenga y con una mano tomarlo por la base de la cola, mientras que con la otra se sostiene

por la base del cráneo. Tirar de la base de la cola en sentido opuesto a la del cuerpo del animal, ocasionando la separación de la columna vertebral del cráneo.

2. Realizar una incisión media ventral seguida de un corte transversal en la piel de la línea media del abdomen, previamente impregnada con etanol al 70%. Separar la musculatura adyacente, exponiendo las vísceras las cuales se apartan teniendo cuidado de no perforar los intestinos.

En esta fase, se logran observar los fetos en los cuernos del útero, los cuales se transfieren a una placa de Petri con solución PBS, para luego realizar la disección de los fetos.

3. Los fetos se extraen de los cuernos del útero y se dejan expuestos envueltos únicamente en su membrana extraembrionaria, el amnios, el cual se encuentra unido a su vez, a la placenta (Figura 1A y 1B). Posteriormente, se le extraen las vísceras y se corta la cabeza para usar solamente la carcasa

4. Transferir la carcasa a otra placa de Petri con PBS para retirar los restos de sangre, las cuales se someterán a disociación mecánica usando tijeras finas hasta obtener secciones pequeñas de aproximadamente 2 mm.

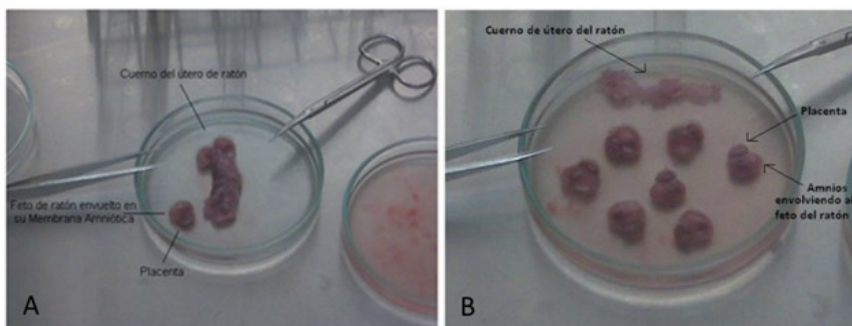


Figura 1. A. Cuerno del útero de ratón en una placa de Petri con solución PBS. B.

Fetos fuera del cuerno del útero rodeados con la membrana amniótica y placenta

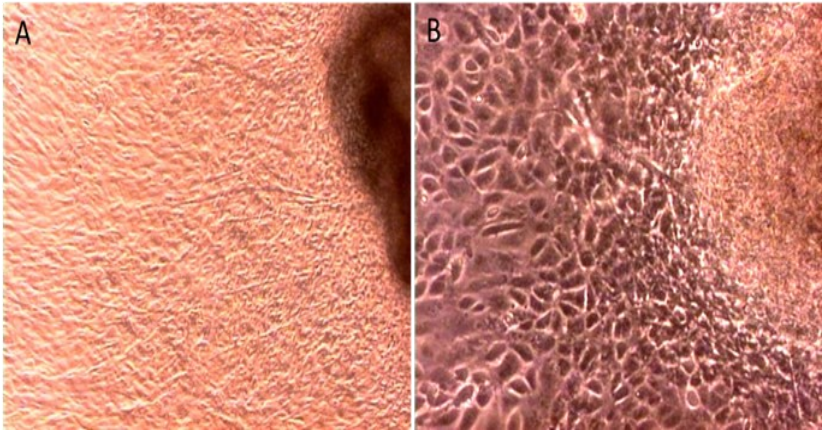
(Tomado de Meyer, 2012).

## **b) Obtención y establecimiento de cultivos primarios a partir de explantes**

1. Los trozos de tejidos obtenidos a partir de los fetos se colocan en una placa Petri equidistantemente y luego de su adhesión a la placa (5-10 minutos), se agrega medio nutritivo y se incuban a 37 °C con atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridas 24 horas se sustituye el medio para eliminar restos celulares. Posteriormente, se realizan cambios de medios periódicos hasta que se observa la migración celular desde los explantes (Romero y col., 2005).

2. Cuando se vea el halo de crecimiento alrededor de los explantes cuatro o cinco veces mayor que el tamaño de los trozos originales, se realiza el subcultivo (Figura 2). Para esto, se separa el explante de su capa de crecimiento, realizando cortes perpendiculares por los bordes originales del explante. Luego se realiza la tripsinización de la zona de crecimiento, utilizando una mezcla de Tripsina 0,125% - EDTA 0,02%.

Figura 2. A. Se puede observar el halo de crecimiento a partir del explante. 100X B. Detalle de células similares a epiteliales que han migrado a partir del trozo. 200X. Microscopio de contraste de fase.



### **c) Obtención y establecimiento de cultivos primarios a partir de disgregación enzimática**

1. Colocar las secciones de tejido obtenida, con una mezcla en proporción 1:1 de la enzima Tripsina–EDTA en un frasco que contiene un magneto. El volumen de la suspensión debe ser aproximadamente 20 veces el volumen del material a tripsinizar. Posteriormente, se somete a agitación magnética durante 15-20 minutos a 37 °C.

2. Dejar sedimentar los trozos que no han sido digeridos y la suspensión que contiene las células se recoge en tubos de centrifuga y se inactiva la acción de la tripsina agregando medio que contiene suero fetal bovino.

3. Centrifugar por 10 minutos a 681,8 g. Descartar el sobrenadante y resuspender el taco celular obtenido, en medio nutritivo y realizar el conteo celular con un hemocitómetro o Cámara de Neubauer. Para determinar la viabilidad de las células con el colorante de exclusión azul tripano procedemos de la siguiente manera: Tomar 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular agregando 20  $\mu\text{L}$  de azul tripano, homogeneizando la mezcla y colocando una gota, que penetra por capilaridad, en cada uno de los lados del portaobjetos de la Cámara de Neubauer (Figura 3).

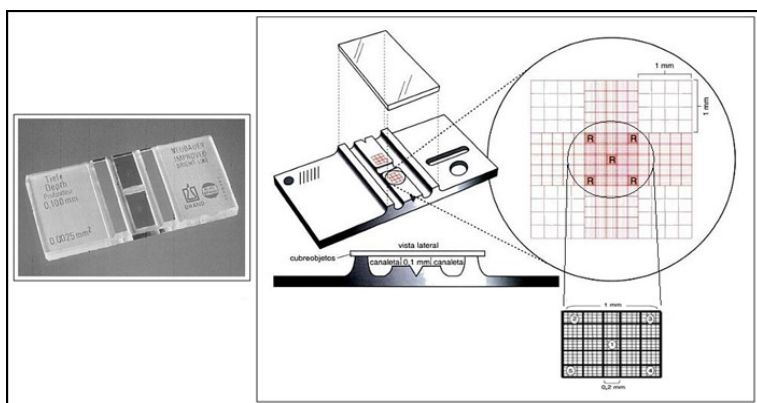


Figura 3. Imagen descriptiva de la Cámara de Neubauer. Extraído de Rodak, 2005 y modificado por Meyer, 2012.

Observar al microscopio óptico y contar aquellas células que no estén coloreadas de azul. El azul tripano es un colorante azoico que se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad que permiten diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas con la membrana celular intacta no son co-

loreadas, por lo que permanecen refringentes; sin embargo, atraviesa la membrana de las células muertas mostrando un distintivo color azul bajo el microscopio (Herrero, 2004). Contar el número de células en los cuatro cuadrantes del hemocitómetro (Figura 3). Sacar el promedio y calcular el número de células/ml de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Factor de Dilución}}{\# \text{ Células Contadas}} \times (2) \times (10^4) = \text{Células/mL}$$

4

Factor de la Cámara

5. El medio se reemplaza de manera aséptica en la campana de flujo laminar vertical, 2 o 3 veces por semana para eliminar los restos de células y detritos, hasta que se alcanza la semiconfluencia. Una vez que las células se multiplican cubriendo 80-90% del espacio disponible del recipiente de cultivo, se realizan los subcultivos con el fin de amplificar la población celular.

## 2.5 Subcultivos de líneas celulares

### 2.5.1 Materiales

- ◆ Frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup>
- ◆ Pipetas de 5 y 10 mL
- ◆ Tubos de centrifuga de 15 mL
- ◆ Hemocitómetro.

## **2.5.2 Soluciones y medios de cultivo**

Solución Buffer Fosfato libre de calcio y magnesio.

Medio de cultivo Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM) (Gibco) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco) y mezcla de antibióticos-antimicóticos.

Solución de Tripsina-EDTA (0,125%, 0,02%).

## **2.5.3 Procedimiento**

1. Para realizar el subcultivo los cultivos celulares deben tener una confluencia de alrededor del 80% del área donde están creciendo las células. Se debe chequear en el microscopio invertido para asegurarse que no exista contaminación de bacterias, levaduras u hongos.
2. Bajo la campana de flujo laminar se descarta el medio nutritivo de los frascos y se realizan 2 lavados con solución de PBS para eliminar restos celulares.
3. Añadir la solución de Tripsina-EDTA de modo que cubra la superficie del frasco e incubar por 5 minutos en una incubadora a 37 °C en una atmosfera húmeda al 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo chequear en el microscopio si las células se disociaron de la superficie, que en este caso se observan de morfología redondeada.
4. Inactivar la acción de la enzima añadiendo medio nutritivo que contiene suero, el cual incluye inhibidores de proteasas.
5. Centrifugar por 5 minutos a 618 g, descartar el sobrenadante y resuspender las células con el medio nutritivo. Contar y sembrar



bajo las mismas condiciones como se indicó anteriormente.

## 2.6 Bibliografía del capítulo

- Freshney, I. (2010). Culture of animal cells. A manual of basic technique. Editorial Wiley-Liss. 6th Edition, Toronto, Canadá.
- Herrero, L. (2004). Procedimientos en Virología Médica. Editorial de la Universidad de Costa Rica, Primera Edición. San José de Costa Rica, Costa Rica.
- Meyer, M. (2012). Establecimiento del cultivo de células madre mesenquimales de la membrana amniótica. Caracterización y diferenciación *in vitro*. Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- Rodak, B. (2005). Hematología: Fundamentos y Aplicaciones Clínicas. Editorial Panamericana, Segunda Edición. Buenos Aires, Argentina.
- Romero, L., Rodríguez, M., Guillen, A. y Merentes, E. (2005). Establishment of rat adipose tissue stromal cells and differentiation *in vitro*. Histology and Histopathology Cellular Mol. Biol. Supplement 1:S93.
- Urbaneja, M., De Gugig, M., Bello, R. (1975). Trabajo de Laboratorio Cultivo de Tejidos Animales. Venezuela. Caracas.
- Vunjak-Novakovic, G. y Freshney, R. I. (2006). Culture Cells for Tissue Engineering. Editorial John Wiley & Sons, Inc.

## CAPÍTULO 3

# DETERMINACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

### 3.1 Introducción

El crecimiento implica el incremento de todos los elementos de la célula, lo que se traduce en un aumento en la masa celular y, posteriormente, su multiplicación. Para poder predecir la proliferación del cultivo es importante conocer la cinética de crecimiento de éste, lo que nos permite estudiar las respuestas de la célula ante un estímulo particular. La curva de crecimiento permite corroborar el óptimo crecimiento y mantenimiento de las células en cultivo a través del tiempo. El patrón de proliferación característico de las células en cultivo, cuando son sembradas a baja densidad, consta de tres fases: una fase de latencia (Lag), seguida de una fase exponencial (Log) y, finalmente, una fase estacionaria (Plateau) (Colter y col., 2000).

La fase exponencial permite conocer la capacidad proliferativa que se desarrolla en el cultivo, cuando se representa la proliferación en papel semilogaritmo. Esta fase log se ajusta a una recta, cuya pendiente indica el grado de proliferación de las células que se han adaptado. Cuando se detiene la actividad mitótica la pendiente de la curva comienza aplanarse, las células comienzan un proceso de ex-

presión genética que permite la síntesis de proteínas más complejas que conduce a la diferenciación celular (Gil-Loyzaga, 2011).

La tasa de proliferación celular genera información acerca de las propiedades que presentan las células en cultivo, así como también facilita el diseño de experimentos, ya que permite determinar la cinética del cultivo.

Mediante esta información obtenida se establece el tiempo requerido para realizar los subcultivos, puesto que los cultivos celulares varían significativamente en sus propiedades dependiendo de la fase en que se encuentren. El tiempo más apropiado para realizar los subcultivos es la fase logarítmica, ya que el cultivo se encuentra en su forma más reproducible, siendo altamente uniforme y viable. (Helgason y Miller, 2005).

### 3.2 Materiales

- ◆ Material biológico: Líneas celulares
- ◆ Placas plásticas multipozos 6 x 4 y placas de 96 pozos fondo plano
- ◆ Frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup>
- ◆ Pipetas de 5 y 10 mL
- ◆ Tubos de centrifuga de 15 mL
- ◆ Hemocitómetro
- ◆ Lector de ELISA.

### 3.3 Soluciones y medios de cultivo

Solución Buffer Fosfato libre de calcio y magnesio.

Medio de cultivo Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM) (Gibco) suplementado con 10% Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco) y mezcla de antibióticos-antimicóticos.

Solución de Tripsina-EDTA (0,125%, 0,02%)

Azul tripano al 0,4%

MTT

Dimetilsulfoxido.

### **3.4 Métodos para determinar la proliferación celular**

#### **3.4.1 Determinación de la curva de crecimiento por conteo celular con hemocitómetro**

##### **A continuación se señala el procedimiento:**

1. Chequear las células de los cultivos en el microscopio invertido para determinar cualitativamente la densidad de éstas y poder asegurar que éste se encuentra semiconfluyente o confluyente.
2. Realizar el subcultivo con Tripsina-EDTA y sembrar a bajas densidades (20.000 cel/pozo) en placas multipozos 6x4. Esto permite tener un  $n=6$  por 7 días. Las células son mantenidas en atmósfera húmeda a 37° C y al 5% CO<sub>2</sub>. Secuencialmente a los 1, 3, 5, 7 días indicados, se disgregan 6 pozos usando Tripsina-EDTA y son contadas las células en el hemocitómetro utilizando el colorante de exclusión azul de tripano.
3. A partir de la información del número de células obtenidas, se realiza la curva de crecimiento celular, tal como se muestra en la Figura 1.

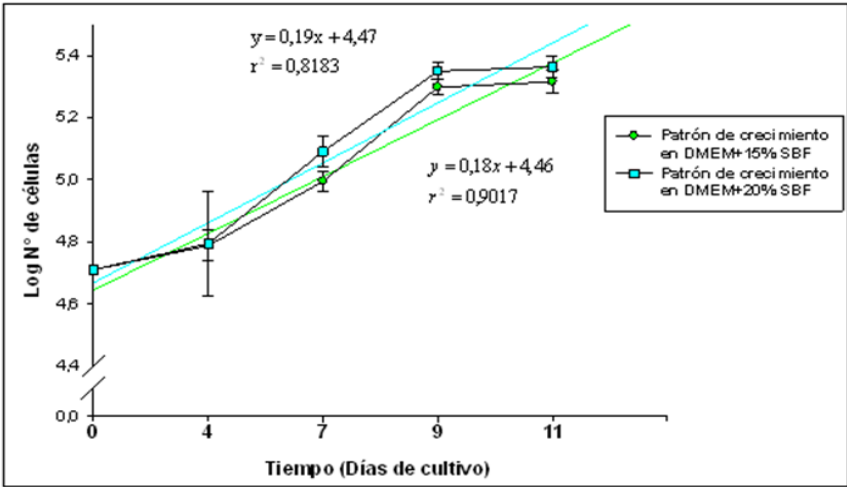
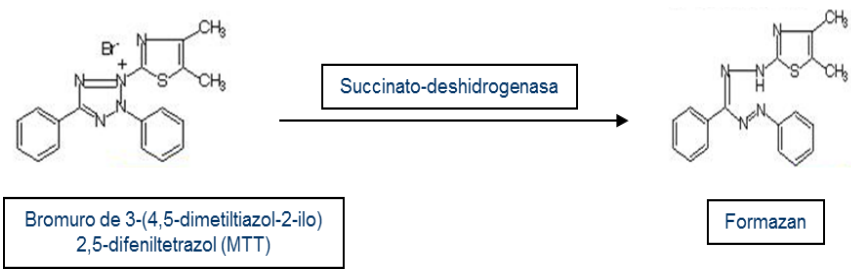


Figura 1. Comparación del patrón de crecimiento de las células del estroma de la membrana amniótica de fetos de ratón, en medio de cultivo DMEM suplementado con 15% SFB y 20% SFB. En los 2 casos, los cultivos mostraron el comportamiento típico de las células mantenidas *in vitro*, caracterizado por tres fases: una fase de latencia en el primer, segundo y tercer día de cultivo, seguida de una fase exponencial entre el cuarto y noveno día y, finalmente, una fase de saturación. (Tomado de Meyer, 2012).

### 3.4.2 Método MTT

#### A continuación se señala el procedimiento:

Para determinar la proliferación celular también se utiliza el método del MTT [3-(4.5 Dimetiltiazol-2y1)-2,5 Bromuro de Difetil Tetrazolium)], el cual se basa en la transformación de la sal de tetrazolium soluble en agua a un compuesto insoluble de color morado, denominado formazán, debido a la ruptura del anillo tetrazolium por las enzimas deshidrogenasas de las mitocondrias activas.



La cantidad de células viables es proporcional a la cantidad de formazán producido (Figura 2). Los cristales de formazán formados se disuelven con dimetilsulfóxido (DMSO), se determina espectroscópicamente la densidad óptica a 570 nm (Mosmann, 1983) y, después, se grafica como se muestra en la Figura 3.

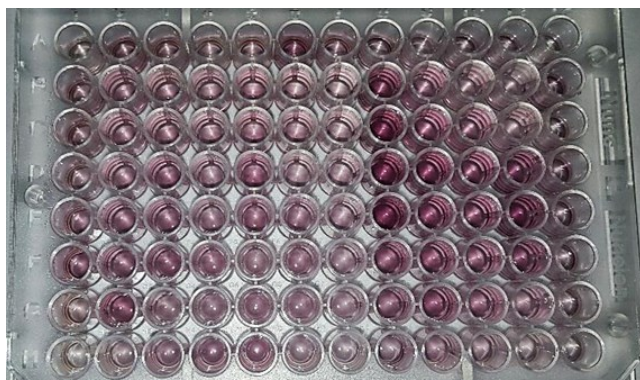


Figura 2. Microplaca de 96 pozos donde se puede observar los cristales de formazán de color violeta en diferentes tonalidades.

### **A continuación se señala el procedimiento:**

1. Sembrar las células en microplacas de 96 pozos a una densidad de 2000 células/pozo y cultivar en los medios a ensayar. El mantenimiento se lleva a cabo en atmósfera húmeda y 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C.
2. Secuencialmente a los 3, 6 y 10 días cada placa se le retira el medio de cultivo y se le agrega MTT disuelto en PBS a 0,4 mg/ml (Sigma).
3. Incubar por 3 horas a 37 °C en atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>, descartar el MTT y se agrega Dimetilsulfoxido (DMSO).
4. Realizar la lectura a la densidad óptica a 570 nm en el lector

espectrofotométrico de microplacas (ELISA).

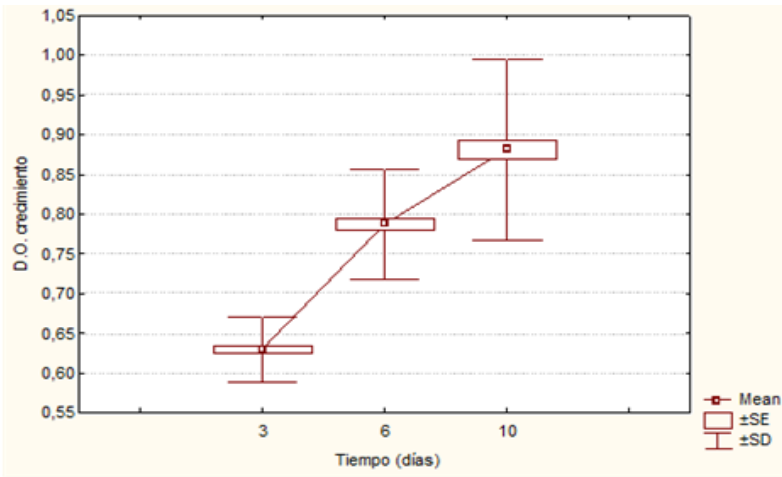


Figura 3. Curva de proliferación de las células mesenquimales del cordón umbilical humano. Intervalo de confianza 95%. Células mesenquimales del décimo pasaje. Se observa un comportamiento de fase logarítmica que se atenúa luego de los 6 días de cultivo (Tomado de Calderón, 2007).

### 3.4.3 Población celular acumulativa

Con la finalidad de observar el comportamiento proliferativo de las células a través de los sucesivos pasajes, también se puede realizar el cálculo de la frecuencia acumulada de la población de la siguiente forma:

Disgregar las células mantenidas en los subcultivos con Tripsina-EDTA y centrifugar a 2500 rpm por 5 minutos. La suspensión celular obtenida se resuspende en medio nutritivo y luego se toma una muestra para determinar el número de células con el hemocitómetro y el colorante de exclusión azul de tripano. Posteriormente, se calcula la población utilizando la siguiente fórmula propuesta por Zuk y col. 2001:

Frecuencia acumulada de la población celular =  $\log N_1 / \log N_2$ , donde  $N_1$  es el número de células antes del pasaje y  $N_2$  es el número de células sembradas después del pasaje.

La población acumulativa puede ser usada generalmente como un índice de edad biológica, en el que un mayor potencial de proliferación indicaría que posiblemente las células son biológicamente más jóvenes que otras células adultas (Bruder y col., 1997).

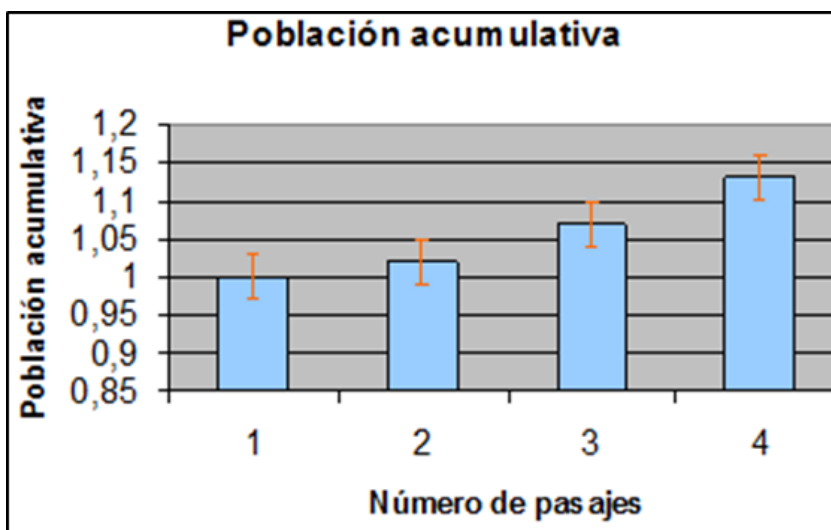


Figura 4. Población acumulativa a través de los pasajes de las células del estroma del tejido adiposo. Media 1,06 y desviación estándar 0,06. n=5. (Tomado de Rodríguez, 2005).



### 3.5 Bibliografía del capítulo

- Bruder, S., Jaiswald, N. y Haynesworth, S. (1997). Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* 64: 278-294.
- Calderón, D. (2007). Establecimiento del cultivo de células mesenquimales del cordón umbilical humano y estudio de su potencialidad de diferenciación *in vitro*. Licenciatura en Biología. Universidad de Carabobo.
- Colter, D., Class, R., Di Girolamo, C. y Prockop, D. (2000). Rapid expansion of recycling stem cells in culture of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 3213-3218.
- Gil-Loyzaga, P. E. (2011) Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa. Editorial Visión Libros, Madrid España.
- Helgason, C. y Miller, C. (2005). *Methods in Molecular Biology*. Vol. 290. Basic Cell Culture Protocols. 3ra. Edición. Editorial Humana Press.
- Meyer, M. (2012) Establecimiento del cultivo de células madre mesenquimales de la membrana amniótica. Caracterización y diferenciación *in vitro*. Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
- Mossman, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth

and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. JIM. 65:55-63.

Rodríguez, M. (2005). Establecimiento de cultivo de células estromales del tejido adiposo. Potencial osteocondrogénico *in vitro*. Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias.

Zuk, P., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim P., Lorenz, H. P. y Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 7(2): 211-228.

## CAPITULO 4

## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA E INMUNOHISTOQUÍMICA DE LAS CÉLULAS EN CULTIVO

**4.1 Introducción**

Las células cultivadas *in vitro* pueden sufrir cambios a nivel morfológico, funcional, y genético relacionados con las características típicas del tejido de donde han sido extraídas. La visualización de su estructura y función requiere el empleo de técnicas específicas que permiten procesar las células con diferentes métodos morfológicos para su observación al microscopio óptico. Para determinar características morfológicas y el comportamiento de las células en los diferentes cultivos, se pueden llevar a cabo observaciones periódicas al microscopio de contraste de fases donde no se requiere de ningún tipo de tratamiento previo. Los registros fotográficos correspondientes pueden hacerse en un microscopio invertido de contraste de fase (Figura 1A). De igual manera, se pueden realizar coloraciones de rutina May-Grünwald-Giemsa (Figura 1C y 1D), coloraciones histoquímicas (Figura 1B, Figuras 2 y 3). Además, el linaje del tejido de origen puede ser caracterizado inmunohistoquímicamente, determinando la expresión de ciertas proteínas consideradas como marcadores moleculares específicos para un fenotipo celular (Figuras 4 y 5).

## 4.2 Materiales

- ◆ Líneas celulares.
- ◆ Tubos de Leighton con laminillas.
- ◆ Portaobjetos.
- ◆ Cubreobjetos 24 x 50 mm.

## 4.3 Soluciones y medios de cultivo

Solución Buffer Fosfato libre de calcio y magnesio Medio de cultivo Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM) (Gibco) suplementado con 10 % Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco), L-glutamina 2 mM (Gibco) y mezcla de antibióticos-antimicóticos.

Solución de Tripsina-EDTA (0,125%, 0,02%)

Reactivos:

- ◆ Colorantes: Azul de Toluidina, Giemsa, Hematoxilina, May-Grünwald, Rojo de Alizarina, Sudan III
- ◆ Formalina al 10% en solución PBS
- ◆ Medio de montaje resinoso (Entellan)
- ◆ Acetona
- ◆ Etanol
- ◆ Xileno

Inmunocitoquímica:

Anticuerpos monoclonales en contra de Pan-citoqueratinas (Santa Cruz Biotechnology), desmina (DAKO) y vimentina (Santa Cruz Biotechnology) diluidos 1/100.

Kit VECTOR Laboratories.

#### 4.4 Coloración histológica de rutina MAY-GRÜNWARD-GIEMSA

1. Sembrar las células en tubos de Leighton a una densidad de 50.000 células/tubo y cultivar a diferentes tiempos.
2. Extraer la laminilla del tubo de Leighton y lavar los cultivos con solución PBS.
3. Fijar con metanol por 5 minutos.
4. Colorear con May-Grünwald por 5 minutos.
5. Colorear con Giemsa diluido en una proporción 1:18 por 20 minutos.
6. Deshidratar en una batería acetona-xileno y montar la laminilla en un portaobjeto con medio de montaje resino (Entellan o Permount).

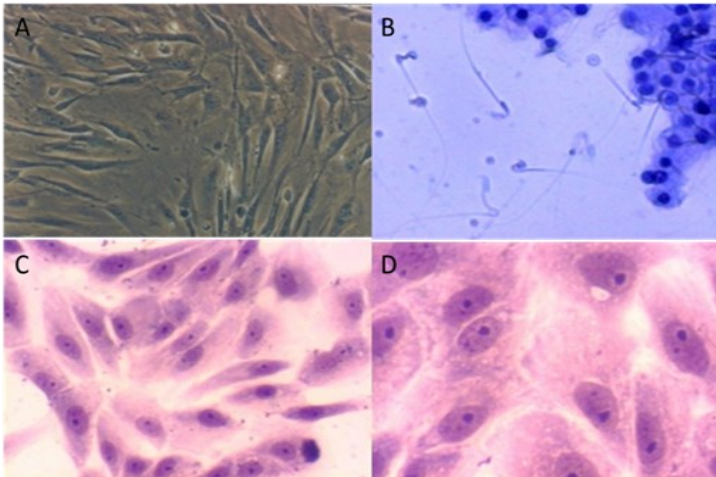


Figura 1. Caracterización morfológica de células en cultivo. A. Monocapa de células tipo fusiforme derivadas del tejido adiposo. Microscopio de contraste de fase. 200X. B. Espermatozoides y células del epidídimo. Coloración con azul de toluidina 200X. C. Población celular heterogénea. 200X D. Detalle de las características de las células se puede visualizar el citoplasma, núcleo y nucléolos. 400X. Coloración May-Grunwald-Giemsa.

### **4.5 Coloración Sudan III**

La presencia de adipocitos se detecta mediante esta coloración. Para ello, los cubreobjetos son previamente fijados durante 10 minutos con formalina neutra al 10%. Una vez fijados se colocan en etanol 70% durante 10 minutos para luego colorear con Sudan III por 5 minutos. Transcurrido este tiempo se lava con etanol 70% y con agua destilada, se contrastan los núcleos con hematoxílina por 5 minutos y se lava con agua corriente por 10 minutos. Finalmente, se montan las láminas en un medio acuoso.

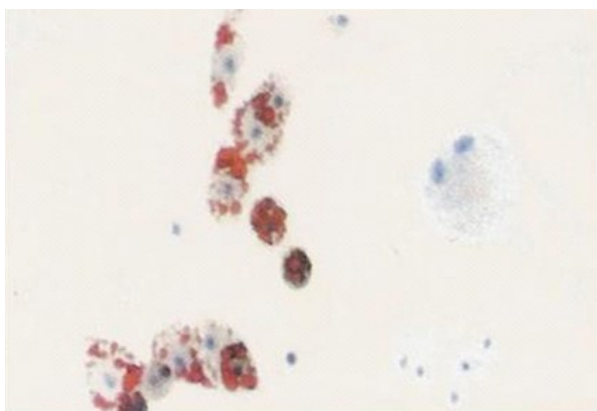


Figura 2. Células similares a adipocitos positivas a la coloración histoquímica con Sudan III se observan con diferentes grados de maduración, donde se aprecian numerosas inclusiones lipídicas coloreadas. Coloración histoquímica con Sudan III. 200X. (Tomado de Acosta A., 2001).

### **4.6 Rojo de Alizarina**

La presencia de depósitos de fosfatos de calcio se evidencia usando una solución de Rojo de Alizarina al 2% a la que previamente se le ajusta el pH en un rango de 4.1-4.3. Para llevar a cabo esta coloración las láminas fijadas son hidratadas hasta al-

cohol 50%, se lavan rápidamente en agua destilada y se cubren con la solución colorante por 10 minutos, luego de lo cual se lavan 3 veces con PBS y se procede a deshidratar en acetona y xileno para montar en medio de montaje resinoso (Entellan).

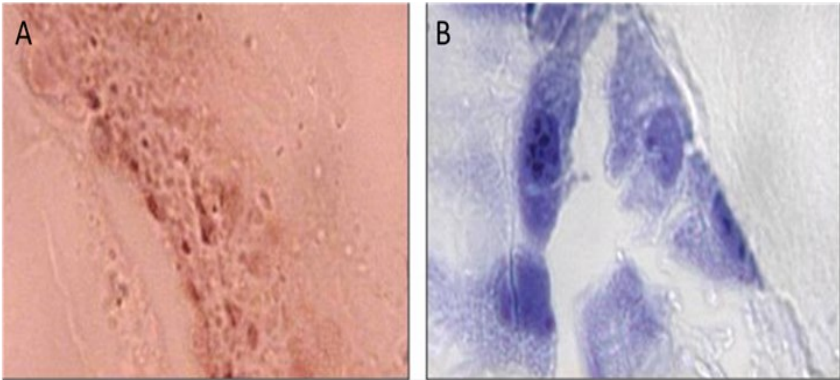


Figura 3. Células del tejido adiposo en matriz de colágeno tipo I en presencia de medio osteogénico. A. Zona densa donde se pueden apreciar los depósitos de fosfato de calcio que se colorea con el rojo alizarina. 400X. B. Células cuboidales inmersas en la zona mineralizada localizadas en la zona periférica del gel. Azul de Toluidina. 1000X. (Tomado de Rodríguez, M., 2005).

#### 4.7 Caracterización inmunohistoquímica

Para determinar los diferentes tipos celulares presentes en los cultivos, se realizan ensayos inmunohistoquímicos contra diferentes antígenos. La visualización de éstos se logra mediante la aplicación de anticuerpos específicos. Por ejemplo, en contra de filamentos intermedios, tales como la desmina (Figura 4), vimentina (Figura 5) y citoqueratinas (Figura 6), que son expresadas en el citoplasma de todas las células de origen muscular, mesenquimal y epitelial, respectivamente, también se pueden usar marcadores de superficie, etc.

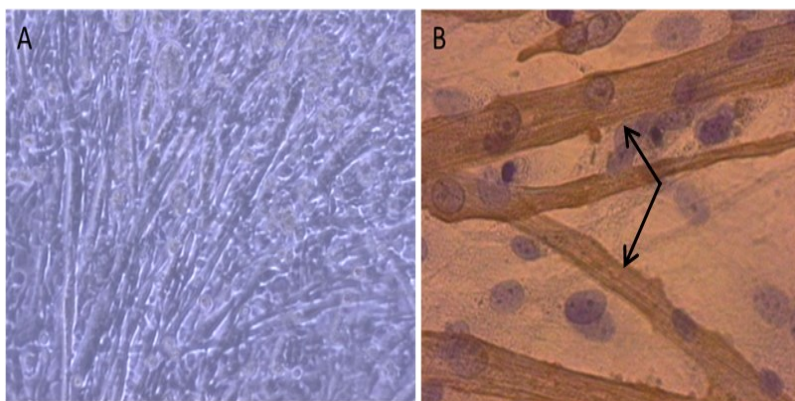


Figura 4. A. Cultivo de células embrionarias se pueden observar miotúbulos en diferentes orientaciones. Contraste de Fase. 200X. B. Determinación inmunocitoquímica contra de la desmina donde se puede observar la expresión de esta proteína solo en las células multinucleadas (flechas). 400X.

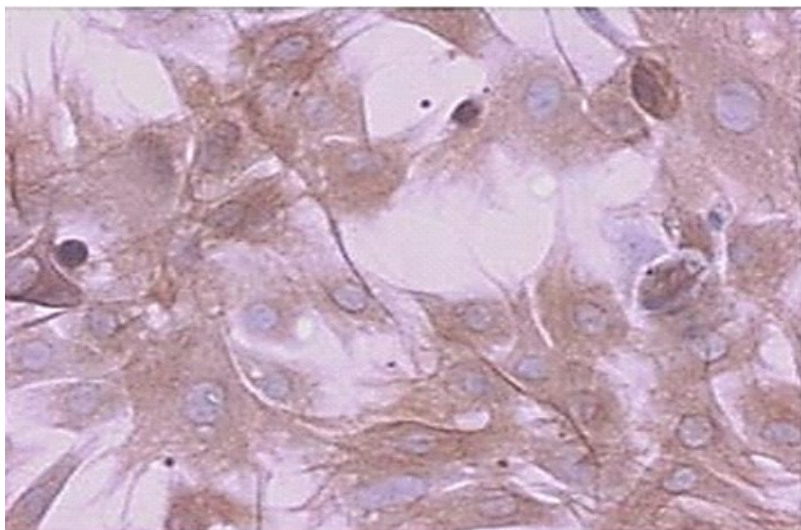
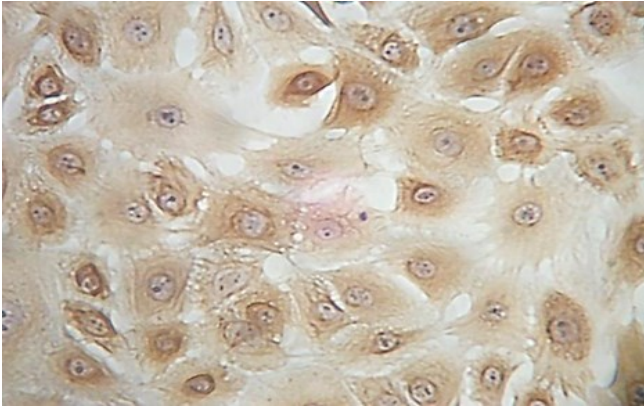


Figura 5. Evaluación inmunocitoquímica con el anticuerpo en contra de vimentina. Se muestra el marcaje de todas las células mesenquimales de la médula ósea. 200X. (Tomado de Acosta, 2003).



Tipos  
todos:



de mé-

Figura 6. Evaluación inmunocitoquímica con el anticuerpo en contra de pancitoqueratina. Se muestra el marcaje de todas las células similares a epiteliales de la membrana amniótica humana con diferentes niveles de expresión. 200X. (Tomado de Navarro, 2013).

**Directo:** Se emplea un anticuerpo primario biotinilado dirigidos contra el antígeno de interés y un complejo enzimático con un sustrato cromogénico. La activación enzimática del cromógeno produce una reacción visible en el sitio donde está presente el antígeno, indicando que ha ocurrido su expresión.

**Indirecto:** Un anticuerpo primario dirigido contra el antígeno de interés, un anticuerpo secundario biotinilado y un complejo enzimático con un sustrato cromogénico. La activación enzimática del cromógeno produce una reacción visible en el sitio donde está presente el antígeno indicando que ha ocurrido su expresión.

A continuación vamos a describir el procedimiento del método indirecto para llevar a cabo el marcaje de células cultivadas en monocapa:

1. Fijar con metanol por 5 minutos e incubar en PBS con albúmina al

0,5% por 15 minutos, lavar con PBS durante 10 minutos, para finalmente incubar con el respectivo anticuerpo primario.

2. Evidenciar la reacción del anticuerpo utilizando un kit, tal como el Vectastain ABC (vector), el DAKO, el Santa Cruz.

3. Contrastar los núcleos con hematoxilina y deshidratar las láminas en una batería creciente en etanol con dos cambios en xilol para montar en medio resinoso. Estos kits hacen uso de un anticuerpo secundario biotinilado que se une al complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa, el cual reacciona con el sustrato para peroxidasa (diaminobencidina) y, finalmente, permitir evidenciar la unión antígeno-anticuerpo.

La estreptavidina es una proteína de 60 kDa procedente de *Streptomyces avidinii*, tetramérica, con alta afinidad por la biotina. La biotina es una proteína soluble en agua (vitamina H) de bajo peso molecular (244 Da). Presenta un grupo carboxílico que permite su unión a los grupos amino de las proteínas.

La biotinilización es una reacción bioquímica que permite unir biotina a una gran variedad de moléculas como enzimas, lectinas, anticuerpo, ácidos nucleicos, etc., mientras que la peroxidasa HRP es una enzima termoestable hasta 63 °C y a temperatura ambiente conserva su actividad oxidante durante semanas. La actividad peroxidasa (oxidación del sustrato apropiado) convierte sustratos incoloros en un producto insoluble de un color específico que se precipita en el sitio de la reacción enzimática. Uno de los cromógenos (sustratos) apropiados para la peroxidasa es la diaminobencidina (DAB) dando

posibilidad de doble marcaje.

Enzima	Cromógenos	Precipitados
Peroxidasa	DAB AEC 4-cloro-1-naftol	marrón rojo azul

Tabla 1. Tabla resumen de los diferentes cromógenos para la enzima peroxidasa.

Tomado de Morel y col., 2000.

#### 4.8 Bibliografía del capítulo

- Acosta, A., (2003). Cultivo de células del estroma de médula de ósea de rata y su potencial de diferenciación *in vitro*. Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.
- Morel, G., Cavalier, A., Caballero, T., Gallego, R. (2000). Hibridación *in situ* en microscopía óptica. Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico. Santiago de Compostela, España.
- Navarro, E. (2013). Membrana amniótica humana como fuente de células y biosustrato. Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.
- Rodríguez, M. (2005). Establecimiento de cultivo de células estromales del tejido adiposo. Potencial osteocondrogénico *in vitro*. Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.

## CAPÍTULO 5

## MÉTODOS DE CRIOPRESERVACIÓN CELULAR Y DESCONGELACIÓN

**5.1 Introducción**

La criopreservación es un proceso por medio del cual células o tejidos son congelados a muy bajas temperaturas, generalmente entre  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ , con el fin de mantener las características morfológicas y fisiológicas viables por largos periodos de tiempo. La metodología involucra cuatro pasos: agregar la sustancia crioprotectora, congelación, descongelación y remoción de la sustancia crioprotectora.

Es importante que se mantengan las características de la línea celular después del proceso de congelación, para esto es básico el uso de agentes protectores de la congelación para evitar la formación de cristales que dañen irreversiblemente el citoplasma celular (Freshney, 2010)

Actualmente existen dos métodos de criopreservación, el primero de ellos es denominado congelamiento lento, ya que utiliza lentas tasas de enfriamiento aproximadamente de  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y el segundo la vitrificación, el cual utiliza tasas de congelación de  $-100\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , logrando deshidratar a la célula rápidamente, de tal forma que no se alcanza a formar cristales

La vitrificación es una técnica de congelación ultra rápida del material celular, que permite que la célula y su entorno se

solidifiquen en una forma similar al vidrio sin que se formen cristales de hielo dentro de la célula. Durante el proceso de vitrificación toda el agua del interior de la célula se sustituye con la solución crioprotectora, lo que permite que las células se puedan colocar en nitrógeno líquido sin la formación de cristales de agua. Debido a que este método utiliza altas concentraciones de crioprotector en un volumen mínimo y elevadas velocidades de enfriamiento, es más eficiente en la eliminación del agua de la célula permitiendo que estén más protegidas de los efectos perjudiciales del proceso de congelación (García y col., 2011). El método de congelación tradicional es más lento y, a menudo, no consigue deshidratar totalmente las células por lo que las deja más susceptibles al daño. El resultado de la vitrificación es una estructura muy homogénea y una estructura cristalina amorfa.

## **5.2 Congelación Tradicional**

### **5.2.1 Procedimiento**

1. Las células son resuspendidas en un medio de congelación, compuesto de medio DMEM suplementado con SFB al 20% y glicerol al 10%, y son almacenadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.
2. Para descongelar estas células, los criotubos son colocados en agua bidestilada a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta solubilizar la muestra y luego se agrega medio nutritivo base.
3. Centrifugar a  $724,5\text{ g}$  por 5 minutos y el taco celular obtenido

se resuspende en medio nutritivo para sembrar en placas de cultivo de 35 mm.

Se debe calcular la viabilidad celular con el colorante azul tripano y caracterizar las posibles modificaciones de las células después de la congelación.

### **5.3 Vitrificación de Células**

Método de 2 pasos para criopreservar células y tejidos utilizando soluciones de equilibrio y de vitrificación según la metodología de Moon y col. (2008) con ligeras modificaciones

#### **5.3.1 Procedimiento**

1. La solución de equilibrio utilizada es 20% de etilenglicol (EG) y la de vitrificación: 40% EG, 18% Ficoll 70 y 0,3 M sacarosa. Todas las soluciones se preparan en tampón PBS que contiene 20% de Suero Fetal de Bovino
2. El taco celular con alrededor de  $1 \times 10^6$  células (10  $\mu$ L) se resuspende en 50  $\mu$ L de la solución de equilibrio por 5 minutos y luego se mezcla con 500  $\mu$ L de la solución de vitrificación por 40 segundos. La suspensión celular se coloca en un criotubo de 1,2 mL y se colocan directamente en nitrógeno líquido.
3. Las células se descongelan a las 2 semanas, colocando los viales en un baño de María a 37 °C y se resuspende en PBS que contiene 20% SFB y sacarosa a diversas concentraciones (0,5 M, 0,25 M). La viabilidad celular se deter-

mina con el método del azul tripano. Las células son sembradas a una densidad de 100.000 células /frasco 75 cm<sup>2</sup>.

#### **5.4 Vitrificación de Tejidos**

Para vitrificar tejidos, se sigue el mismo procedimiento mencionado anteriormente, la única diferencia es el incremento del tiempo con la solución de equilibrio por 10 minutos.

Posteriormente, se extraen las ampulas con las secciones del tejido del nitrógeno líquido y directamente se descongelan en un baño de María a 37 °C y rehidratan en una solución de PBS. En el laboratorio se ha aplicado este procedimiento al estroma de la membrana amniótica para ser utilizado como biosustrato celular (Navarro, 2013).

#### **5.5 Bibliografía del capítulo**

- Freshney, I. (2010). Culture of animal cells. A manual of basic technique. Editorial Wiley-Liss, 6th Edition, Toronto, Canadá.
- García, M., Martínez, R., Ruvalcaba, L. (2011). Vitrificación de ovocitos y embriones. Revista Mexicana de Medicina de la Reproducción. 3(4): 143 – 149.
- Moon, J. H., Lee, J. R., Jee, B., Suh, Ch., Kim, S. H., Lim, H. J., Kim, H. K. (2008). Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells. Human Reproduction Vol.23, No.8 pp. 1760–1770.
- Navarro, E. (2013). Membrana amniótica humana como fuente de células y biosustrato. Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.
- Vunjak-Novakovic G., Freshney RI (2006). Culture of Cells for Tissue Engineering. John Wiley & Sons, Inc.

## CAPÍTULO 6

## UTILIZACIÓN DE BIOMATRICES NATURALES PARA CULTIVAR CÉLULAS MESENQUIMALES

**6.1 Introducción**

La reconstrucción de tejidos y órganos *in vitro*, así como también la terapia celular, son alternativas para la sustitución de tejidos dañados en el ser humano. Pueden ser obtenidos a partir de células del mismo paciente. Para esto se toma una pequeña biopsia de tejido, se disgregan las células y se cultivan para luego ser implantadas *in vivo*, luego de cierto tiempo estas células contribuyen a la regeneración el tejido dañado.

Estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado como diferentes factores epigenéticos tienen una profunda influencia en la diferenciación de las células madre mesenquimales (MSCs). Los más estudiados son la composición del medio, la densidad celular, la organización espacial, las fuerzas mecánicas, los factores de crecimiento específicos y las citoquinas (Pittenger y col., 1999).

También, se conoce que la interacción de la célula con la matriz extracelular (MEC) es una fuente importante de señales que influyen en el comportamiento de la



célula, afectando el crecimiento, la migración, la diferenciación y la adhesión celular (Adams y Watt, 1993).

Particularmente el uso de biomatrices ha brindado la posibilidad de simular de alguna manera la arquitectura del tejido y las condiciones *in vivo*, permitiendo ubicar las células espacialmente y retener sus funciones, lo cual resulta importante en la inducción de la expresión de un fenotipo, pues entran en juego la acción de fuerzas químicas y mecánicas como la difusión y la tensión, además de afectar el comportamiento celular por medio de las interacciones MEC-célula y alterando las interacciones célula-célula (Merentes, 2009).

Entre los materiales que más se han utilizado para la elaboración de biomatrices están: los colágenos y sus derivados, los polímeros y los hialuronatos. Sin embargo, una biomatriz ideal debe poseer una gran cantidad de características para permitir su uso terapéutico, en la regeneración y funcionabilidad de un tipo celular específico (Ponticiello y col., 2000; Mizuno y Kuboki, 2001).

Las poblaciones homogéneas de células del estroma con morfología fusiforme, obtenidas de diferentes fuentes de tejido como medula ósea o tejido adiposo, se pueden sembrar y/o embeber en una matriz tridimensional de colágeno tipo I. Esto permite brindar a las células un microambiente circundante que induzca la expresión de características de un fenotipo diferenciado, además de utili-

zar diversos factores en el medio base.

## **6.2 Obtención de Colágeno Tipo 1 a partir de la cola de rata**

El colágeno es obtenido de la cola de rata según la metodología de Van Bockmeer y col. (1982) con ligeras modificaciones. El sustrato tridimensional utilizado para embeber las células del estroma está formado por una red intrincada de fibras de colágeno tipo I obtenido de la cola de rata. Este gel posee una consistencia flexible y transparente. Para preparar esta matriz tridimensional de colágeno se utiliza una concentración teórica de colágeno de 15 mg/ml.

### **6.2.1 Procedimiento**

1. La cola de rata se coloca en etanol al 70% durante 1 hora (Se realizan 2 cambios de 30 minutos), luego se desprende la piel, se corta en segmentos de 3 cm aproximadamente y se incuba de nuevo en etanol al 70% por 30 min. Transcurrido este tiempo se lavan los trozos tres veces en etanol al 70%, se incuban en solución Buffer Fosfato (PBS) 30 minutos. Posteriormente, se realizan 3 lavados con PBS.
2. Los trozos se mantienen en PBS y con 2 pinzas gruesas se les da unos movimientos de rotación, para extraer con mayor facilidad los tendones del tejido conjuntivo que los rodea. Las fibras obtenidas se colocan en una placa (La placa

estéril es pre-pesada, se colocan las fibras y por diferencia se conoce el peso de los tendones extraídos).

3. Los tendones se colocan en una solución estéril de ácido acético glacial diluido 1/1000 en agua. Por cada gramo de tendones se añade 100 ml de la solución y se mantiene en agitación continua 48-72 horas a 4 °C.

4. Finalmente, se filtra la solución a través de una gasa y se centrifuga a 25.000 x g por 1 hora a 4 °C. La solución de colágeno al 1% obtenida se almacena en alícuotas a 4 °C, para su posterior utilización en la preparación de los geles de colágeno. El pH de la solución de colágeno es ajustado a 7.4 con hidróxido de sodio, antes de su utilización en el cultivo.

### **6.3 Células embebidas en Colágeno Tipo 1**

#### **6.3.1 Procedimiento**

1. Las células son mezcladas con el colágeno a una densidad de 400.000 por gel en placas de 35 mm (Pineda y col., 2004), dejando polimerizar el colágeno en una estufa a 37 °C por 30 minutos para finalmente agregar el medio de cultivo correspondiente e incubar a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub> por 2-4 semanas, con cambios de medios periódicos, luego de lo cual se realizan las evaluaciones histológicas correspondientes.

2. Los geles de colágeno son fijados con formalina neutra al 10%, deshidratados en una batería creciente de etanol e

incluidos en parafina, para cortar secciones de 5 micras de espesor en un microtomo rotatorio. Las secciones obtenidas son procesadas mediante técnicas inmunohistoquímicas e histoquímicas (Figura 1).

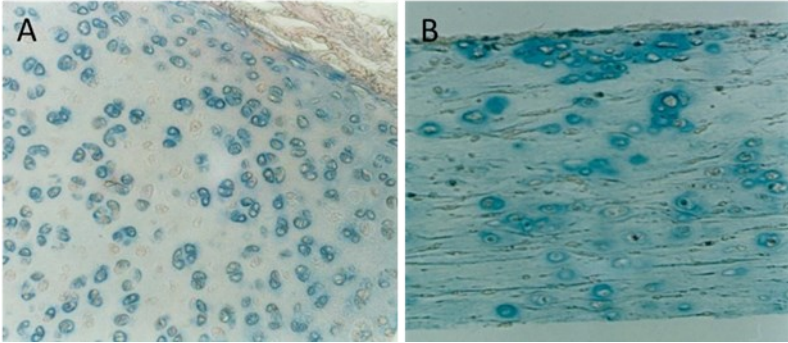


Figura 1 A. Corte histológico de cartilago. Coloración Azul Alcian pH 1. B. Matriz de colágeno tipo I donde están incluidos los condrocitos. Se puede observar la coloración azul en la región pericelular en la mayoría de las células incluidas en la matriz similar al tejido nativo (Pineda y col., 2004).

## 6.4 Bibliografía del capítulo

- Adams, J. y Watt, F. (1993). Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* 117: 1183-1198.
- Merentes, E. (2009). Fuentes de obtención de células madre mesenquimales. Potencialidad de diferenciación *in vitro*. Trabajo de ascenso a Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Mizuno, M. y Kuboki, Y. (2001). Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteo-

- blastic differentiation induced by type I collagen. J. Biochem. 129:133-138.
- Pineda, K., Merentes, E. y Starosta, R. (2004) Caracterización morfológica y bioquímica de condrocitos *in vitro*. Revista del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", 35(1):6-11.
- Pittenger, M., Mackay, A., Beck, S., Jaiswal, R., Douglas, R., Mosca, J., Moorman, M.; Simonetti, D.; Craig, S. y Marshak, D. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147.
- Ponticiello, M., Schnagl, R., Kadiyala, S. y Barry, F. (2000). Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy. J. Biomed. Mater Res. 52:246-255.
- Van Bockmer, F. y Clayton, E. M (1982). Measurements of cell proliferation and cell mediated contraction in 3-dimensional hydrated collagen matrices. J. Tiss. Cult. Methods. 7 (4): 163-167.

## CAPITULO 7

CULTIVO DE CÉLULAS MESENQUIMALES  
DEL TEJIDO ADIPOSO HUMANO**7.1 Introducción**

El tejido adiposo es un tejido conectivo especializado el cual, se deriva del mesodermo embrionario. En los mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo, que se diferencian por el color entre otras características. El tejido adiposo amarillo o blanco representa la mayor parte del tejido adiposo del adulto. También se denomina tejido adiposo unilocular porque las células solo contienen una única gota grande de lípido.

El tejido adiposo marrón es muy escaso en los adultos, mientras que en el feto y en recién nacidos está muy desarrollado. Este tejido también se denomina multilocular porque las células contienen muchas gotas pequeñas de lípido. El estroma del tejido adiposo está constituido por células sanguíneas, células endoteliales, precursores de los adipocitos, fibroblastos y una población de células mesenquimales indiferenciadas.

Estudios *in vitro* han demostrado que el tejido adiposo es una fuente rica en MSCs que tiene propiedades similares a las de la médula ósea. Esta población de células, también es capaz de diferenciarse a distintos linajes celulares como el condrogénico, adipogénico, miogénico y neurogénico. Estos resultados hacen pensar que el tejido adiposo puede ser una fuente alternativa de

MSCs con capacidad de diferenciarse hacia estos linajes celulares (Zuk y col., 2002, Romero y col., 2005). La utilización de estas células madre para su aplicación en el tratamiento de diversas enfermedades es de gran significado si se tiene en cuenta la facilidad de obtención de estas células del tejido graso y su expansión *in vitro*.

Para caracterizar específicamente el fenotipo de las MSCs del tejido adiposo se ha desarrollado una serie de anticuerpos monoclonales que permite determinar el fenotipo de estas células, las cuales expresan marcadores CD29, CD73(SH3/SH4), CD90, considerados como marcadores de las MSCs (Tolar y col., 2010). Adicionalmente se ha demostrado por inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo que las células provenientes del estroma de tejido adiposo expresan un marcador característico el CD49d, que permite diferenciarlas de la población de MSCs del estroma de la médula ósea (Zuk y col., 2002). Sin embargo, se ha demostrado que estos dos tejidos comparten una serie de marcadores específicos (Kern y col., 2006).

Aunque la médula ósea es la mejor fuente de obtención de las células humanas, se ha planteado que hay algunos aspectos que dificultan su uso como es la limitada tasa de crecimiento, la capacidad de diferenciación de acuerdo con la edad del donante de la médula, así como el riesgo de la toma de la muestra (Beyer y Da Silva, 2006). Recientemente se ha demostrado que las células del tejido adiposo no muestran rasgos de senescencia *in vitro* sino cuando tienen muchos pasajes, contrastando con

lo señalado para la médula ósea (Dimitrieva y col., 2012).

Respecto al aislamiento y cultivo a partir del tejido adiposo, las células obtenidas de esta fuente tienen una morfología, un fenotipo y una capacidad de diferenciación *in vitro*, similar a las obtenidas de la médula ósea y es posible obtener estas muestras fácilmente a partir de liposucción o abdominoplastia (Rodríguez y col., 2009).

## 7.2 Materiales

- ◆ Material biológico: Tejido adiposo obtenido del tejido subcutáneo de la piel obtenida de cirugías estéticas con consentimiento del paciente.
- ◆ Solución PBS
- ◆ Medio F12 con 2% antibióticos-antimicóticos
- ◆ DMEM suplementado con 10% de SFB
- ◆ Colagenasa tipo I
- ◆ Tripsina 0,125% - EDTA 0,02%,
- ◆ Pipetas
- ◆ Frascos de 25 cm<sup>2</sup>
- ◆ Placas de Petri
- ◆ Tubos de centrifuga 15 mL
- ◆ Fiolas
- ◆ Magnetos.



### 7.3 Procedimiento

Obtención de las células provenientes del estroma del tejido adiposo se sigue el método de Zuk y col. 2001 con algunas modificaciones.

1. Las muestras de piel obtenidas de cirugías estéticas son transportadas al laboratorio en medio F12 con antibióticos (penicilina 200 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml y anfotericina 4 µg/ml), a una temperatura de 4 °C (Bello y col, 1998).
2. Separar el estroma del tejido adiposo humano de las otras capas de la piel, lavar varias veces con PBS para eliminar los restos de sangre y seccionar en pequeños trozos, añadiendo colagenasa tipo I (SIGMA) al 0,075% y colocar en agitación durante 30 minutos a 37 °C. La suspensión celular resultante se filtra y se centrifuga durante 15 minutos a 2500 rpm. Posteriormente, el taco celular obtenido, se resuspende en un medio DMEM suplementado con 10% de SFB, 100 U/ml penicilina G y 2 mg/ml anfotericina.
3. La viabilidad celular es determinada con el colorante de exclusión azul tripano y se cuantifica el número de células con un hemocitómetro. Las células se siembran a una densidad de  $7 \times 10^5$  a  $1,3 \times 10^6$  células en frascos de 25 cm<sup>2</sup>.
4. Los cultivos son incubados a 37 °C, en atmósfera húmeda al 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se cambia el medio a las 24 horas de cultivo para así eliminar los restos de células y se mantiene hasta alcanzar la semiconfluencia con cambios de medios periódicos, luego de lo cual se realizan los subcultivos con el fin de amplificar la población de cé-

lulas progenitoras de morfología fusiforme (Figura 1). Para ello las células se disgregan con tripsina 0,125% - EDTA 0,02%, se centrifuga a 618 g por 5 minutos y el taco celular obtenido se resuspende en medios de cultivos para sembrar nuevamente.

Una vez amplificadas las células por los subcultivos, pueden ser utilizadas para realizar ensayos de proliferación, caracte-

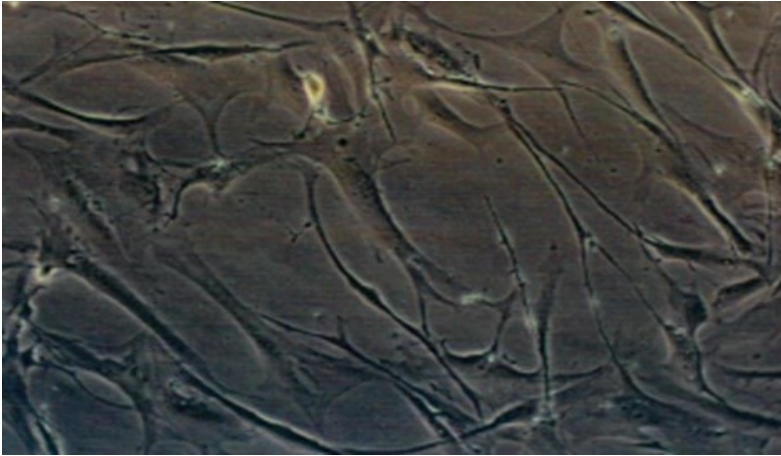


Figura 1. Subcultivo de células del tejido adiposo humano se puede apreciar la morfología fusiforme. Contraste de fases.200X.

terización e inducción de la diferenciación.

#### 7.4 Bibliografía del capítulo

Bello, G., Merentes, E. y Arvelo, F. (1998). Cultivo de queratinocitos humanos *in vitro*, Gaceta Médica 106 (4): 491 - 495.

Beyer, N. y Da Silva, M. L. (2006). Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. Handb. Exp. Pharmacol. 174:249-282.

- Dmitrieva, R. I., Minullina, R., Bilibina, A. A., Tarasova, O. V., Anisimov, S. V., Zaritskey, A. Y. (2012). Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. Differences and similarities. *Cell Cycle* 11: 377-383.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24: 1294-1301.
- Rodríguez, M. y Merentes, E. (2009). Potencial de diferenciación de las células mesenquimales del tejido adiposo humano y de ratón. IV Congreso ALABAT. Punta Del Este. Uruguay.
- Tolar, J., Le Blanc, K., Keating, A., Blazar, B. R. (2010). Concise Review: Hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 28:1446–1455.
- Zuk, P., Zhu, M, Ashjian, P., De Ugarte, D., Huang, J., Mizuno, H., Alfonso, C., Fraser, J., Benhaim, P., Hedrick, M. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *MBC*.13 (12):4279-95.
- Zuk, P., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, JW, Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. y Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7(2): 211-228.

## CAPÍTULO 8

## CULTIVO DE CÉLULAS DE CARTÍLAGO NASAL HUMANO

**8.1 Introducción**

El cartílago es un tejido avascular al igual que la epidermis, por lo cual los nutrientes difunden a partir de los vasos sanguíneos del tejido conectivo que los circundan. Según esta característica, es posible establecer cultivos de condrocitos y reconstruir tejidos cartilagosos *in vitro*, pero es importante tener en cuenta que la proliferación, expresión y mantenimiento del fenotipo característico de los condrocitos dependen de las condiciones de cultivo, tales como suplementos del medio de cultivo (factores de crecimiento y otras sustancias), densidad de siembra y tipo de sustrato utilizado (matrices naturales o sintéticas) (Perka y col., 2000).

La optimización de las técnicas *in vitro* utilizando estas condiciones ha permitido que los cultivos de condrocitos puedan ser usados para la restauración de daños en el cartílago articular humano. La bioingeniería de tejidos ha logrado producir cartílago *ex vivo*, teniendo en cuenta parámetros como la fuente de células, moléculas de señalización, andamios e influencias biomecánicas que permiten producir un tejido que puede ser implantado con características similares y funcionales al

tejido nativo (Kock y col., 2012).

## 8.2 Materiales

Material biológico: Muestras de cartílago nasal humano de edades comprendidas entre 15-25 años, provenientes de cirugías reconstructivas de la nariz bajo consentimiento informado.

- ◆ Tripsina 0,25%
- ◆ Colagenasa Tipo II (2 mg/ml)
- ◆ Medio Ham's F-12 con 10% SFB
- ◆ Medio nutritivo: DMEM: F12 (3:1) con 10% SFB, 50 µg/mL ácido ascórbico, 10ng/mL EGF, 10 µg/mL Insulina.
- ◆ Tripsina 0,125% - EDTA 0,02%
- ◆ Gelatina al 1%
- ◆ Placas de Petri
- ◆ Pipetas
- ◆ Tubos de centrifuga 15 mL.

## 8.3 Procedimiento

1. Las muestras de cartílago se exponen a un tratamiento enzimático realizado de forma secuencial. Primero se incuban en una solución de tripsina a una concentración de 0,25% durante 30 minutos en agitación a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo, se extrae el sobrenadante y se incuban los trozos en una solución de Colagenasa Tipo II (2 mg/ml) en medio Ham's F-12 durante 12 horas a 37 °C.
2. Dejar sedimentar los trozos que no han sido digeridos y la suspensión

que contiene las células se recoge en tubos de centrifuga y se inactiva con medio frío.

3. Centrifugar por 10 minutos a 681,8 g descartar el sobrenadante y resuspender el taco celular obtenido, en medio nutritivo y realizar el conteo celular con un hemocitómetro para determinar la viabilidad de las células con el colorante de exclusión azul tripano.
4. Sembrar las células con el medio nutritivo en placas de 51 mm previamente gelatinizadas.
5. Cuando los cultivos primarios de condrocitos humanos alcanzan la semiconfluencia se procede a realizar los subcultivos celulares de la siguiente manera: Las células se disgregan con tripsina 0,125 % - EDTA 0,02 %, se centrifugan a 681,8 g por 5 minutos, y el taco celular obtenido se resuspende en el medio nutritivo para sembrarse nuevamente en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>.

Las células de diferentes pasajes se pueden congelar para evaluar las características morfológicas y la potencialidad de proliferación antes y después de la congelación. El comportamiento proliferativo de estas células se calcula determinando la frecuencia acumulativa de la población celular (Zuk y col., 2001).

Los condrocitos humanos cultivados sobre plástico a altas densidades muestran un crecimiento en monocapa en los primeros días de cultivo, destacándose una apariencia celular de tipo poliédrica con espacios prominentes entre ellas (Figura 1). Las células subcultivadas mantienen las mismas características morfológicas hasta el segundo subcultivo y se observa

una marcada proliferación celular. A partir del 3er. pasaje se evidencian cambios morfológicos en algunas poblaciones del cultivo donde se pueden observar células con morfología fusiforme, planteándose una desdiferenciación de los condrocitos (Figura 1). No obstante, se logra mantener los cultivos hasta el 9no. pasaje sin rasgos aparentes de senescencia y se mantienen su potencial de proliferación (Márquez y col., 2012).

1ra. Fase en la producción de tejido cartilaginoso *in vitro*

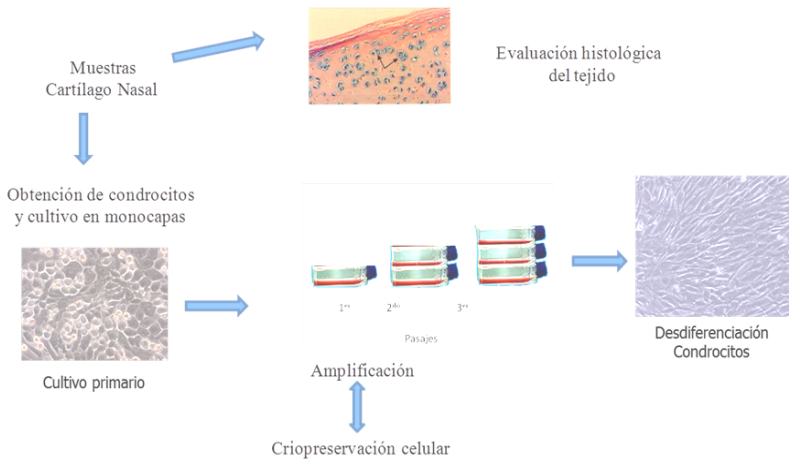


Figura 1. 1era fase en la producción de tejido cartilaginoso *in vitro*.

En presencia de una matriz de colágeno tipo I, se brinda a los condrocitos un espacio tridimensional que simula las condiciones en que se encuentra *in vivo*, por lo cual los condrocitos mantienen su morfología esférica y sintetizan componentes de matriz característicos, como son GAG y colágeno tipo II, que son marcadores de la estabilidad fenotípica de estas células. (Figura 2).

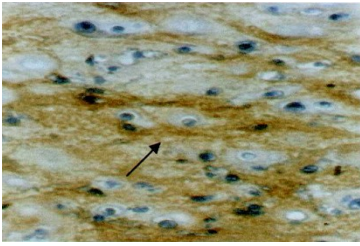


Figura 2. Equivalente de cartilago. Se puede apreciar las células de morfología esférica. Expresión de colágeno tipo II en la matriz extracelular (flecha) (Tomado de Pineda y col., 2004).

#### 8.4 Bibliografía del capítulo

- Márquez, M. L., Hernández, A., Scioscia, D. y Merentes, E. (2012). Cultivo de células de cartilago nasal humano. *Gac. Med.* 120(1):48-54.
- Perka, C., Spitzer, R., Lindenhayn, K., Sittinger, M., Schultz, O. (2000). Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *Biomed. Mater. Res.* 49:305-311.
- Peterson, L., Brittberg, M., Kiviranta, I., Akerlund, E. y Lindahl, A. (2002) Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am. J. Sports Med.* 30(1):2.12.
- Pineda, K., Merentes, E. y Starosta, R. (2004). Caracterización morfológica y bioquímica de condrocitos *in vitro*. *Revista del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”*, 35(1):6-11.
- Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P. y Hedrick, M. H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-228.



## CAPÍTULO 9

## CULTIVOS DE CÉLULAS DE LA PIEL

**9.1 Introducción**

La epidermis es un tejido constituido principalmente por queratinocitos, los cuales se organizan histológicamente en diferentes estratos: basal, espinoso, granuloso y corneo. Las células del estrato superior son constantemente removidas y tienen una alta tasa de recambio. Ellas surgen a partir de las células que conforman el estrato basal, sufriendo progresivamente el proceso de diferenciación y desplazándose hacia los estratos superiores.

La diferenciación de las células madre de la piel es un proceso complejo que se caracteriza por una secuencia ordenada de cambios morfológicos y bioquímicos, los cuales son acompañados por la expresión y modificación de ciertos productos específicos de diferenciación (Eckert, 1989).

Una de las propiedades de la epidermis es que no está vascularizada. Los nutrientes difunden a partir de los vasos sanguíneos de la dermis, característica que permite reconstruir la epidermis bajo ciertas condiciones *in vitro*, lo cual nos brinda la oportunidad de estudiar los procesos de diferenciación epidérmica.

Los cultivos de queratinocitos humanos *in vitro* han sido usados como modelo ideal para realizar estudios de diferencia-

ción celular, ya que se ha logrado reproducir la organogénesis *in vivo* bajo ciertas condiciones de cultivo (Bello y col., 1998; Merentes, 2001). Igualmente, han sido utilizados ampliamente en biomedicina, para recubrimiento cutáneo con amplias aplicaciones clínicas, como tratamientos de lesiones y para reconstrucción de la piel (Tanabe y col., 1992). Además representa una alternativa confiable para ser aplicada a pacientes con daño parcial o externo de su piel que ameriten de sus propias células especializadas para su recuperación.

Muchas han sido las técnicas de cultivo de queratinocitos desarrolladas en los últimos años con fines terapéuticos a partir de las cuales se pueden obtener láminas de epidermis en períodos relativamente cortos, entre 20 a 22 días.

A nivel práctico hay que considerar que actualmente se han ido perfeccionando las técnicas de cultivo con fines terapéuticos. El desarrollo de una técnica de esta naturaleza ha sido de gran transcendencia tanto desde un punto de vista básico como aplicado, ya que representa una alternativa confiable para todos aquellos pacientes que presentan quemaduras, así como otras afecciones de la piel pudiendo ser considerada como una técnica irremplazable para la aplicación en este tipo de patología. (Gil-Loyzaga y col., 2011).

A pesar de que existe la metodología que permite estudiar los procesos de diferenciación de las células epidérmicas, todavía es necesario optimizar la técnica para tratar de encontrar un modelo *in vitro* que se asemeje mucho a lo que

ocurre en el compartimiento *in vivo*. Recientemente se han obtenido mejores resultados cuando los queratinocitos son cultivados sobre equivalentes dérmicos (gel de colágeno tipo I más fibroblastos) y en una interfase aire-líquido. Bajo estas condiciones las células epidermales expresan los marcadores de diferenciación terminales, tales como la filagrina, transglutaminasa tipo I, citoqueratina tipo 10.

## 9.2 Materiales

- ◆ Medio de transporte: F12 que contiene doble concentración de antibióticos (penicilina G; 100 U/ml, estreptomomicina; 100 µg/ml) y antimicóticos (anfotericina B; 10 µg/ml).
- ◆ Dispsa tipo II (*Bacillus polymyxa*, Gibco BRL)
- ◆ Tripsina-EDTA (0,13%, 0,02%)
- ◆ Colágeno tipo I obtenido de la cola de la rata
- ◆ Solución PBS
- ◆ Frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup>
- ◆ Fijador Rossman
- ◆ Citoqueratina 10 (DAKO).

Medio para mantenimiento de las células epidermales: Medio definido para queratinocitos (KM1, SIGMA) y el MCDB 153 (SIGMA) con bajas concentraciones de calcio suplementado con 5% de suero fetal de bovino, hidrocortisona (0,5 µg/ml), insulina (0,5 µg/ml), factor de crecimiento epidermal (10 ng/ml) y transferrina humana (10 ng/ml).

Medio de inducción: Dulbecco's modificado (DMEM) y el Ham F12 mezclado en una proporción 3 a 1, respectivamente, suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB), hidrocortisona (0,5  $\mu\text{g/ml}$ ), insulina (0.5  $\mu\text{g/ml}$ ), triiodotironina ( $2 \times 10^{-9}$  M), toxina de cólera (0,1 nM), adenina ( $1,8 \times 10^{-4}$  M), factor de crecimiento epidermal (10 ng/ml) y transferrina humana (10 ng/ml).

Medio nutritivo para fibroblastos: DMEM suplementado con 10% de SFB.

### **9.3 Procedimiento**

#### **9.3.1 Obtención de las Células Epidérmicas**

Las muestras de piel humana son obtenidas a partir de cirugías estéticas, las cuales son colocadas inmediatamente en medio F12 y transportadas en hielo al laboratorio para su procesamiento.

1. Para la separación de la epidermis de la dermis, se procede de la siguiente manera:

Las muestras se colocan en una solución de Dispasa tipo II a una concentración de 2,4 U/ml en PBS durante 18 horas a 4 °C, para posteriormente hacer la separación, la cual es llevada a cabo manualmente mediante la utilización de pinzas para microcirugía. Para evaluar la separación de los componentes de la piel, la epidermis y dermis, éstas son fijadas en Rossman durante 24 horas a 4 °C y procesadas con las técnicas convencionales de histología (Figura 1).

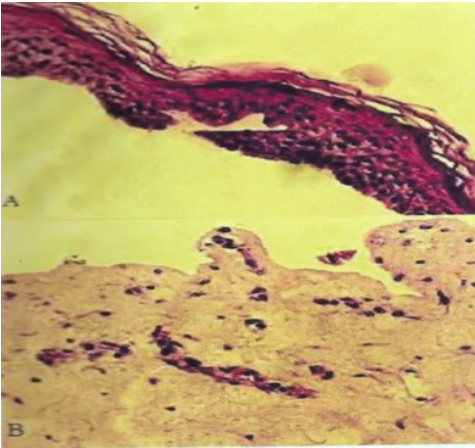


Figura 1. A. Componente epidérmico con su membrana basal aislado por acción de la Dispasa B. Componente dérmico aislado. Coloración Hematoxilina-Eosina. 100X. (Tomado de Bello y col., 1998).

2 La epidermis separada se corta en fragmentos pequeños y se coloca en una solución de Tripsina-EDTA (0,13%, 0,02%) para ser sometida a tripsinación fraccionada con agitación continua de 10-15 minutos a 37 °C. Con este tratamiento se logra separar y obtener un elevado porcentaje de células epidermales, se determina la viabilidad celular mediante el método del azul de tripano.

3 Los queratinocitos obtenidos se siembran en frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup> (2,3 x 10<sup>6</sup> células/frasco), que contienen previamente una película de colágeno tipo I. Posteriormente, los cultivos se incuban en una atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. Al cabo de cierto tiempo una vez que los cultivos primarios alcanzan la semi-confluencia, se procede a realizar los subcultivos.

4 Analizar las características morfológicas y el comportamiento *in vitro* de las células epidérmicas realizando observaciones periódicas al microscopio (Figura 2A y 2B). Por otra parte, también se puede utilizar un anticuerpo en contra de la integrina  $\alpha 2\beta 1$ , la cual se expresa en las células basales de la epidermis (Figura 2C).

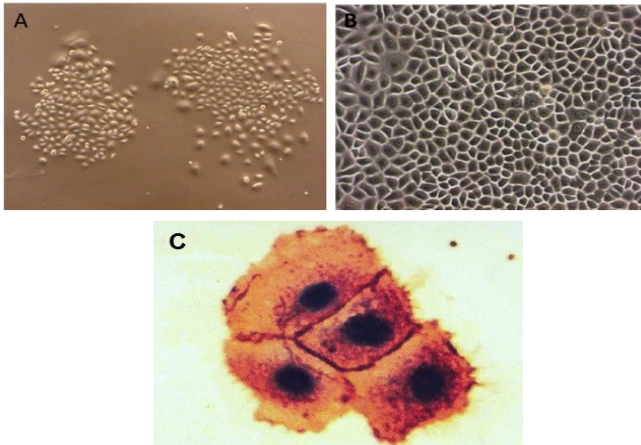


Figura 2. A. Colonias de queratinocitos. 100X B. Monocapa de queratinocitos donde se puede observar las células de forma poliédricas y las uniones intercelulares. 200 X. Microscopio de contraste de fases. C. Ensayo inmunocitoquímico con el anticuerpo contra integrina  $\alpha_2\beta_1$  donde se observan células positivas al marcaje, específicamente a nivel de la membrana celular. 200X.

Los cultivos secundarios se dejan crecer hasta alcanzar la confluencia. La monocapa epidermal obtenida se desprende de la superficie en forma de láminas coherentes con la ayuda de la proteasa Dispasa II, la cual separa el tejido manteniendo su integridad. Finalmente, la monocapa es fijada para su evaluación morfológica.



Figura 3. Estratificación *in vitro* de las células epidermales. Células basales (b) y expresión de la citoqueratina 10 en las capas suprabasales (s). 3 semanas de cultivo. 100X.

### 9.3.2 Cultivo de Células Dérmicas Humanas

Para la obtención de los fibroblastos se procede de la siguiente manera:

La dermis se corta en fragmentos finos (1 mm) y se colocan en placas de cultivo con medio nutritivo DMEM suplementado con 10% de SFB. Los cultivos son incubados a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, una vez que las células irradian de los explantes, se realiza el subcultivo.

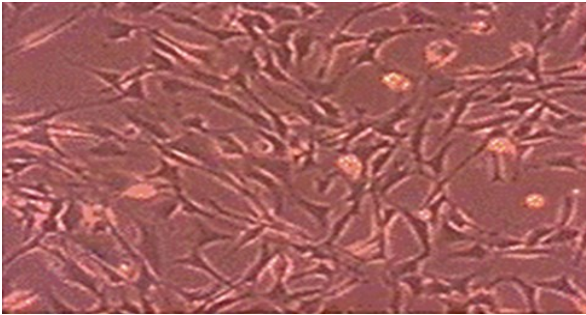


Figura 4. Subcultivo de células tipo fibroblastos.100X.

Microscopio de contraste de fases.

### 9.4 Queratinocitos subcultivados sobre equivalentes dérmicos

Los equivalentes dérmicos consisten de una matriz de colágeno tipo I, substrato tridimensional formado por una red intrincada de fibras con la consistencia de un gel flexible y transparente, donde son embebidos los fibroblastos dérmicos humanos.

1. Para preparar estos equivalentes, los fibroblastos se mezclan con el colágeno a una densidad de 5.000 células/ml, luego se deja polimerizar el colágeno por unos

minutos en la estufa de CO<sub>2</sub>. Estos equivalentes pueden ser utilizados al cabo de 3-4 días de preparados.

2. Los queratinocitos se subcultivan sobre el equivalente dérmico, sembrándolos a una alta densidad celular y se dejan alrededor de 2-3 horas. Después de transcurrido este tiempo, se le añade el medio nutritivo y se deja en condiciones sumergidas por 2-3 días hasta que se alcance la confluencia.

3. Añadir al cultivo el medio inductor de diferenciación y se coloca en una interfase aire-líquido. Las láminas epidérmicas son fijadas en Rossman durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se colocan en etanol al 70%, para posteriormente realizar las coloraciones. (ver Figura 5).

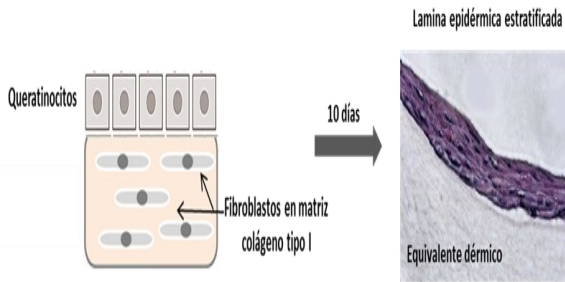


Figura 5. Producción de lámina epidérmica estratificada usando equivalente dérmico.



## 9.5 Bibliografía del capítulo

- Bello, G., Merentes, E. y Arvelo, F. (1998). Cultivo de queratinocitos humanos *in vitro*, Gaceta Médica 106 (4): 491-495.
- Eckert, R. L. (1989). Structure, Function and Differentiation of the Keratinocyte. *Physiological Reviews*, 69 1316-1345.
- Gil-Loyzaga, P. E. (2011). Cultivo de células animales y humanas. Aplicaciones en Medicina Regenerativa. Editorial Visión Libros, Madrid España.
- Merentes, E. (2001). Bioingeniería de Tejidos: Producción de piel y de cartílago MIBE 3(1): 65-68.
- Tanabe, H., Kumaga, N. y Ishida H. (1992). Clinical application of cultured epithelial grafts in plastic surgery. *Plastic. Surgery II*, 61-62.

## CAPÍTULO 10

ESTABLECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES  
EMBRIONARIAS PLURIPOTENTES**10.1 Introducción**

La generación de la diversidad celular, producto de la diferenciación, constituye uno de los procesos fundamentales del desarrollo, donde cada uno de los tipos celulares del organismo desciende de una sola célula, el óvulo fecundado. Esto implica que toda la información que se requiere para generar esta diversidad está presente en el cigoto. Actualmente, la biología del desarrollo plantea estas interrogantes acerca de cómo este mismo grupo de instrucciones genéticas puede producir diferentes tipos celulares y cómo el cigoto puede generar tantos tipos celulares diferentes.

Durante el desarrollo embrionario hay una restricción progresiva en la potencialidad de las células para generar los diferentes tipos celulares, y para estudiar la diferenciación de células embrionarias, éstas deben ser aisladas en etapas muy tempranas del desarrollo antes de que ocurra el proceso de gastrulación.

Las células embrionarias denominadas *stem cells* (ESCs) se obtienen de los blastocitos de ratón, específicamente de la masa celular interna. Éstas pueden ser establecidas en un corto periodo y son consideradas cultivos primarios que conservan características muy similares a su tejido de origen. Además mantie-

nen su estabilidad cromosomal, son capaces de mantener su estado indiferenciado después de prolongados períodos de cultivo y, finalmente, diferenciarse en estructuras complejas bajo ciertas condiciones *in vitro* (Rossant y col., 1991).

Uno de los aspectos más resaltante de estas células es que ellas son capaces de contribuir al desarrollo normal de tejidos tanto somáticos como gonadales, cuando ellas son devueltas a su medio ambiente embrionario mediante la producción de quimeras (Nagy y col., 1990, Merentes, 1993).

La investigación de células madre es un tema de gran actualidad debido a las grandes expectativas que se han generado para su utilización en la medicina del futuro, así como también su aplicación en la biología del desarrollo, creando modelos *in vitro* que permitan analizar diferentes eventos que ocurren durante el desarrollo y que son difíciles de abordar en el embrión completo. En 1998, dos grupos por separado lograron obtener líneas celulares embrionarias pluripotentes a partir de blastocistos humanos y de células germinales primordiales (Thomson y col., 1998, Shambloott y col., 1998). Estos autores utilizaron las mismas técnicas que se aplicaron en murinos. De esta manera se abrió una compuerta para la investigación del siglo XXI sobre la biología de las células madre y su potencial aplicación en la medicina regenerativa.

Se ha señalado que las células madre son solo “actores” en el mantenimiento y reparación de los tejidos, ya que responden a una multitud de señales extrínsecas del microambien-

te que las rodea y son las que van a dirigir su comportamiento.

Conociendo este nicho celular en el tejido, entonces se pueden desarrollar modelos usando células madre que permita promover la regeneración celular (Wagers, 2012).

Recientemente, con el mejoramiento de las técnicas básicas del cultivo celular y con el conocimiento de los mecanismos básicos de reprogramación celular se ha logrado obtener células madre pluripotentes inducidas (IPSC) (Mostoslavsky, 2012).

## **10.2 Materiales**

Material biológico: Establecimiento de las líneas embrionarias. Ratones de la cepa 129, los cuales tienen el pelaje gris.

- ◆ Preparación de monocapas de fibroblastos: Ratones albinos NMRI 15 días de gestación.
- ◆ Microplacas de 4 pozos
- ◆ Capilares
- ◆ Frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup>
- ◆ Pipetas de 5 y 10 mL
- ◆ Tubos de centrifuga de 15 mL
- ◆ Hemocitómetro

Medios y soluciones

Solución PBS

Medio de Dulbecco modificado (DMEM) suplementado

con 20% de suero fetal de bovino,  $10^{-4}$  M mercaptoetanol, 1 mM de aminoácidos no-esenciales.

Medio de congelación: DMEM más 20% SFB y 10% de Dimetil sulfoxido (DMSO).

Solución Tripsina al 0,025% y EDTA al 0,02% en proporción 1:3 para subcultivar las células embrionarias y fibroblastos.

## 10.3 Procedimientos

### 10.3.1 Obtención de los blastocitos

1. Aparear ratones hembras y machos, chequear el tapón vaginal en las primeras horas de la mañana, una vez visualizado se considera que los ratones tienen 0,5 días de gestación (Figura 1).



Figura 1. Visualización del tapón vaginal (flecha).

2. Sacrificar los ratones hembras con 3,5 días de gestación por dislocación cervical. Realizar una incisión media ventral seguida de un corte transversal en la piel de la línea media del abdomen, previamente impregnada con etanol al 70%. Separar la musculatura adyacente, exponiendo las vísceras, las cuales se

desplazan teniendo cuidado de no perforar los intestinos, para extraer los cuernos del útero, los cuales se transfieren a una placa de Petri con solución PBS, para luego realizar la disección de los fetos.

3. Eliminar tejidos y vasos sanguíneos y realizar un lavado haciendo fluir con una inyectadora de 1mL de medio nutritivo para recolectar los embriones. Éstos se chequean bajo la lupa para ver las condiciones y el estado en que se encuentran.

### **10.3.2 Preparación de monocapas de fibroblastos**

Se sigue la metodología señalada en el capítulo 2 del establecimiento de cultivos primarios por explantes y/o disgregación enzimática a partir de fetos de ratón. La suspensión celular de fibroblastos obtenidas al subcultivar se irradia con dosis de rayos X de 6.5 Gy y se siembra en microplacas de cultivo. Éstas pueden ser usadas hasta 4 días después de la preparación.

### **10.3.3 Cultivo de blastocitos y aislamiento de las líneas celulares embrionarias**

1. Utilizar micropipetas (preparadas de tubos capilares) para sembrar 2-3 embriones en las microplacas de cultivo que contienen los fibroblastos irradiados

2. Cultivar los blastocitos por 4-5 días en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO<sub>2</sub>, durante este tiempo los embriones se liberan de la zona pelúcida y se adhieren a la monocapa celular. Descartar el

medio nutritivo de las microplacas y lavar 2 veces con PBS (Figura 2).

3. Transferir la masa celular interna (MCI) con una micropipeta de punta fina a 50  $\mu$ L de Tripsina-EDTA y disociar en pequeños grupos de células, las cuales se siembran en las microplacas de cultivo que contienen los fibroblastos irradiados y el medio nutritivo con 10 ng/mL de factor recombinante inhibitorio de la leucemia (LIF).

4. Incubar las microplacas por 7 días en una atmosfera húmeda que contiene 5% de CO<sub>2</sub>, es importante chequear diariamente en el microscopio invertido. En el transcurso de este tiempo se pueden observar colonias de diferentes tipos: Células gigantes del trofoblasto, células tipo endodérmicas y las células madre (Figura 3). Las colonias de células madre son marcadas y se dejan por 7 días. Posteriormente se transfieren con una micropipeta capilar de punta fina a 50  $\mu$ L de Tripsina-EDTA y se disocian en células individuales que se colocan de nuevo en microplacas que contienen fibroblastos irradiados, realizando cambios de medio nutritivo cada 48 horas.

5. Los cultivos confluentes de células madre se subcultivan, manteniendo unas células *in vitro*, y otras células criopreservadas para así minimizar el tiempo de cultivo y que no ocurran alteraciones genéticas.

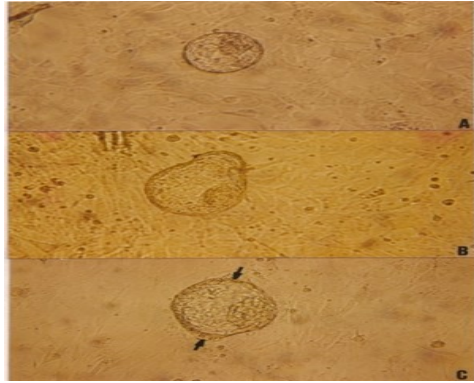


Figura 2. Desarrollo *in vitro* del blastocito de ratón A. Blastocito recién extraído sobre la monocapa de fibroblastos embrionarios (F). B. Liberación de la zona pelúcida al 1er. día de cultivo. C. Adherencia del blastocito a través de las células del trofoblasto (flecha). (Tomado de Merentes, 1993)

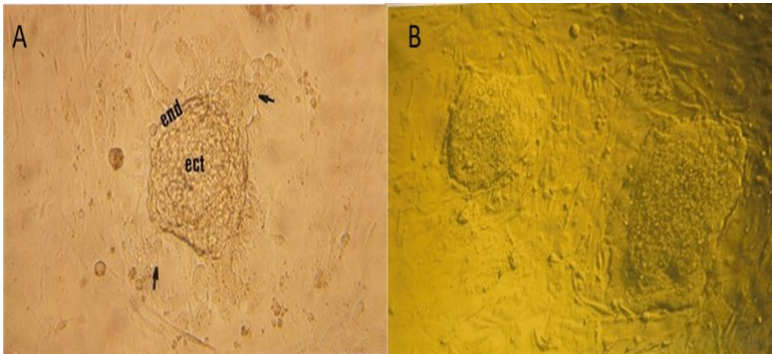


Figura 3. A. Proliferación de la masa celular interna donde se observa la capa endodérmica externa (end), el ectodermo (ect) y las células gigantes del trofoblasto (flechas) 250X. B. Colonias de células madre compuestas de células indiferenciadas. 7 días después de la disociación de la MCI. 250X. (Tomado de Merentes, 1993)



## 10.4 Bibliografía del capítulo

- Merentes, E. (1993). Establishment of embryonic stem cell lines (ES) and their developmental potentiality. Tesis doctoral. Universidad de Ciencias Eötvös Lorand, Budapest, Hungría.
- Mostoslavsky, J (2012). Concise Review: The magic act of generating induced pluripotent stem cells: many rabbits in the hat. *Stem cells* 2012:30:28–32.
- Nagy, A., Gócza, E., Merentes, E., Prideaux, V., Iványi, E., Markkula, M. y Rossant, J. (1990). Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in mouse. *Development*. 110:815-21.
- Rossant, J., Merentes, E., Gócza, E., Iványi, E. y Nagy, A. (1991). Developmental potentiality for embryonic stem cells. *Proc. Serono Symp. Preimplan. Embryo Dev.* Pag. 157-61 (Ed. B. Bavister).
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J. (1999). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 1162.
- Thompson, J.A., Itskovitz-Eldor, J, Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
- Wagers, A.J. (2012) The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell*, 10:362-369.

## CAPÍTULO II

ESTABLECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE  
MESENQUIMALES PROVENIENTES DEL  
CORDÓN UMBILICAL HUMANO**11.1 Introducción.**

Recientemente, se ha demostrado que el cordón umbilical, órgano que forma la conexión entre la placenta y el feto, también es una fuente rica en células progenitoras mesenquimales y hematopoyéticas. A nivel histológico el cordón umbilical muestra una morfología específica, presentando una vena y dos arterias rodeadas por un tejido conectivo conocido como la gelatina de Wharton. Este tejido conectivo mucoso del cordón umbilical es un tejido rico en colágeno, glicosaminoglicanos (GAGs) y proteoglicanos (Sobolewski y col, 1997). La sangre presente dentro del cordón umbilical representa una fuente alternativa de células madre hematopoyéticas, que pueden obtenerse fácilmente, aunque su cantidad es baja ( $CD34^+$  y  $CD38^-$ ) (Cardoso y col, 1993).

Mitchell y col. en el año 2003 realizaron el primer aislamiento de células mesenquimales de cordón umbilical humano por medio de la técnica del explante, y pudo determinar la presencia de varios marcadores moleculares para células madre en las células de la gelatina de Wharton, incluyendo el c-kit (CD117) y la actividad de la telomerasa. Este grupo de investigadores indujo en las células de la gelatina de Wharton la expresión del fenotipo

neural y observaron que pocas horas luego del tratamiento las células de la gelatina de Wharton desarrollaron una morfología similar a la de las células madre neurales. Estas células del cordón umbilical bajo condiciones apropiadas tienen un alto potencial de diferenciación hacia este linaje celular. Se ha podido determinar la presencia de células similares a neuronas y astrocitos en el cultivo (Merentes, 2009).

Estas células mesenquimales aisladas de la gelatina de Wharton expresan moléculas de adhesión (CD44 y CD105), marcadores de integrinas (CD29 y CD51) y marcadores de células madre mesenquimales (SH2 y SH3), pero no expresan marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45). Estas células pueden diferenciarse hacia diversos fenotipos, dentro de los cuales se pueden mencionar osteocitos, condrocitos, células musculares, entre otros (Araos, 2009 y Calderón, 2007). Recientemente se ha logrado inducir la diferenciación condrogénica temprana de estas MSCs usando campos electromagnéticos (Esposito y col., 2013).

Las células cordón umbilical humano son de naturaleza más primitiva que las MSCs de tejidos adultos, inclusive consideradas por algunos investigadores como pluripotentes. Estas propiedades las hace únicas como candidatas a la fuente de células ideal para la medicina regenerativa.

Recientemente ha sido demostrado que las células mesenquimales aisladas de la Gelatina de Wharton presentan una mayor eficiencia de sembrado que las células madre mesenqui-

males aisladas de la sangre presente en el cordón umbilical humano. Estos resultados son de relevancia clínica, ya que el procedimiento de rutina utilizado en los bancos de células madre, es el almacenamiento de la sangre presente en el cordón umbilical y el descarte del tejido (Secco y col, 2007). Se ha planteado que células madre mesenquimales derivadas de cordón umbilical de bovino también pueden ser una alternativa como fuente de células para la creación de futuros bancos de células que permita el desarrollo biotecnológico en el campo veterinario (Cardozo y col., 2012).

## **11.2 Materiales**

Material biológico: Los cordones umbilicales son obtenidos de partos naturales y cesáreas, bajo consentimiento de los pacientes y posteriormente transportados al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental, en medio F12 con antibióticos (penicilina 200 U/ml, estreptomycinina 100 µg/ml y anfotericina 4 µg/ml), a una temperatura de 4 °C .

- ◆ Frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup>
- ◆ Placas plásticas 35 mm
- ◆ Pipetas de 5 y 10 mL
- ◆ Tubos de centrifuga de 15 mL
- ◆ Hemocitómetro

Medios y soluciones

Solución PBS

Medio de cultivo DMEM y medio F12, suplementado con Suero Fetal de Bovino al 15%, antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 50 µg/ml), anfotericina 2 µg/ml. Solución Tripsina al 0,025% y EDTA al 0,02% en proporción 1:1 para subcultivar las células.

### **11.3 Procedimientos**

#### **11.3.1 Obtención y establecimiento del cultivo primario a partir de las células mesenquimales del cordón umbilical humano.**

Lavar el cordón umbilical 3 veces en solución PBS y extraer la vena y las arterias umbilicales, transferir a una placa de Petri con solución PBS y disgregar mecánicamente hasta obtener trozos de 1,5 a 4 mm, aproximadamente. Para el tejido remanente del cordón umbilical, conocido como gelatina de Wharton, se sigue la misma metodología.

Cultivo de explantes de los trozos de tejidos obtenidos a partir de arterias y de la gelatina de Wharton.

Colocarlos trozos en una placa Petri equidistantemente y luego de su adhesión a la placa, se agrega medio de cultivo DMEM y medio F12, suplementado con Suero Fetal de Bovino al 15%, antibióticos (penicilina 100 U/ml, estreptomina 50 µg/ml), anfotericina 2 µg/ml y se incuba a 37 °C con atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>.

A las 24 horas el medio es sustituido para eliminar restos celulares. Realizar cambios de medios periódicos hasta que se observe migración celular desde los explantes.

Disgregación enzimática de los trozos de tejido obtenidos a partir de la gelatina de Wharton:

1 Las muestras son incubadas con la enzima colagenasa de tipo I (1mg/ml) a 37 °C por 16 horas. Posteriormente, la suspensión celular obtenida es centrifugada por 15 minutos a 724,5 g y el taco celular obtenido es resuspendido en medio nutritivo.

2. La viabilidad celular se determina con el colorante de exclusión azul tripano, y el conteo de las células se realiza en un hemocitómetro. Las células se siembran en placas de cultivo y se colocan en una atmósfera húmeda al 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C.

### **11.3.2 Subcultivos**

Cuando el explante presenta un halo de células a su alrededor, 4 o 5 veces mayor que el tamaño del explante original (Figura 1), se realizan los subcultivos. Para esto, se separa el explante de su capa de crecimiento, realizando cortes perpendiculares por los bordes originales del explante. Luego se realiza la tripsinización de la zona de crecimiento, utilizando una mezcla de Tripsina 0,125% - EDTA 0,02%.

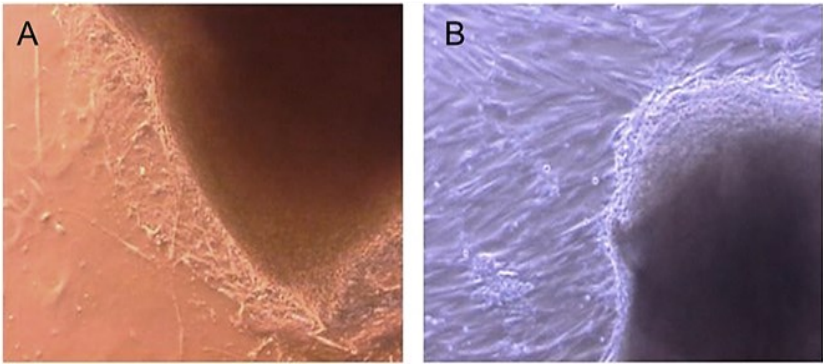


Figura 1. Explantes establecidos a partir de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano. A) Explante luego de 22 días de cultivo. Aumento 40X. Se puede observar en detalle la migración de las células de tipo fibroblastos a partir de un trozo de tejido. B) Explante luego de 27 días de cultivo, se observa una monocapa confluyente de células que crecen alrededor del trozo de tejido. Aumento 100X (Tomado de Calderón, 2007).

Las células obtenidas por medio de la técnica de la disgregación enzimática son tratadas directamente con el proceso de tripsinización mencionado anteriormente. La amplificación celular se realiza en placas de cultivo con medio nutritivo (DMEM: F12, SFB 15% y antibióticos), a 37 °C y en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células obtenidas pueden ser utilizadas para los ensayos de caracterización, proliferación y diferenciación celular (Figura 2).

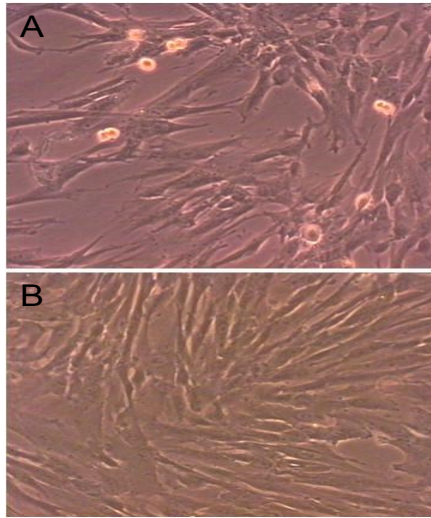


Figura 2. Cultivo en monocapa de las células de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano. A) Población de células con morfología fusiforme y células en división. 1er pasaje. B) La población mantiene su fenotipo celular. 10mo pasaje Contraste de fases. 200X. (Tomado de Merentes, 2009)

#### 11.4 Bibliografía del capítulo

- Araos, C. (2009). Cultivo de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano. Potencialidad osteocondrogénica. Licenciatura en Biología. Universidad Central de Venezuela.
- Calderón, D. (2007). Establecimiento del cultivo de células mesenquimales del cordón umbilical humano y estudio de su potencialidad de diferenciación *in vitro*. Licenciatura en Biología. Universidad de Carabobo.



- Cardoso, A., Li, M., Batard, P., Hatzfeld, A., Brown, E., Levesque, J., Sookdeo, H., Panterne, P., Sansilvestri, P., Clark, S. y Hatzfeld, J. (1993). Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 8707-11.
- Cardoso, T. C., Ferrari, H. F., García, A. F., Novais, J. B., Silva-Frade, C., Ferrarezi, M. C., Andrade, A.L., Gameiro, R. (2012). Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. *BMC Biotechnology* 2012 12:18.
- Esposito, M., Lucariello, A., Costanzo, C., Fiumarella, A., Giannini, A., Riccardi, G., Riccio, I. (2013). Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells, WJ-MSCs, into chondrogenic cells in the presence of pulsed electromagnetic fields. *In Vivo.* 27 (4):495-500.
- Merentes, E. (2009). Fuentes de obtención de células madre mesenquimales. Potencialidad de diferenciación *in vitro*. Trabajo de ascenso a Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

- Mitchell, K., Weiss, M., Mitchell, B., Martin, P., Davis, D., Morales, L, Helwig, B., Beerenstrauch, M, Abou-Easa, K., Hildreth, T. y Troyer, D. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells*. 21:50-60.
- Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N., Fogaça, L., Cerqueira, A., Carvalho, M., Jazedje, T., Okamoto, O., Muotri, A., Zatz, M. (2007). Multipotent Stem Cells from Umbilical Cord: Cord is Richer than Blood! *Stem Cell*, 26:146-150.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J. (1999). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 1162.