

**AISLAMIENTO E IMPLEMENTACIÓN DE UN CULTIVO PRIMARIO DE
QUERATINOCITOS DE MAMÍFERO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS EN
CIENCIAS BÁSICA Y APLICADA**

MARÍA CAMILA MORALES NUÑEZ

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

**AISLAMIENTO E IMPLEMENTACIÓN DE UN CULTIVO PRIMARIO DE
QUERATINOCITOS DE MAMÍFERO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTUDIOS EN
CIENCIAS BÁSICA Y APLICADA**

MARÍA CAMILA MORALES NUÑEZ

PROYECTO DE GRADO

**TUTOR: JULIÁN ARBEY GONZÁLEZ OSPINA M.Sc
ASESORA: JULIANA RENGIFO GOMEZ Ph.D**

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
PROGRAMA DE QUÍMICA FARMACÉUTICA
SANTIAGO DE CALI, VALLE
2014**

Tabla de contenido

RESUMEN DEL PROYECTO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO	5
2.1. Planteamiento del problema de investigación y justificación:	5
2.2. Marco teórico y Estado del arte	6
2.2.1. Tejido como organización celular.....	6
2.2.2. Cultivo <i>in vitro</i> celular	8
2.2.3. Revisión histórica sobre el cultivo <i>in vitro</i> de queratinocitos.....	11
2.2.4. Ingeniería de tejidos	12
2.2.5. Ensayos <i>in vitro</i>	14
2.3. Objetivos.....	15
2.3.1. Objetivo General.....	15
2.3.2. Objetivos Específicos	15
2.4. Metodología utilizada.....	15
2.5. Resultados y discusión	25
2.6. Conclusiones	35
2.7. Recomendaciones	36
2.8. Bibliografía.....	36
3. ANEXOS.....	40
ANEXO 1. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	40
ANEXO 2: PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS, EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE QUERATINOCITOS A PARTIR DE UNA MUESTRA DE TEJIDO.....	42
ANEXO 3: APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA PROYECTO “EVALUACIÓN PROTEÓMICA Y FUNCIONAL DE LOS FENÓMENOS DE GLICOSILACIÓN TIPO O-GLCNAC Y SUS IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PRECONDICIONAMIENTO, ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN CEREBRAL”	51

Índice de gráficos

Gráfico 1 Conteo celular días 1 y 2.....28
Gráfico 2 Porcentaje de viabilidad de la población celular obtenida.28

Índice de Ilustraciones

Ilustración 1 Estructura de la piel (recurso en red).....	6
Ilustración 2 Estratificación de la piel (recurso en red).....	7
Ilustración 3 Esquema de cortes en rata Wistar.....	18
Ilustración 4 Incubación para la disgregación enzimática de la muestra (fuente propia).....	20
Ilustración 5 incubación de tejido remanente tras disgregación enzimática (fuente propia).....	21
Ilustración 6 Recubrimientos de platos de cultivo con matriz polimérica (fuente propia).....	22
Ilustración 7 Cultivo por explante, vista macrosópica.	26
Ilustración 8 Día 1 de cultivo celular (objetivo 10x).....	30
Ilustración 9 Día 3 de cultivo celular (objetivo 10x).....	31
Ilustración 10 Día 5 de cultivo celular (objetivo 10x).....	32
Ilustración 11 Cultivos celulares contaminados microbiológicamente.....	33

RESUMEN DEL PROYECTO

Palabras claves: *queratinocitos, cultivo celular in-vitro, cultivo celular primario, biología celular, metodología.*

El presente trabajo de investigación se enfocará en el establecimiento de una metodología para el cultivo *in-vitro* de queratinocitos de mamífero con el fin de obtener un cultivo primario, que permita utilizarse a futuro en la investigación básica experimental y en aplicaciones clínicas, esta última referenciada principalmente a la ingeniería de tejidos, la cual constituye un área de investigación que cada día va en ascenso.

Los queratinocitos son las células mayoritarias en la epidermis, capa superficial de la piel; estas células junto con los melanocitos son las únicas que se pueden cultivar *in vitro*, además de esto, los queratinocitos hacen parte de los pocos tipos de células que pueden diferenciarse y proliferar en diversos tipos de cultivo *in vitro*, lo cual constituye una gran ventaja a la hora de proponer y establecer nuevas metodologías de cultivo para este tipo específico de células (Junqueira & Carneiro, 2005)

Aunque los cultivos, líneas y bancos celulares son de gran utilidad a nivel científico en cuanto a su utilización como alternativas validadas para evaluar la seguridad y eficacia de determinadas sustancias, éstos no reemplazan los ensayos realizados en biomodelos, dada la alta complejidad que se presenta en estos últimos. No obstante, son una herramienta relevante para efectuar ensayos a pequeña escala cuyos resultados dan indicios sobre las características de una sustancia determinada.

Partiendo del tratamiento enzimático y/o mecánico al que se sometieron las muestras de tejido epitelial obtenidas, se obtuvieron una serie de suspensiones celulares. Aunque durante el proceso experimental se presentaron inconvenientes, se logró implementar un protocolo de extracción y cultivo de células queratinocíticas, a partir del cual se pudo evidenciar el crecimiento de pequeñas colonias de queratinocitos de mamífero identificadas morfológicamente mediante microscopía óptica.

ABSTRACT

Key words: *keratinocyte*, *in vitro cell culture*, primary cell culture, cell biology, methodology.

This research will focus on the development of a methodology for *in-vitro* culture of mammal keratinocytes in order to obtain a primary culture, which allows its use in future experimental basic research and clinical applications, mainly referenced to tissue engineering, which is an area of research that is increasing every day.

Keratinocytes are the principal cells on the epidermis, skins most superficial layer. This cells with melanocytes are the only ones that can grow on *in-vitro* culture, in addition to this, keratinocytes are one of the few types of cells that can proliferate and differentiate into various types of *in-vitro* culture, which is a great advantage to when proposing new methodologies and establish cultivation for this specific cell type (Junqueira & Carneiro , 2005).

Although cell cultures, cell banks and cell lines are useful to the scientific level as validated their use as alternatives to evaluate the safety and efficacy of certain substances, these do not replace trials in biomodels, given the high complexity involved in these last. Although this, they are a significant tool to implement small-scale tests whose results can give evidence of the characteristics of a particular substance.

Starting from the enzymatic and mechanical treatment that the epithelial tissue samples obtained were subjected, a series of cell suspensions were obtained. Although during the experimental process were presented disadvantages, was achieved the implementation of a extraction and keratinocyte cell culture protocol, from which was possible to demonstrate the growth of small mammalian keratinocyte colonies morphologically identified by light microscopy.

1. INTRODUCCIÓN

Desde la década de 1970-1980 se conocen los primeros estudios sobre el cultivo y mantenimiento de células queratinocíticas a partir del trabajo investigativo de Rheinwald & Green sobre el cultivo de colonias de queratinocitos a partir de células individuales. A partir del conocimiento obtenido a través de estos estudios iniciales y con la disposición de tecnología que se tiene actualmente, se genera la oportunidad de optimizar las diversas técnicas y metodologías para obtener cultivos celulares de una forma más eficaz y certera.

Este trabajo se enfoca en la implementación de un protocolo de extracción y cultivo de queratinocitos, partiendo del tratamiento mecánico-enzimático de una muestra de tejido epidérmico de mamífero, y así obtener el mayor número de células vivas posibles para establecer un cultivo primario. A través de dicha implementación, fue posible evidenciar varios aspectos claves con respecto al procesamiento de la muestra y al crecimiento de este tipo celular.

Se pretende que este trabajo sirva como punto de partida para optimizar el uso de cultivos celulares como una metodología de apoyo para la investigación realizada a nivel pre-clínico. Así mismo y sin reducir la aplicabilidad de este trabajo a ensayos *in vitro*, la utilización del concepto de cultivo de células epidérmicas en un ámbito clínico, resulta un punto de partida para el establecimiento de terapia con análogos epidérmicos.

El problema de la investigación se deriva de un aspecto fundamental en los procesos investigativos en el área farmacéutica actual, y es la necesidad de tener diferentes metodologías alternativas al uso de biomodelos animales, para realizar una evaluación certera y eficaz de la seguridad de una sustancia determinada. Históricamente, dichas evaluaciones se han realizado en organismos superiores como lo son los biomodelos, derivando en un sinnúmero de dilemas morales y bioéticos, esto conlleva la búsqueda de más métodos que sirvan de apoyo para este tipo de ensayos, a fin de mejorarlos ética e investigativamente.

La metodología utilizada en este trabajo engloba los procedimientos fundamentales del cultivo celular (Marques, Teixeira & Estilita, 2008); consiste en primera instancia en el tratamiento mecánico y enzimático de una muestra de tejido epitelial vivo, con el fin de obtener células disgregadas capaces de cultivarse en un medio de cultivo que les aporte los nutrientes y factores de crecimiento necesarios para su desarrollo (Moraes, Zucatelli & Torres, 2008). A su vez, por las características de estas células, su cultivo se realiza sobre una matriz polimérica que le permite a las células fijarse a un sustrato y formar colonias (Ebling & Eady, 1997)

Basándose en la morfología de los diferentes tipos celulares que pueden

encontrarse en este epitelio, se puede realizar una identificación visual del tipo de célula correspondiente a queratinocitos epiteliales, siendo esta una forma sencilla y rápida de realizar la identificación.

El establecimiento de cultivos primarios de estas células constituye por un lado, un elemento clave en la investigación preclínica, si se habla de sustancias con algún tipo de acción farmacológica, y por otro en la investigación básica como un punto de partida para realizar diferentes ensayos, como los de citotoxicidad, entre otros (EURL-ECVAM. S.f). Por tal razón, la importancia de este trabajo radica en establecer e implementar un protocolo a partir del cual se garantice la obtención de un cultivo primario de queratinocitos, y que a su vez estas células se conviertan en una herramienta para el desarrollo de diversas investigaciones.

2. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

2.1. Planteamiento del problema de investigación y justificación:

En la actualidad, la necesidad de evaluar las características biológicas y la seguridad de diversas sustancias ya sean fármacos o ingredientes activos utilizados en medicamentos y cosméticos, es primordial y obligatorio al momento de su desarrollo y producción, los cuales tradicionalmente se han llevado a cabo en biomodelos animales.

Dicha necesidad de evaluar no sólo las características biológicas sino también la seguridad y eficacia de diversas moléculas, ha supuesto uno de los principales promotores para la implementación de modelos *in-vitro*: cultivos primarios, líneas celulares o epitelios reconstituidos; como una aproximación biológica a los biomodelos animales, permitiendo reducir su escala y el número de animales a emplear en estos ensayos, lo cual se considera mejor desde una óptica ética.

Los cultivos primarios y/o líneas celulares por ende serían un elemento clave en dichos ensayos, razón por la cual es importante definir los métodos y requerimientos necesarios para obtener un protocolo definido de obtención de los mismos. Este proyecto se centra en el diseño de un protocolo de obtención de un cultivo primario celular de queratinocitos de mamífero, células mayoritarias en la capa superficial de la piel.

La importancia del cultivo celular de queratinocitos radica en su utilización futura para realizar ensayos *in vitro* de citotoxicidad, irritabilidad y sensibilidad dérmica, además en caso de que pueda utilizarse en co-cultivo con otras líneas celulares sobre matrices de tipo polimérico, se pueden obtener análogos epidérmicos con aplicabilidad en el área médica.

2.2. Marco teórico y Estado del arte

2.2.1. Tejido como organización celular

Las células que conforman un organismo pueden existir de forma unitaria, tal como los eritrocitos o leucocitos, pero también pueden existir formando asociaciones tridimensionales, denominadas tejidos; las células que conforman un tejido tienen características similares, las cuales les permiten cumplir con funciones semejantes y a su vez complementarias. Morfológicamente pueden identificarse 4 tipos de tejido, denominados: epitelial, conectivo, muscular y nervioso (Thews, Mutschler & Vaupel, 1983).

El órgano de mayor extensión en el cuerpo humano es la piel, éste cumple con diversas funciones tales como servir de barrera para proteger al organismo de posibles daños mecánicos y agentes patógenos que provengan del exterior. También tiene una función sensorial efectuada gracias a diversos tipos de células relacionadas directamente con el sistema nervioso (Krause, 2005).

Como órgano, la piel se organiza en tres capas epiteliales diferenciadas, según sea su ubicación se tienen: hipodermis, dermis y epidermis, siendo la capa más profunda la hipodermis. La ilustración 1, permite la visualización de las diferentes capas de la piel, y a su vez da un vistazo de la morfología que tienen las células en la capa más superficial, es decir la epidermis.

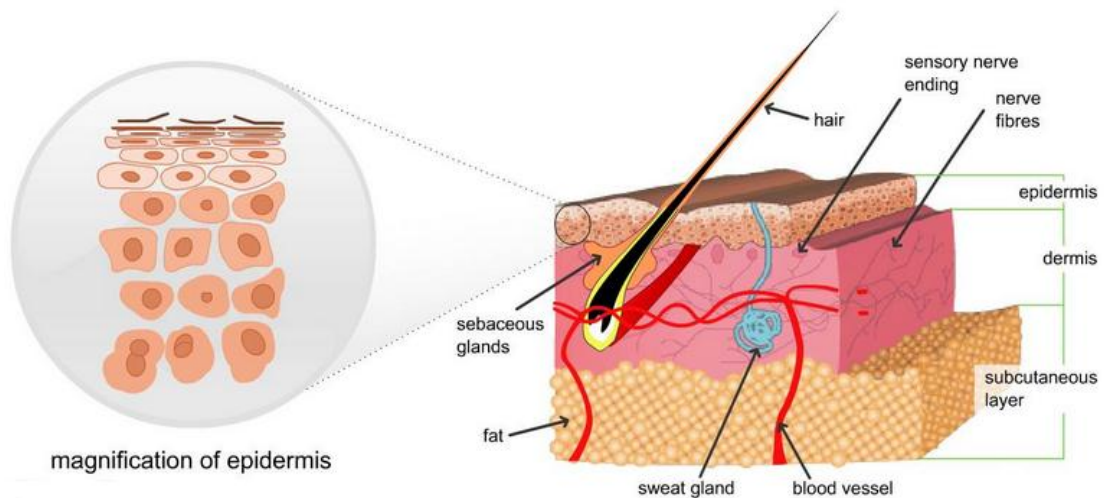


Ilustración 1 Estructura de la piel (recurso en red).

La epidermis, capa superficial de la piel, es un epitelio estratificado queratinizado, conformado en su gran mayoría por queratinocitos (Aasen, T. & Izpisúa Belmonte, J, 2010). Aunque los queratinocitos son el tipo celular predominante en este tejido, también pueden encontrarse otros tipos de células como los melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel.

Los queratinocitos son células productoras de queratina, éstas se originan en la capa basal de la epidermis pero también se encuentran presentes en las demás capas que conforman este tejido: estrato espinoso, estrato granuloso y estrato lúcido (Ver ilustración 2). Estas células cumplen con varias funciones fundamentales: en primer lugar se encuentra la producción de queratina, la conformación de una barrera impermeable de protección para el organismo, y por último se han descrito funciones de tipo inmunológico (Thews, Mutschler & Vaupel, 1983).

Los queratinocitos que se encuentran en la capa basal son células proliferantes a una tasa de división baja (Gragnani et al, 2003). Las células que componen esta capa van sufriendo un proceso de diferenciación desde el estrato basal al estrato córneo, capa en donde finalmente las células se denominan corneocitos, dado que han perdido sus núcleos y se conforman exclusivamente de queratina. Dicho proceso de diferenciación tiene una duración de 3 a 4 semanas.

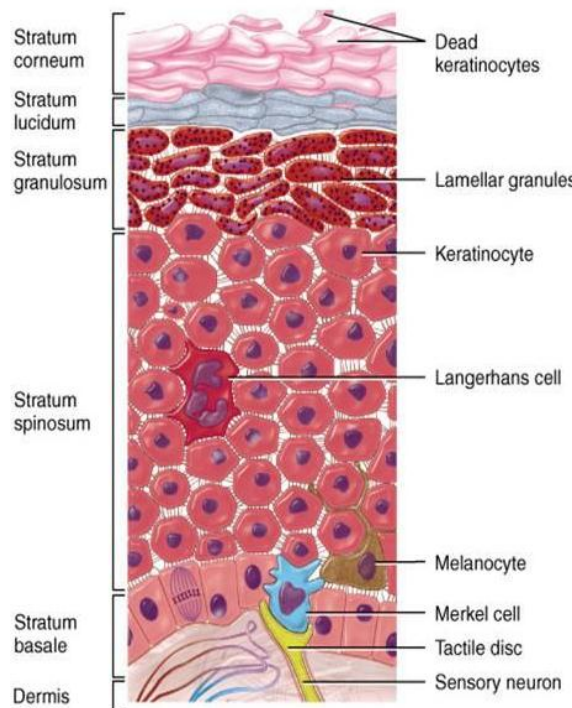


Ilustración 2 Estratificación de la piel (recurso en red).

En función del nivel de queratinización que los queratinocitos adquieran en cada capa epidérmica, se va a dar la expresión de diversas citoqueratinas, filamentos de queratina encontrados en el citoesqueleto de diversas células de tipo epitelial. Se clasifican en ácidas y básicas, y dependiendo del tipo de epitelio en estudio se van a expresar determinadas citoqueratinas, las cuales van a permitir la caracterización de los queratinocitos mediante ensayos de inmunohistoquímica. (Ross & Pawlina, 2013)

El cultivo de queratinocitos ha sido utilizado en los últimos años en el tratamiento de diversas afecciones en la piel causadas por quemaduras, ulceraciones o enfermedades que afecten la continuidad de la piel (Takagi, R. et al, 2011). Por esto, el conocimiento de su proceso de diferenciación es un punto crítico para el establecimiento de un cultivo *in vitro* de este tipo celular. Es así que el uso de cultivos de queratinocitos sobre matrices extracelulares de tipo polimérico como análogos epidérmicos para el tratamiento de diversas afecciones constituye uno de los motores para la investigación en la ingeniería de tejidos.

2.2.2. Cultivo *in vitro* celular

El cultivo *in vitro* se considera una de las principales herramientas que se tiene hoy en día para la evaluación y el estudio de diversos fenómenos que se dan al interior de los organismos. Este consiste en una serie de técnicas y procedimientos experimentales en los cuales se aíslan y mantienen diversos tipos celulares, tanto vegetales como animales.

El crecimiento de células en el laboratorio implica el control de todas o la gran mayoría de variables que pueden influir en el crecimiento y proliferación de un determinado tipo celular; una de las características esenciales del cultivo *in vitro* es el manejo de asepsia en cuanto a los materiales que estén en contacto con las células en estudio.

Dentro del marco del cultivo *in vitro* de células animales, se encuentran diversos tipos de cultivos a partir de los cuales se pueden obtener las células en estudio. Por un lado se tiene el cultivo primario, en el cual las células se obtienen a partir de explantes provenientes de órganos o tejidos; por otro lado, el cultivo de células secundarias o subcultivadas, consiste en aquellas células que se obtienen a partir de un cultivo de células primarias. El objetivo de realizar un subcultivo a partir de un cultivo primario es el de brindarle espacio a las células estudiadas para que se dé su crecimiento y proliferación de forma continua, puesto que una alta densidad celular en el cultivo puede inducir el mecanismo de muerte celular por apoptosis. (Marques, Teixeira & Estilita, 2008).

Tras realizar procesos de transformación a las células pertenecientes al cultivo

primario, se obtienen células morfológicamente diferentes a las del tejido u órganos de origen, a este tipo de cultivo celular se le denomina línea celular. Éstas pueden dividirse en dos tipos claramente diferenciados, por un lado las de proliferación de tipo finito, cuando el número de generaciones producto de la proliferación llega hasta cierto límite y luego decae; o de tipo continuo, cuando la proliferación de las células se da de forma continua con la posibilidad de establecer a partir de éstas bancos celulares. (Marques, Teixeira & Estilita, 2008).

Cabe resaltar que dadas las características tanto morfológicas como fisiológicas de los queratinocitos, este tipo celular puede obtenerse bajo cualquier tipo de cultivo *in vitro* animal de los que han sido descritos en la literatura científica, razón por la cual diversos grupos de investigación han incursionado en el aislamiento, crecimiento y cultivo de queratinocitos para obtener bancos celulares o análogos epidérmicos obtenidos sobre matrices poliméricas.

Uno de los factores controlados en el cultivo *in-vitro* de células animales son los componentes que constituyen el medio sobre el cual se va a dar el crecimiento y proliferación de los tipos celulares en estudio.

Dado que se debe proveer a las células en crecimiento todos los requerimientos nutricionales para poder llevar a cabo procesos metabólicos y de división celular principalmente, el medio de cultivo utilizado deberá contener ciertos componentes básicos. Es importante mencionar que dichos componentes principales son similares para cualquier tipo de célula que quiera cultivarse de forma *in vitro*, la diferencia esencial la va a ejercer el tipo de factor de crecimiento que se incorpore en el cultivo (Moraes, Zucatelli & Torres, 2008).

En primer lugar se debe contar con una fuente de aminoácidos, componente clave para la síntesis proteica y de nucleótidos. Los productos de estas reacciones de biosíntesis revisten gran importancia en el proceso de división celular, más específicamente en la interfase, etapa del ciclo celular en donde la célula sintetiza todos los materiales necesarios que requiere para dividirse y crecer, como lo son las proteínas, lípidos y otras moléculas de importancia biológica (Solomon, Berg, & Martin, 2013). Además deben incluirse sales inorgánicas, azúcares como fuente de carbono, vitaminas, lípidos, ácidos orgánicos, hormonas, entre otros (Moraes, Zucatelli & Torres, 2008). El objetivo de emplear un medio con una composición compleja viene dado por los requerimientos específicos de las células y así lograr simular con una alta correspondencia, las condiciones en las que se encuentran las células al interior de un organismo.

Como se mencionó anteriormente, los componentes del medio van a tender a ser similares entre los diferentes tipos de células, a diferencia de los factores de crecimiento que deban adicionarse al medio. Los factores de crecimiento son péptidos de bajo peso molecular que como su nombre lo indica, van a regular los procesos de crecimiento y proliferación celular haciendo especial énfasis en las

características fisiológicas y morfológicas de las células cultivadas (Moraes, Zucatelli & Torres, 2008).

Existen diversos tipos de factores de crecimiento tales como el FGF de sus siglas en inglés (factor de crecimiento de fibroblastos), EGF (factor de crecimiento epidérmico), NGF (factor de crecimiento nervioso), TGF (factor de crecimiento de transformación), IGF-1 e IGF-2 (factores homólogos de insulina 1 y 2) (Moraes, Zucatelli & Torres, 2008). Dado que las células a emplear específicamente corresponden al tejido epitelial, el factor de crecimiento de relevancia va a ser el EGF, ya que causa una inhibición en el proceso de diferenciación celular e incrementa el tiempo de vida de queratinocitos cultivados *in-vitro*, (Ponec, Weerheim, Kempenaar, & Boonstra, 1988) aspecto que deberá ser tomado en cuenta al momento del diseño de la metodología de cultivo *in vitro* a emplearse. Es importante resaltar que aunque el EGF es el factor de crecimiento más importante, también se han descrito diversos ensayos en los cuales se incluyen factores como IGF-1 e IGF-2 (Sun HY, Zhou GM, Wang Q, Lin XC & Xu B, 2013).

Factores abióticos como el pH del medio, la cantidad de luz incidente, el porcentaje de humedad, la cantidad de oxígeno y dióxido de carbono, entre otros, juegan un papel secundario en el crecimiento y mantenimiento de cultivos celulares en el laboratorio, razón por la cual, a pesar de que son variables que al momento de establecer los parámetros de medición deben definirse estrictamente, factores como la composición del medio van a tomar una mayor relevancia al momento de analizar el comportamiento dado por un tipo celular específico.

Una vez establecidos todos los factores que tienen influencia sobre el crecimiento y proliferación celular, se puede llevar a cabo el proceso como tal de cultivo *in vitro* del tipo celular requerido; se debe prever que cada tipo celular tiene tasas de crecimiento diferentes, por lo cual la estimación de un tiempo promedio de crecimiento puede llegar a ser errónea.

La obtención de cultivos, líneas o bancos celulares tiene diversas aplicaciones en el área científica. Tras diversos avances tecnológicos, se han logrado obtener diversas líneas celulares que son utilizadas actualmente para la producción de proteínas recombinantes, uno de estos ejemplos lo constituye la producción de eritropoyetina humana recombinante a partir de la línea celular CHO (Chinese Hamster Ovary) (Marques, Teixeira & Estilita, 2008).

Actualmente uno de los mayores aplicativos para las líneas y bancos celulares, se centra en el test de sustancias farmacológicas de un grado alto de toxicidad, tal como los medicamentos inmunosupresores. Se pueden emplear para el ensayo de citotoxicidad mediante ensayo colorimétrico de reducción de MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), captación del rojo neutro o enlazamiento al azul de kenacid. (Marques, Teixeira & Estilita, 2008)

Mediante ensayos *in vitro*, las líneas celulares de tipo epidérmico también pueden emplearse para ensayos de irritabilidad y sensibilización dérmica, disminuyendo bajo ciertos parámetros, la escala del biomodelo animal a emplear.

2.2.3. Revisión histórica sobre el cultivo *in vitro* de queratinocitos

En las décadas que comprenden el periodo de 1960 y 1990 se realizaron los primeros estudios científicos sobre el aislamiento y crecimiento de células queratinocíticas a nivel de cultivo *in vitro*.

En la década de 1960 se presentan una variedad considerable de estudios sobre el crecimiento *in vitro* de células epiteliales. Por un lado, en 1964 y 1967 se citan los estudios realizados sobre el crecimiento de este tipo celular por explante a partir de un órgano o tejido, pero no es sino hasta inicios de la década de 1970 cuando se describen los ensayos en el cultivo *in vitro* en forma de monocapa a partir de queratinocitos disgregados (Rheinwald & Green, 1975).

A partir de los estudios realizados durante el periodo comprendido entre 1960 y 1970, se identificaron las diferentes limitaciones y observaciones sobre el crecimiento *in vitro* de queratinocitos, en donde se concluyó sobre el papel vital que tienen las condiciones de cultivo en el mantenimiento del mismo, así como la relación existente entre los fibroblastos y los queratinocitos, siendo obligatoria la presencia de estos para un correcto desarrollo de los queratinocitos (Rheinwald & Green, 1975).

Los estudios sobre crecimiento de células queratinocíticas descritos hasta la década de 1970 implicaban como fuente de muestra, piel de distintas áreas del cuerpo. En los inicios de la década de 1980, dos estudios relevantes sobre cultivo *in vitro* de queratinocitos aparecieron: en 1981 el estudio realizado por Weterings *et al*, evidenció la posibilidad de generar un cultivo de queratinocitos por explante provenientes del folículo piloso humano, y dando continuidad y complementariedad al mismo, el estudio de Wells logró establecer una técnica para el establecimiento de cultivos *in vitro* de células epiteliales disgregadas a partir del folículo piloso humano (Weterings *et al*, 1981; Wells, 1982).

Estudios posteriores a los de Weterings *et al* y Wells condujeron a la búsqueda de la optimización de las técnicas descritas en sus respectivos estudios, tal como evidencia el artículo publicado sobre el estudio de Limat & Noser titulado: "Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicle", en donde se describe la metodología involucrada en la disgregación enzimática, subcultivo y criopreservación de queratinocitos de una muestra de folículo piloso humano proveniente del cuero cabelludo (Limat & Noser, 1986).

Para el periodo entre finales de 1980 y la década de 1990, los estudios científicos conociendo las diversas metodologías de cultivo de queratinocitos, se centraron en el estudio sobre su función al interior de la piel. El estudio llevado a cabo por Eckert & Rorke, brinda información sobre aspectos moleculares involucrados en la expresión de queratina e involucrina, dos proteínas claves durante el desarrollo epidérmico (Eckert & Rorke, 1989).

Los estudios realizados en la década de 1960 determinaron que existía una relación intrínseca entre los queratinocitos y fibroblastos, siendo estos últimos casi necesarios al momento de establecer un cultivo de queratinocitos. Para el año 1999 se retoma la investigación encaminada al establecimiento de metodologías de cultivo *in vitro* de queratinocitos, centrada en la necesidad de establecer el cultivo sin la presencia de fibroblastos. Prignano *et al* en el año 1999 publica un estudio en donde realiza el cultivo de queratinocitos sin una capa celular compuesta de fibroblastos, a partir del cual se evidencia una pérdida progresiva de la diferenciación de los queratinocitos, conllevando así a establecer como necesidad la inclusión de factores de crecimiento, hormonas y sustratos de adhesión, entre otros para así evitar la pérdida de diferenciación celular (Prignano *et al*, 1999).

En la actualidad, los estudios sobre cultivo *in vitro* de queratinocitos se han enfocado en el desarrollo del cultivo sobre una amplia variedad de matrices poliméricas tanto sintéticas, como naturales. En los estudios realizados desde el año 2000 hasta hoy día, se han logrado cultivar queratinocitos sobre mallas poliméricas compuestas de colágeno, fibrina, laminina, entre otros (Arvelo, 2007).

En Colombia en el año 2008, se publicó un estudio enfocado al cultivo *in vitro* de tejidos en el cual se describe la metodología empleada para el cultivo de queratinocitos sobre submucosa intestinal porcina, el cual no solo involucra el campo de investigación básica sobre modelos *in vitro*, sino también muestra la aplicabilidad de esta área en la ingeniería de tejidos, ampliando el alcance que pueden llegar a tener este tipo de técnicas experimentales (Amortegui & Ramirez, 2008).

2.2.4. Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos constituye una disciplina en constante desarrollo dada su relevancia en el campo médico y biológico (Marques, Teixeira & Estilita, 2008). Uno de los grandes promotores ha constituido el desarrollo de tejidos artificiales como medida terapéutica en una gran variedad de lesiones.

El concepto de la ingeniería de tejidos involucra más que una técnica o un procedimiento, engloba los procesos de creación de tejidos en el laboratorio, pero

también su reparación y regeneración pudiendo ser esta *in vitro* y/o *in situ*. Cual fuese el caso, esta área del conocimiento aplicado tiene como objetivo fortalecer la medicina regenerativa por cuanto se puedan tener alternativas en casos clínicos de fallas de órganos y tejidos.

Las lesiones en la epidermis causadas por enfermedades o por quemaduras constituyen una amenaza al organismo en cuanto éste se encuentra expuesto a los contaminantes del exterior. El reconocer que dichas heridas necesitarían de una barrera frente al exterior dio lugar a la necesidad de diseñar injertos artificiales que redujeran la exposición al exterior para un proceso de curación mucho más efectivo.

No todos los injertos son iguales así sean del mismo tejido u órgano. En la literatura pueden distinguirse dos tipos de injertos: los autoinjertos, que como su misma etiología lo indica, son injertos que provienen de la misma persona, es decir, un tejido de una parte de su cuerpo es transplantado a otra parte de su cuerpo; y los aloinjertos, en donde el injerto proviene de otra persona (Horch, Kopp, Kneser, Beier & Bach, 2005)

La introducción de los injertos de piel se dio alrededor del año 1871, trasplantando piel sana de una persona a otra; los avances científicos han permitido el desarrollo de matrices poliméricas que en conjunto con líneas celulares específicas, permitan obtener análogos de tejido. (Horch, Kopp, Kneser, Beier & Bach, 2005)

La utilización de células para la ingeniería de tejidos requiere no sólo obtener las células específicas del tejido a reconstruir, sino también los soportes que simulen la matriz extracelular a modo que tengan un andamio sobre el cual sustentarse (Buttery & Shakesheff, 2008). Las diversas matrices tienen un papel relevante tanto en la adecuación final del injerto con el tejido, como en el crecimiento celular que se da bajo condiciones de laboratorio.

La ingeniería de tejidos aplicada específicamente a la piel ofrece una alternativa terapéutica a aquellas personas que tienen lesiones extendidas en este tejido, como en el caso de las quemaduras. El objetivo de la medicina regenerativa de la mano con la ingeniería de tejidos, es proveer epitelios reconstituidos que sirvan como barrera entre el entorno y el organismo, a fin de disminuir al máximo la probabilidad de infecciones y agresiones por parte de otros factores químicos, biológicos y/o físicos.

Los estudios llevados a cabo por Rheinwald & Green sobre cultivo *in vitro* de queratinocitos, establecen una pauta en las metodologías experimentales para la obtención de láminas epiteliales sobre distintos tipos de matrices poliméricas. Esta alternativa puede emplearse en la terapia para el tratamiento de afecciones que se presenten en la piel (Rheinwald & Green, 1975).

En Colombia esta disciplina no se ha quedado relegada, y diversos grupos de investigación han estandarizado diversos protocolos para elaborar matrices poliméricas en conjunto con cultivos celulares, que sirvan como injertos artificiales en el tratamiento de lesiones en la piel, tal es el caso de las diversas investigaciones que se llevan a cabo en la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, en donde se describen los métodos empleados para obtener la matriz polimérica y en investigaciones posteriores, los métodos empleados para obtener como tal los análogos epidérmicos (Perez, Doncel, Roa & Fontanilla, 2001).

2.2.5. Ensayos *in vitro*

Con el avance de la ciencia en el descubrimiento de nuevas moléculas y productos para el ser humano, los ensayos *in vitro* son considerados una herramienta para poder verificar la viabilidad y seguridad de dichos compuestos. Actualmente, la normatividad con respecto a los ensayos en animales se está volviendo cada vez más estricta, hasta el punto en el que en ciertas partes del mundo la experimentación para testear productos en animales está completamente prohibida.

Es importante resaltar que aunque los ensayos *in vitro* presuponen una alternativa a los ensayos *in vivo*, estos primeros no pueden reemplazar a los ensayos *in vivo* dado la complejidad fisiológica que implica el estudiar un organismo completo. Sabiendo esto, se pueden tomar entonces los ensayos *in vitro* como aproximaciones que pueden validarse para la evaluación de la toxicidad y eficacia de diversos compuestos.

Los ensayos *in vitro* contemplan tanto aquellas pruebas que se pueden realizar con cultivos primarios celulares, como aquellas que incluyen órganos y epitelios reconstituidos. Entidades como la EURL – ECVAM (por sus siglas en inglés: European Union Reference Laboratory for alternatives to animal testing - the European Centre for the Validation of Alternative Methods) se encargan de la validación de todos los métodos que pueden reducir, optimizar o reemplazar el uso de animales para verificar la seguridad y eficacia de diversos compuestos químicos, biológicos y vacunas.

2.3. Objetivos

2.3.1. Objetivo General

Estandarizar un protocolo para obtener láminas de queratinocitos sobre mallas poliméricas de colágeno a fin de establecer un banco celular para el desarrollo de actividades en ciencias básicas.

2.3.2. Objetivos Específicos

- Analizar y determinar las condiciones óptimas de crecimiento celular a partir de la revisión bibliográfica, que permitan establecer un crecimiento estable de queratinocitos para ser cultivados sobre matrices de colágeno.
- Implementar un plan para la obtención de una fuente de muestras de tejido mamífero viable, a través de una entidad privada o donación, con el fin de establecer los cultivos celulares.
- Estimar la viabilidad del cultivo celular establecido como un indicador del mantenimiento del cultivo in vitro.

2.4. Metodología utilizada

1- Toma de muestra:

Ensayo con humano:

A fin de obtener una fuente de muestra de tejido, el primer paso es la redacción de un consentimiento informado, documento que avala la toma de muestra de tejido y su posterior uso. En dicho documento se consignaron todos los aspectos de la investigación concernientes al objetivo de la investigación, los riesgos a los cuales se vería expuesto el voluntario y los cuidados que debería tener tras realizar el procedimiento.

Se tomó para el estudio una única muestra de tejido, la cual fue donada por una persona voluntaria perteneciente a la Universidad Icesi. En conjunto con el personal médico capacitado para la toma de muestra de tejido, se le informó al voluntario el motivo de la investigación y el procedimiento en el cual se vería implicado, para finalmente realizar la firma del consentimiento informado (Ver anexo 2).

Una vez ubicados el médico patólogo y el voluntario en el área de cultivo celular, se trasladaron todos los materiales necesarios para realizar la extracción del tejido. El médico patólogo se encargó de desinfectar el área lumbar con solución de yodopovidona comercial y procedió a aplicar un anestésico local (lidocaína 5mL), una vez se comprobó que la persona no sintiera dolor en el área donde se aplicó el anestésico, se procedió a realizar la extracción del tejido proveniente de la piel localizada en la parte lumbar de la espalda, utilizando un punch para biopsia de 3,0 mm de diámetro, obteniendo una muestra de tejido con un diámetro aproximado de 3,0 mm y un área de 0,071 cm².

Una vez retirada la muestra de tejido, el médico suturó la herida generada y le indicó al voluntario los cuidados que debe tener, en especial no tocarse la herida generada. La muestra de tejido extraído se llevó inmediatamente a un tubo Falcon estéril de 15 mL que contenga 10 mL de alcohol etílico al 70% para desinfectar la muestra y retirar los rastros de la solución de yodopovidona que ésta pueda contener por un período de 4 segundos. Luego se dispuso en el menor tiempo posible en un tubo Falcon estéril con 15 mL de DMEM suplementado con antibióticos en una mezcla penicilina/estreptomicina al 1%.

Es importante resaltar que aunque no es un proceso altamente invasivo, la disponibilidad de personas que quieran ser voluntarias en este tipo de investigación es muy baja, debido a que a pesar del tamaño reducido, se le realiza una herida la cual requiere un cuidado especial y que puede estar sujeta al desarrollo de una infección en un caso remoto. Dicho esto y pensando en investigaciones futuras, es preciso encontrar una fuente de donación del tejido que implique realizar un convenio con una clínica estética entre otros, a través de la cual el proceso sea más fácil y rápido.

Sin embargo, la muestra de tejido extraída poseía dos características que condujeron a una variación en la implementación del protocolo. En primer lugar la muestra a manipular era demasiado pequeña para ser tratada mecánicamente y enzimáticamente, razón por la cual se optó por realizar el cultivo por explante utilizando el medio específico para queratinocitos. En segundo lugar, visualmente la muestra de tejido obtenida se componía en gran mayoría de tejido adiposo, razón por la cual la proporción de adipocitos con respecto a los queratinocitos iba a ser mayor, ocasionando que el número de células a sembrar no fuese el suficiente.

Ensayo con biomodelo animal:

Para implementar un protocolo de obtención de queratinocitos, es necesario realizar ensayos que permitan comprobar que la metodología empleada arroja resultados concluyentes con el objetivo principal de la investigación.

Dadas las similitudes existentes en los procesos biológicos entre ciertos

biomodelos animales y humanos, a través del proyecto de investigación previamente aprobado por el comité de ética (Anexo 3) titulado *“Evaluación proteómica y funcional de los fenómenos de glicosilación tipo O-glcNAc y sus implicaciones terapéuticas en un modelo experimental de preconditionamiento, isquemia y reperfusión cerebral”* se hizo posible la utilización de tejido epidérmico sobrante de los biomodelos empleados para dicha investigación.

La rata Wistar empleada en el estudio proviene del bioterio de la universidad Icesi ubicado contiguo al campus. La manipulación del biomodelo entendida como traslado desde el bioterio a la sala de microcirugía de la universidad, anestesia y procedimiento quirúrgico, fue llevada a cabo por un médico cirujano y un ingeniero en proceso de formación doctoral en el área de biología.

La toma de muestra se realizó en la sala de microcirugía de la Facultad de Ciencias Naturales de la universidad Icesi, en donde el médico cirujano realizó una evaluación física al animal y lo dispuso en una cámara transparente donde se administra isofluorano en forma de gas inhalatorio empleado como anestésico general, una vez se verifica que éste se encuentre adormilado se procedió a acostar el animal sobre una superficie asegurando sus extremidades y dejando la cara anterior del cuerpo expuesta (según protocolo aprobado por comité de ética animal, ver anexo 3). Seguidamente se aplicó isofluorano a través de una careta diseñada para dicho procedimiento para anestesiarse al animal sin matarlo y continuar con el procedimiento quirúrgico.

El área abdominal de la rata se depila con una rasuradora convencional, y tras retirar la mayor cantidad de pelaje posible, se prosigue a eliminar la cantidad restante con ayuda de un bisturí. Seguidamente el médico cirujano se dispone a extraer el tejido con unas dimensiones aproximadas de 0,5 x 2,0 cm, obteniendo al final del procedimiento 7 muestras que son desinfectadas mediante inmersión en etanol al 70% durante 4 segundos y dispuestas en medio de cultivo DMEM no suplementado para luego ser trasladadas al laboratorio de cultivo celular para su posterior tratamiento.

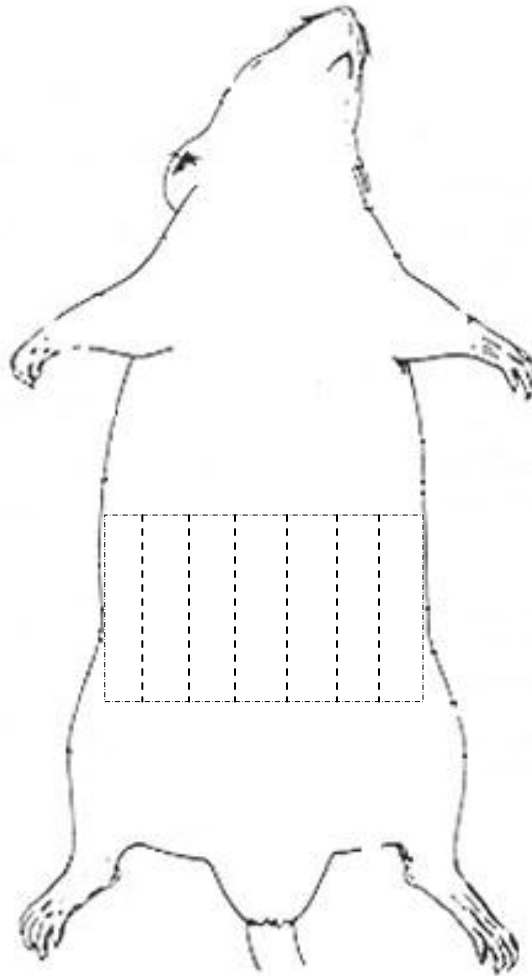


Ilustración 3 Esquema de cortes en rata Wistar.

La investigación entendida como todo el proceso de extracción, cultivo, aislamiento y almacenamiento de las células, se llevó a cabo en el laboratorio de cultivo celular ubicado en el quinto piso del área de investigación de la facultad de ciencias naturales de la Universidad Icesi.

Es importante resaltar que los pasos siguientes en la parte metodológica aplican para muestras provenientes de tejido de mamífero, por lo cual no se realiza distinción específica a un grupo especial, humano o animal.

2- Alistamiento del área de trabajo.

Se debe entrar al cuarto de cultivo siguiendo las normas preestablecidas en cuanto al uso de una bata y zapatos exclusivos para esta área, para reducir al

máximo la contaminación de la muestra a tratar. Se sigue el protocolo de limpieza ya establecido para el trabajo al interior del cuarto de cultivo celular.

La cabina de flujo laminar e implementos como micropipetas y recipientes de desecho se sanitizan utilizando alcohol etílico al 70%. Una vez se realizó dicho proceso, se configuró la cabina para dar inicio a la exposición a la radiación UV durante un período de 15 minutos, tal como se describe en los protocolos establecidos. Transcurrido este tiempo, se procedió a encender el sistema de ventilación del equipo y empezar a trabajar en el equipo transcurridos 10 minutos, una vez encendida la ventilación de la cabina.

Durante los 10 minutos en donde se inicia la ventilación de la cabina, se procedió a ingresar sanitizando previamente los tubos contenedores con alcohol etílico al 70%, los medios de cultivo específicos y las soluciones enzimáticas de colagenasa IA y tripsina, así como los demás implementos previamente esterilizados utilizando el autoclave de la Universidad, como lo son las pinzas, bisturí y tubos Falcon de 15 y 50 mL estériles.

3- Disgregación mecánica y enzimática

Una vez se dispuso del tejido en la cabina de flujo laminar, se descartó el medio de cultivo y se dispuso en la tapa de una caja de Petri de 50 - 100mm (dependiendo de la dimensión de la muestra), en donde el tejido se lavó con medio de cultivo específico para queratinocitos (Gibco®, Grand Island, NY, USA) suplementado con HGKS (Human Growth Keratinocytes Supplement - Gibco®, Grand Island, NY, USA) al 1% y una mezcla de antibióticos compuestos de penicilina/estreptomicina al 1%.

La muestra de tejido se aplanó y con ayuda de pinzas y bisturí estériles, se retiraron contaminantes macroscópicos y tejido adiposo presente. Es importante que mientras se realiza esta operación, el tejido sea lavado constantemente con el medio descrito anteriormente para evitar que se seque y mantener la mayoría de la población celular viva.

El fragmento de tejido obtenido se seccionó a fin de favorecer la reacción enzimática teniendo una mayor área de tejido expuesta para favorecer la disgregación de la misma, por ende utilizando un bisturí estéril se realizaron cortes con unas dimensiones aproximadas de 0,5 x 1,0 cm a partir de los fragmentos de tejido obtenidos inicialmente, durante dicha operación se lavaron con el medio de cultivo específico para queratinocitos.

Los fragmentos de tejido se pasaron a tubos Falcon estériles de 15mL, que contienen 4 mL de una mezcla de Colagenasa al 0,2% preparada previamente y

Tripsina al 0,25% en partes iguales (2mL cada una), y se dejaron incubando a una temperatura de 37°C por 30 minutos, período de tiempo en el cual se debió agitar el tubo manualmente cada 5 minutos (Ilustración 3). Finalizado el tiempo de incubación, se agitó el contenido del tubo suavemente con ayuda de una micropipeta y se traspasó a otro tubo Falcon estéril la suspensión celular en donde se adicionó la solución de inactivación en igual volumen (medio de cultivo DMEM suplementado al 5% con Suero fetal bovino).

Debe tenerse en cuenta que el proceso de disgregación enzimática es extenso y se debe preparar suficiente cantidad de las soluciones enzimáticas, esta cantidad estará determinada por la cantidad de tejido a tratar dado que a medida que la cantidad de tejido incrementa, se necesitará de una mayor cantidad de ambas enzimas para poder disgregar todo el tejido.



Ilustración 4 Incubación para la disgregación enzimática de la muestra (fuente propia).

Los fragmentos de tejido que no se disgregaron completamente se sometieron a una nueva disgregación enzimática, para lo cual se adicionó de 4-5 mL de la mezcla de las enzimas preparadas previamente. Se dejó incubar el tubo a una temperatura de 37°C por 30 minutos, y se repitió el mismo procedimiento descrito para la suspensión celular del tubo anterior hasta disgregar completamente el tejido.

Dado que el proceso de disgregación es lento y puede no completarse en un sólo día, los remanentes de tejido se almacenaron con medio de cultivo DMEM suplementado con penicilina/estreptomicina al 1% y se dejan incubando a 37°C,

90% humedad relativa y 5% de CO₂.

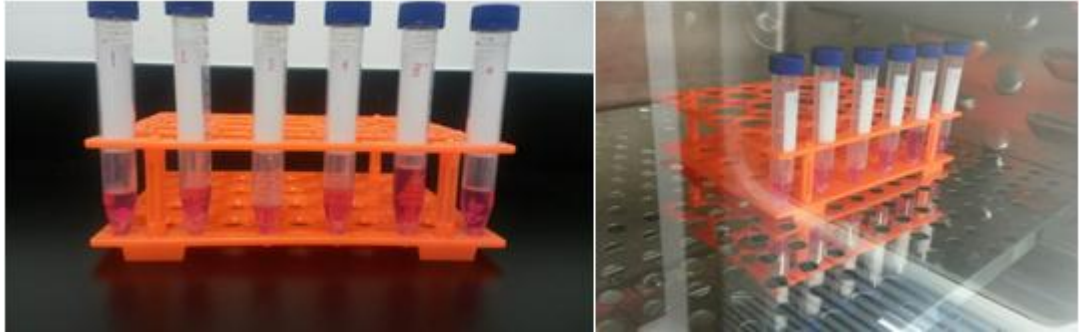


Ilustración 5 incubación de tejido remanente tras disgregación enzimática (fuente propia).

Finalmente, se centrifugaron las suspensiones obtenidas por 10 minutos a 1200RPM. El pellet obtenido se resuspendió en 1-2mL de medio de cultivo específico para queratinocitos suplementado con HGKS al 1% y penicilina/estreptomicina al 1%.

4- Determinación de viabilidad celular

En este segmento se verifica y evalúa el crecimiento celular tras realizar el proceso de disgregación, el cual va a permitir estimar el número de células disponibles para realizar el proceso de cultivo celular. En esta parte se utilizó un colorante vital que permitió identificar células vivas/células muertas, tras su observación bajo el microscopio óptico invertido. Este procedimiento se llevó a cabo mediante la utilización de cámaras de conteo celular, en donde se determina con esto la cantidad de células disponibles para realizar el cultivo.

Inicialmente se tomó una alícuota de 90µL del colorante azul de tripano al 0.4% (Lonza®, Walkersville, MD, USA) para disponerla en la superficie de un portaobjetos de vidrio. Posteriormente, se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión celular previamente obtenida tras la resuspensión del pellet, y se dispuso en el mismo portaobjetos de vidrio. Se homogenizó la mezcla de la suspensión celular y el colorante a fin de garantizar la fiabilidad de la dispersión del colorante entre las células presentes.

Se tomaron 10 µL de la mezcla anterior y se dispusieron sobre la Cámara de Neubauer, para observarla bajo el microscopio óptico invertido y calcular el número de células vivas, y el porcentaje de viabilidad teniendo en cuenta las respectivas diluciones y factores de conversión, de acuerdo al protocolo de conteo de células implementado en el laboratorio.

5- Preparación de matriz de revestimiento y cultivo celular

Para permitir el cultivo de queratinocitos sobre mallas poliméricas, se utilizó el reactivo Matrigel® como sustancia de revestimiento, el cual constituye un extracto soluble de membrana basal de tumor de ratón (Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)). Este se compone de diversos polímeros como colágeno, laminina, entactina, entre otros (BD Biosciences).

Dadas las condiciones de almacenamiento del Matrigel®, es necesario que todo el material que va a entrar en contacto con este reactivo se encuentre pre-acondicionado a baja temperatura (-4°C), como lo son las pipetas estériles, puntas de micropipetas y tubos Falcon estériles.

Se alicuotaron 300µL de un vial de Matrigel® (BD Biosciences®, Billerica, MA, USA) en un tubo tubo Falcon estéril de 50 mL y a dicho tubo se adicionaron 25 mL de medio de cultivo DMEM (Lonza® Group Ltd, Brandenburg, KY, USA) frío, esta mezcla constituyó la solución para recubrir los platos de cultivo a utilizar.

Posteriormente se dispuso de los platos de cultivo a recubrir sobre una bandeja con hielo y se adicionó la solución de revestimiento a cada frasco cubriendo totalmente la superficie y evitando la formación de burbujas. La cantidad a adicionar dependerá del área efectiva de cultivo, teniendo esto en cuenta para las cajas de Petri de 100mm, se emplearon 8 mL de solución de recubrimiento.

Tras aplicar la solución de recubrimiento, los platos de cultivo se dejaron incubando a temperatura ambiente fluctuando entre 15 y 25°C aproximadamente 1 hora, después de la cual se succionó con una pipeta estéril la solución de revestimiento sobrante, teniendo especial cuidado de no remover la película polimérica ya formada. Una vez se retiró la solución de revestimiento se procedió a sembrar las células a una densidad de siembra de 20.000 células/cm² para posteriormente adicionar el medio de cultivo específico para queratinocitos suplementado.

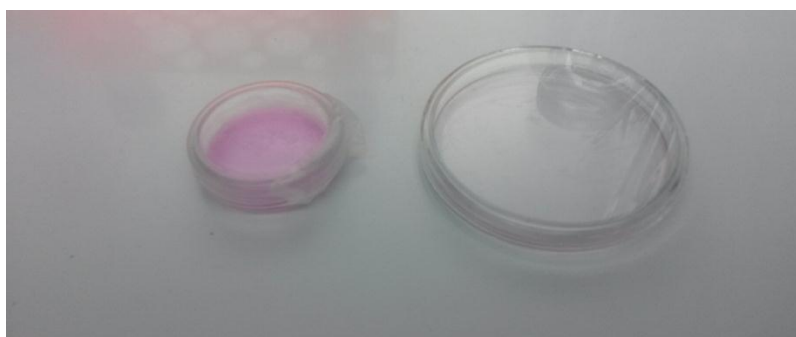


Ilustración 6 Recubrimientos de platos de cultivo con matriz polimérica (fuente propia).

Este paso no necesariamente debe realizarse tras el conteo celular, razón por la cual puede realizarse antes de iniciar el procedimiento global, teniendo en cuenta tras el período de incubación, el no remover el líquido de recubrimiento si no se van a usar los platos inmediatamente. Pueden almacenarse los platos recubiertos máximo por una semana a 4°C sellados con parafilm, para evitar la deshidratación.

Tras realizar el cultivo celular se sellaron parcialmente las cajas de Petri con Parafilm y se almacenaron en la incubadora a 37°C ± 2°C con 90% de Humedad Relativa y 5% de CO₂. El cambio de medio de cultivo se debió realizar transcurridas 48 horas, aunque el protocolo implementado sugiere un rango de 48 a 72h.

Una vez el cultivo esté confluyente a un 50% aproximadamente, cambiar el medio de cultivo diariamente. Al llegar al 80% de confluencia realizar el subcultivo o criopreservar, según protocolos implementados previamente en el laboratorio.

Matriz de marco lógico

Objetivo general	Estandarizar un protocolo para obtener láminas de queratinocitos sobre mallas poliméricas de colágeno a fin de establecer un banco celular para el desarrollo de actividades en ciencias básicas.		
Objetivo específico	Actividad	Indicador	Supuesto
<p>Analizar y determinar las condiciones óptimas de crecimiento celular a partir de la revisión bibliográfica que permita establecer un crecimiento estable de queratinocitos para ser cultivados sobre matrices de colágeno.</p>	Cultivar las células previamente obtenidas en el medio de cultivo específico de queratinocitos suplementado.	<p>Crecimiento celular. Caracterización morfológica.</p>	<p>Bases de datos de libros y revistas científicas.</p> <p>Incubadora, cabina de bioseguridad tipo 2, platos y frascos para cultivo de tejido, cajas de Petri, termostato, cámara de Neubauer, centrifugadora, micropipetas, microscopio invertido, tubos Falcon, tubos Eppendorf, crioviales, pinzas, congelador, puntas estériles, kit de cirugía.</p> <p>Buffer fosfato salino PBS, Solución salina balanceada con Ca y Mg HBSS, Penicilina/estreptomicina, Solución tripsina/EDTA, medio de cultivo DMEM, medio de cultivo Epilife, Suero fetal bovino 10%, Solución de aminoácidos no esenciales, DMSO, Factor de crecimiento epidérmico EGF, Solución Colagenasa, Matrigel®</p>
	Analizar cada cultivo celular y verificar el crecimiento de las células.		
	Caracterizar morfológicamente las células obtenidas.		
<p>Implementar un plan para la obtención de una fuente de muestras de tejido mamífero viable, ya sea a través de una entidad privada o por donación de personas</p>	Redactar el consentimiento informado.	<p>Documentación sobre la fuente de muestras establecida.</p>	<p>Donantes voluntarios.</p> <p>Estereoscopio, tubos eppendorf 15 mL, etanol al 70%, medio de cultivo DMEM.</p>
	Visitar diferentes instituciones prestadoras de salud y/o clínicas estéticas.	<p>Consentimiento informado.</p>	
	Convocar	<p>Protocolo sobre el procedimiento empleado para la toma del</p>	

naturales, con el fin de establecer los cultivos celulares.	voluntarios en la universidad.	tejido y su almacenamiento	
Estimar la viabilidad del cultivo celular establecido como un indicador del mantenimiento del cultivo <i>in vitro</i> .	Obtener las suspensiones celulares de queratinocitos a partir de la muestra de tejido	Gráficos de registro de número de células y viabilidad celular.	Microscopio invertido, platos y frascos de cultivo celular, micropipetas, cámara de Neubauer (hemocitómetro), colorante vital de exclusión para identificar viabilidad (azul de tripano)
	Cuantificar las células utilizando colorantes de contraste y registrar las células cuantificadas.		

2.5. Resultados y discusión

En el ámbito académico, el establecimiento de metodologías de cultivo brinda la posibilidad a los grupos de investigación enfocados en esta área experimental, a obtener de forma garantizada un determinado cultivo primario celular. La obtención de cultivos celulares y su mantenimiento a lo largo del tiempo, permite su utilización en diversos ensayos tales como los de citotoxicidad, irritabilidad y sensibilización cutánea, las cuales se vienen realizando tradicionalmente en biomodelos animales. La implementación de modelos *in vitro* permitiría una optimización de estas pruebas, haciendo que la valoración de las mismas al interior de una investigación sea mejor desde una perspectiva ética.

Si se requiere y se cuenta con la infraestructura necesaria, los cultivos celulares de queratinocitos pueden emplearse para realizar co-cultivo con fibroblastos u otros tipos celulares, y de esta forma obtener un epitelio reconstituido de tipo epidérmico, el cual trabajando conjuntamente con investigadores en el área de ingeniería de tejidos permitan darle una aplicabilidad médica y desarrollar análogos dérmicos que sirvan como injertos artificiales en personas con lesiones en la piel de tipo quemaduras, ulceraciones, entre otras (Perez, Doncel, Roa & Fontanilla, 2001).

Desde los primeros ensayos de cultivo celular con queratinocitos realizados por Rheinwald & Green en el año 1975, se han desarrollado múltiples metodologías para el cultivo de queratinocitos utilizando diversos medios de cultivos y soportes para favorecer su crecimiento.

2.5.1. Ensayo con humano:

Tras obtener la muestra de tejido del voluntario y cultivarla durante 8 días por explante (ver ilustración 7), no se observaron resultados satisfactorios expresados en un crecimiento de colonias de queratinocitos alrededor del explante sembrado, resultado que puede deberse a dos factores inherentes a la muestra. En primer lugar, el área mínima a sembrar es de 1 a 8 cm² (Núñez, 2009), lo que garantiza la cantidad suficiente de queratinocitos nucleados para poder generar confluencia en un cultivo celular.

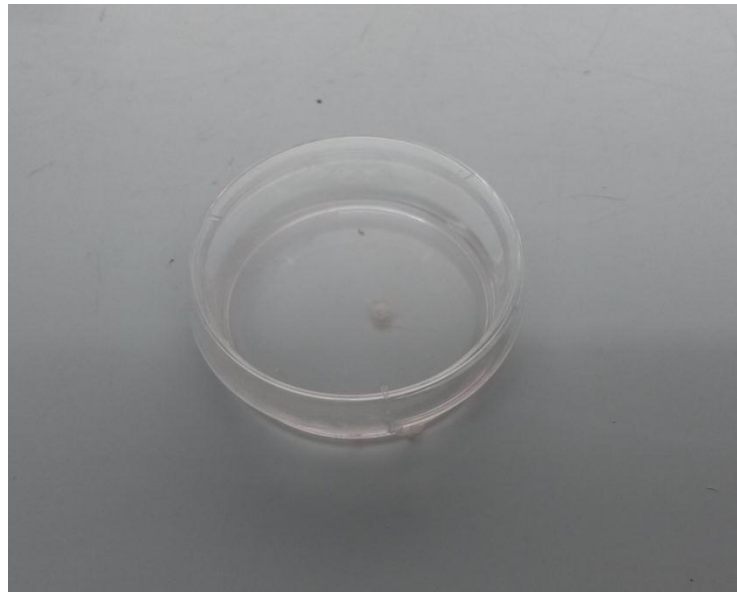


Ilustración 7 Cultivo por explante, vista macrosópica.

Por otro lado, la muestra de tejido obtenido presentaba macroscópicamente una gran cantidad de tejido adiposo, lo cual presupone un número menor de queratinocitos con respecto a otros tipos celulares que pueden estar presentes. El éxito de un cultivo por explante es la migración de los queratinocitos desde la muestra hacia el soporte del plato de cultivo, para formar pequeñas colonias e iniciar su confluencia (Amortegui & Ramirez, 2008). Dada la presencia de dicho tejido adiposo que no pertenece a la estructura del epitelio dérmico, se puede dificultar la migración de los queratinocitos hacia el plato de cultivo impidiendo su crecimiento.

Como se evidencia en la descripción metodológica y en el consentimiento

informado presente en la sección de anexos, el proceso de obtención de la muestra de tejido se realizó con un médico patólogo y un donante voluntario en las instalaciones de la universidad. Aunque el proceso llevado a cabo es invasivo en una forma mínima, la obtención de voluntarios es muy compleja y se dificultó en gran medida por la disponibilidad de tiempo del personal médico capacitado en el procedimiento, así como la del voluntario. A pesar de lo descrito anteriormente, el procedimiento se llevó a cabo de esta forma y no a través de una institución clínica, dejando como recomendación para futuras investigaciones, el dedicar esfuerzos en la consecución de convenios con ese tipo de entidades a fin de facilitar el desarrollo de futuras investigaciones.

2.5.2. Ensayo con biomodelo:

Para esta investigación y tras la revisión bibliográfica, se realizaron las adaptaciones concernientes a los materiales y recursos disponibles en el laboratorio, lo que permitió implementar un protocolo de extracción y cultivo de queratinocitos descrito en la sección de anexos.

Referente al proceso de extracción, se pudo observar que el procesamiento mecánico a manera de cortes al tejido expuesto es esencial para aumentar la cantidad de tejido expuesto a la acción enzimática, lo cual favorece la obtención de células. Además, el estrés al que se someten las células en los procesos de contacto con etanol, corte, digestión y agitación, es un aspecto crucial y puede afectar de manera significativa la viabilidad de las células, puesto que la viabilidad medida puede convertirse en una estimación vaga de la viabilidad real que puedan tener las células extraídas.

Dado que se tuvo acceso a un área de tejido aproximada de 7 cm² disponible para el ensayo (Ilustración 3), el proceso de extracción se realizó en dos días, teniendo de esta manera la necesidad de realizar la estimación de la viabilidad en dos días diferentes. En los gráficos 1 y 2 se expresan los resultados encontrados con respecto al número de células extraídas y la viabilidad que presentan las mismas para así determinar la cantidad de células que se obtuvieron y pueden ser utilizadas para realizar el cultivo.

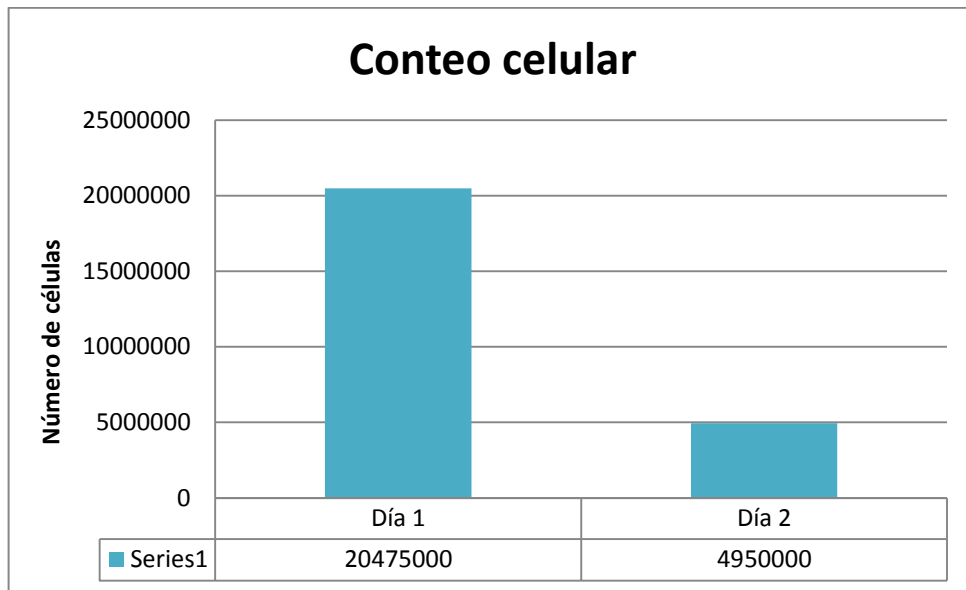


Gráfico 1 Conteo celular días 1 y 2.

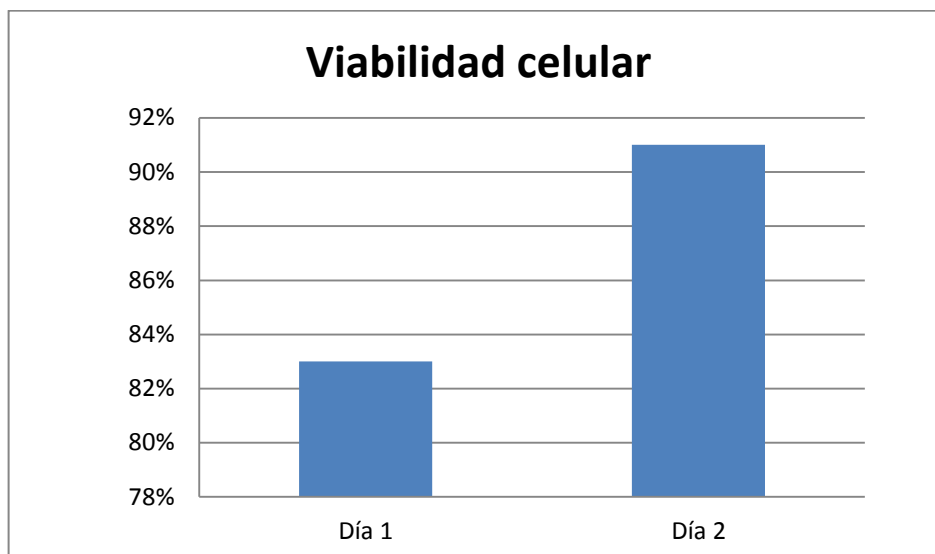


Gráfico 2 Porcentaje de viabilidad de la población celular obtenida.

Una vez realizado el conteo celular utilizando la cámara de Neubauer, los resultados de número de células extraídas junto al porcentaje de viabilidad, se calcularon utilizando las siguientes fórmulas matemáticas:

$$\text{Número de células} = \frac{\text{células vivas totales}}{4} * 100000 * \text{dilución}$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Células vivas totales}}{\text{Células totales}} * 100$$

A continuación se presenta una muestra de cálculo del número de células y porcentaje de viabilidad para el día dos del procedimiento experimental:

$$\text{Número de células} = \frac{198}{4} * 100000 * 1 \text{ mL} = 4950000$$

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{198}{216} * 100 = 91\%$$

En los gráficos 1 y 2, se puede observar que para el primer día del proceso de extracción, las células del tejido se ven expuestas a diversos factores agresivos durante un período prolongado de tiempo, la viabilidad obtenida para las mismas no se ve significativamente disminuida expresada en un valor promedio de 83%. A partir de las células obtenidas el primer día, se tomaron 2'500.000 células y se cultivaron a una densidad de siembra de 20.000 células/ cm² en cajas de Petri de 100mm. Las células restantes se almacenaron en la incubadora con el medio específico para queratinocitos suplementado para posteriormente ser criopreservadas.

Los fragmentos de tejido restantes se almacenaron tal como se describe en la metodología, lo cual permitió conservarlos viables hasta el día siguiente y continuar de esta forma el proceso de extracción.

Tras el segundo día de manipulación de la muestra de tejido, la viabilidad de las células obtenidas es mayor a la obtenida el primer día con un valor de 91%, lo cual constituye un valor de importancia al momento de procesar tamaños de muestra muy grandes; este valor favorable de viabilidad puede deberse en gran medida a la reducción a la exposición que tuvo el tejido frente a la acción enzimática, permitiendo que dicha relación sea más favorable. A partir de las células obtenidas el segundo día, se tomaron 3'600.000 células y se sembraron a una densidad de siembra de 20.000 células/ cm² en cajas de Petri de 100 y 20mm. De la misma forma, las células restantes se almacenaron en la incubadora para ser criopreservadas.

A pesar de ser almacenadas en la incubadora y con el medio de cultivo específico,

se encontró que la población celular disminuyó considerablemente en el caso de las células extraídas el primer día, probablemente debido a la cantidad de factores agresivos a los cuales se vieron expuestas las células tras el tratamiento mecánico y enzimático, sin embargo, las células que lograron sobrevivir fueron criopreservadas junto con las obtenidas en el segundo día de tratamiento.

La utilización del Matrigel® como agente de recubrimiento para los platos de cultivo viene dada por su composición, dado que entre sus componentes se incluyen colágeno, laminina, entactina, entre otros (BD Bioscience), compuestos que han sido evaluados no sólo en la experimentación con queratinocitos, sino que también se han utilizado generalmente en el cultivo de células madre embrionarias (hES por sus siglas en inglés). Las células obtenidas en ambos días y utilizadas para realizar los cultivos celulares se sembraron en platos cubiertos con una solución de Matrigel® para dar origen a los cultivos primarios.

Una vez sembradas las células, se observaron al microscopio y se procedió a dejar en incubación a 37°C con 90% humedad relativa y 5% de CO₂. En las ilustraciones 8-10 se puede observar la evolución del cultivo durante los primeros 5 días bajo condiciones controladas. Como puede observarse en la ilustración 8, las células no se encuentran aún adheridas al fondo del plato, además de esto se encuentran fragmentos de tejido que no fueron disgregados completamente, tal como se indica en la imagen.

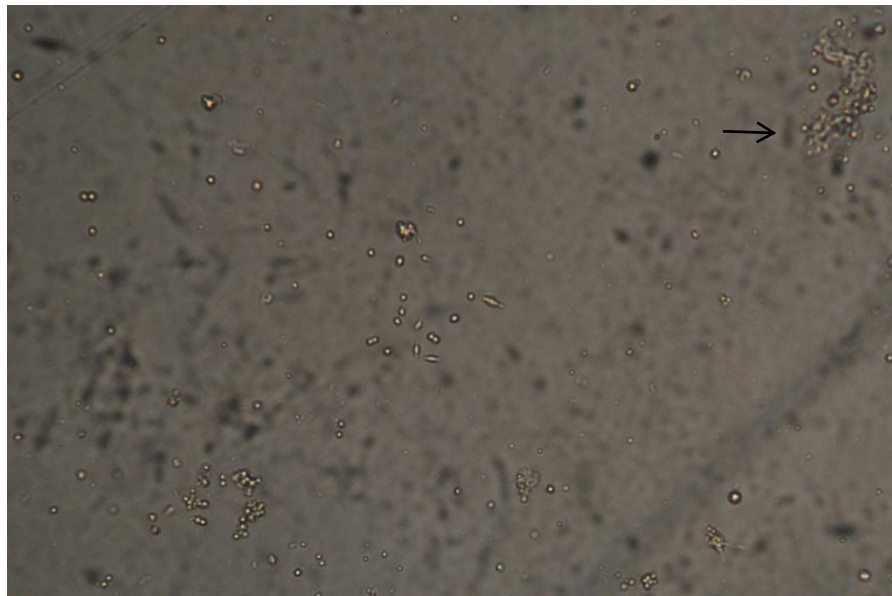


Ilustración 8 Día 1 de cultivo celular (objetivo 10x).

En el tercer día tras realizar la siembra de las células, ya pueden observarse células adheridas al plato de cultivo como se indica en la ilustración 9. Es importante resaltar que no todas las células del campo visual tienen la forma

característica que adquieren las células adherentes, que consiste en formas ligeramente alargadas, por lo que puede inferirse en que el proceso de adaptación de las células a este nuevo ambiente se produce de una manera mucho más lenta en comparación con otros tipos de cultivos celulares. Este hecho también puede enfocarse en la expresión de las proteínas encargadas de la adhesión de las células a la matriz polimérica.

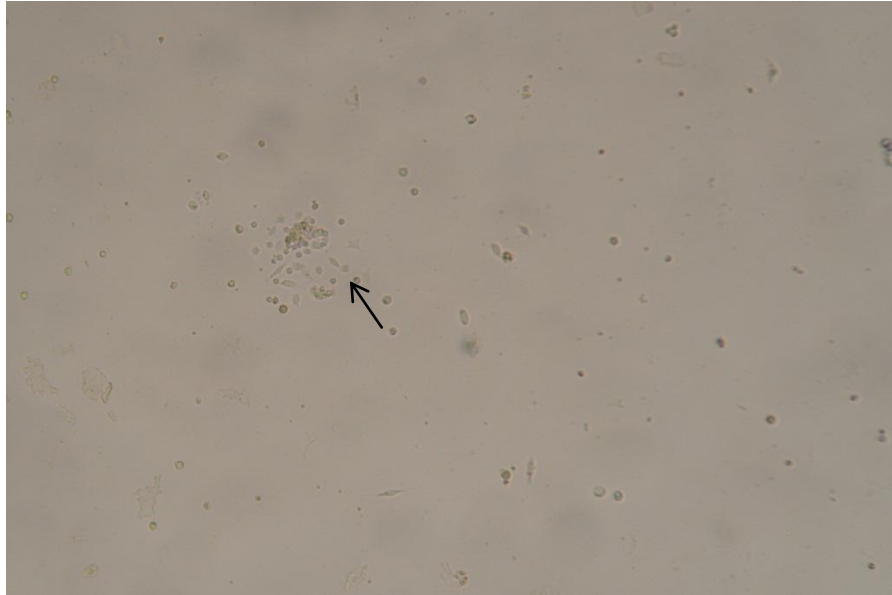


Ilustración 9 Día 3 de cultivo celular (objetivo 10x).

Tras cinco días de cultivo celular, es posible evidenciar en la ilustración 10, dos pequeñas colonias celulares con la morfología característica de los queratinocitos, células adherentes de forma ligeramente alargada con aspecto semi-hexagonal. (Amortegui & Ramirez, 2008)

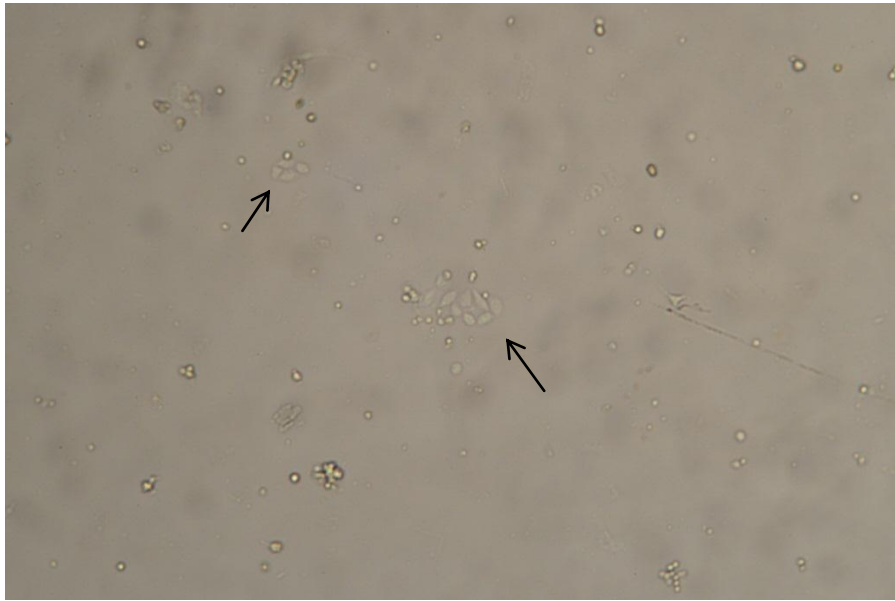


Ilustración 10 Día 5 de cultivo celular (objetivo 10x).

Se resalta con respecto al crecimiento y desarrollo de este tipo celular, como se puede observar en la ilustración 2, la epidermis donde la principal población celular son los queratinocitos se conforma de 5 estratos o capas diferenciados por dos factores: nivel de queratinización y morfología. (Aasen, T. & Izpisúa Belmonte, J, 2010). Una vez se extraen las células a partir del tejido y utilizando únicamente el análisis microscópico es imposible detectar a partir de cual estrato se están obteniendo y cultivando los queratinocitos, aspecto que va a influenciar la capacidad que tendrán las células para proliferar y formar una monocapa.

La queratinización de estas células se da de manera progresiva con una duración de 3 a 4 semanas, en donde a medida que las células migran desde el estrato basal al estrato córneo se va dando un cambio estructural ligado a la expresión de citoqueratinas y la simultánea síntesis de filamentos de queratina al interior de las células (Ross & Pawlina, 2013), dando lugar a una transformación de células semi-hexagonales a células anucleadas de forma alargada y planas (ver ilustración 2).

Si bien la densidad de siembra utilizada en la experimentación (20.000 células/cm²) es la sugerida en los protocolos establecidos en la literatura (Life technologies. Recurso en red), teniendo en cuenta el proceso de queratinización y posterior pérdida del núcleo de las células, el utilizar una densidad de siembra mayor puede ayudar a mejorar la evolución del cultivo celular de modo que se propicie la formación de colonias y se llegue a la confluencia en un tiempo más corto.

La obtención de un cultivo confluyente de queratinocitos tarda en teoría de 12 a 14

días (Amortegui & Ramirez, 2008), en la presente investigación al día sexto de cultivo celular se presentó una contaminación microbiana, lo cual frenó el crecimiento de las colonias celulares y produjo su posterior muerte. Este aspecto de la investigación permite evidenciar la dificultad que tiene el mantenimiento de un cultivo celular, puesto que tanto el entorno como el investigador deben llevar a cabo todos los procesos con el mayor nivel de asepsia que sea posible, a fin de evitar este tipo de inconvenientes que resultan en no obtener resultados firmemente concluyentes, y en la pérdida de tiempo y recursos.

La contaminación microbiana es uno de los problemas más frecuentemente encontrados al realizar experimentación con cultivos celulares, esto se debe especialmente a la tasa de proliferación más alta que tienen los microorganismos como hongos, levaduras o bacterias, en comparación con el crecimiento que tiene en promedio una célula animal.

Los requerimientos nutricionales de un grupo con respecto al otro varía considerablemente, teniendo en cuenta que el crecimiento de las células animales se da bajo una mezcla compleja de azúcares, aminoácidos y demás factores de crecimiento (Moraes, Zucatelli, & Torres. 2008), razón por la cual dependiendo del tipo de célula se debe emplear un medio de cultivo específico que le brinde un entorno apto para su desarrollo. Los hongos por su parte, pueden utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como fuente de energía, entre los que se encuentran azúcares, ácidos orgánicos, alcoholes, proteínas, polisacáridos, entre otros, razón por la cual el medio de cultivo celular se convierte en un ambiente óptimo para su crecimiento y desarrollo (Lurá de Calafell *et al*, 1997).

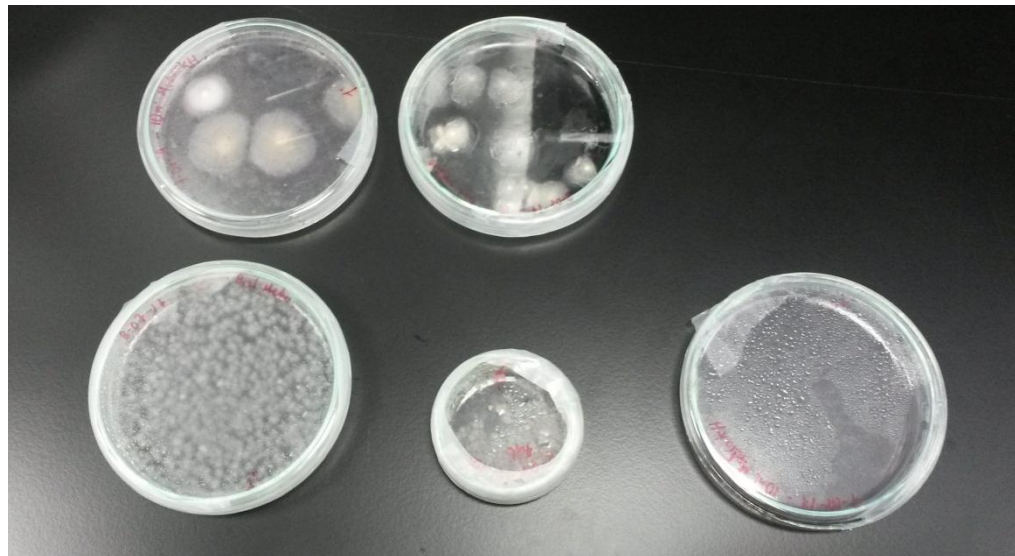


Ilustración 11 Cultivos celulares contaminados microbiológicamente.

Al observar macroscópicamente los cultivos, se evidenciaron al menos dos tipos diferentes de hongos, en donde las cajas superiores de la ilustración 11 pueden corresponder a un hongo dermatofito, los cuales se caracterizan por tener colonias radiadas con aspecto algodonoso y presentar color blancuzco. Este tipo de hongos afectan tejidos queratinizados y poseen capacidad patógena superficial en el caso de los humanos, lo cual podría explicar su procedencia (Vilata, 2005). Los hongos de la parte inferior pueden corresponder a hongos del tipo género *Aspergillus* con colonias no radiadas que al día 8 de cultivo empiezan a desarrollar una coloración negruzca, característica de este tipo de hongo. (Clasificación de hongos dermatofitos. Recurso en red.) (*Aspergillus* y *aspergilosis*. Recurso en red)

Al considerar una contaminación por hongos dermatofitos, es posible que la fuente de su procedencia sea la piel tanto del animal como la del investigador, razón por la cual se pueden tener dos posibles focos de contaminación (Clasificación de hongos dermatofitos. Recurso en red). Por otro lado, los hongos pertenecientes a la familia *Aspergillus* tienen una amplia presencia en la naturaleza, se cree que corresponden a un 40% del ambiente doméstico (*Aspergillus* e infecciones quirúrgicas. Recurso en red), por lo tanto se podría pensar que la contaminación de los cultivos trabajados en el laboratorio se deba a un descuido en la manipulación de algunos materiales, lo que implicaría una exposición a este tipo de hongo y así se diera la oportunidad de su crecimiento en los cultivos manejados en el laboratorio.

Es importante resaltar como se mencionó anteriormente, que la proliferación de este tipo de microorganismos se da de una forma acelerada, razón por la cual podría atribuirse con una mayor probabilidad que la fuente de contaminación fuese el investigador y no el biomodelo a partir del cual se tomaron las muestras de tejido. Para los hongos dermatofitos, se reporta un tiempo de crecimiento y desarrollo de 10 a 14 días (Vilata, 2005), y en el caso del *Aspergillus* su crecimiento se da de una forma más rápida, evidenciando crecimiento en tres días, aunque esto puede depender del medio de cultivo. (Winn *et al*, 2008) Sin embargo con una caracterización más certera de los tipos de hongos que ocasionaron la contaminación puede deducirse sus tiempos de incubación y determinar así su origen.

Este suceso en el proceso experimental deja en claro la importancia que tiene la calidad del ambiente en el cual se realiza la investigación, así como la capacitación necesaria que requiere la persona a cargo de la investigación. Es cierto que existe un riesgo inherente a la manipulación de soluciones y demás materiales, conocer las posibles fuentes de contaminación y minimizar la oportunidad de contaminación son actividades que deben tenerse en cuenta al momento de llevar a cabo el procedimiento experimental.

Los aspectos éticos de la investigación juegan un papel primordial en su desarrollo; la redacción clara y concisa del consentimiento informado constituyó un

paso decisivo para el avance de la investigación. Es importante utilizar un lenguaje sencillo y sin tecnicismos, que permitan al individuo entender los aspectos esenciales que implica el hecho de donar su muestra de tejido biológico con fines científicos.

Finalmente, es importante destacar el papel fundamental que tiene una buena planeación para la realización del proyecto, puesto que la disponibilidad de los diferentes reactivos resulta uno de los limitantes principales para el desarrollo del mismo. Las fechas límites del cronograma por ende se ven afectadas directamente por la tenencia de éstos en el laboratorio, lo cual en muchas ocasiones puede estar sujeto a variables que no se tenían previstas al inicio de la investigación, como lo son los inconvenientes en el proceso de exportación de los diferentes tipos de enzimas y medios de cultivo.

2.6. Conclusiones

- A pesar de no obtener un cultivo confluyente de queratinocitos, se evidencia que la metodología adoptada para extraer y cultivar este tipo celular funciona, debido a que se lograron obtener algunas colonias celulares que muestran la morfología característica de los queratinocitos.
- Una vez el tejido almacenado con medio de cultivo DMEM suplementado a condiciones de cultivo, es decir 37°C, 90% de humedad relativa y 5% de CO₂, se sometió al proceso de digestión enzimática y se obtuvo una población celular con una viabilidad de 91%.
- Se logró implementar un protocolo de extracción y cultivo primario de queratinocitos a partir de una muestra de tejido proveniente de un biomodelo animal.
- Se evidencia adherencia celular en los cultivos utilizando Matrigel® como material de revestimiento para los platos de cultivo empleados en el proceso de cultivo celular.
- La utilización del medio de cultivo selectivo para queratinocitos permite el crecimiento de pequeñas colonias de este tipo celular, suprimiendo en gran medida el crecimiento de fibroblastos y melanocitos, otros tipos celulares que se encuentran presentes en el tejido dérmico.

2.7. Recomendaciones

- El cultivo celular visto de forma general es una técnica, que engloba a su vez una serie de métodos para lo cual se requieren equipos, materiales y reactivos específicos, razón por la cual es imprescindible tener en cuenta los tiempos que se tarda la importación de todos los implementos necesarios para la realización del trabajo investigativo.
- Para darle una mayor solidez al trabajo investigativo, se puede optar por una identificación más certera y una visualización de la morfología de las células obtenidas mediante ensayos de inmunohistoquímica, los cuales a pesar de tener un elevado costo dada la especificidad de los anticuerpos requeridos (anticitoqueratina AE1/AE3), permiten una fácil identificación de los queratinocitos.
- Dado que el elemento limitante en la investigación es encontrar una fuente que proporcione el tejido, es preciso que se evalúe la posibilidad de realizar convenios entre la Facultad de Ciencias Naturales y entidades como clínicas estéticas, a través de las cuales esta parte de la investigación sea más fácil y rápida (siguiendo el rigor ético y científico).
- Frente al proceso experimental, es preciso optar por extremar las medidas de asepsia al momento de realizar la manipulación al interior del cuarto de cultivo a fin de minimizar la posibilidad de contaminación del tejido a manipular.

2.8. Bibliografía

Aasen, T., & Izpisua Belmonte, J. (2010). Isolation and cultivation of human keratinocytes from skin or plucked hair for the generation of induced pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 5(2), 371-382. doi:10.1038/nprot.2009.241

Amorteguí, A, Ramirez, S. (2008) Cultivo primario de queratinocitos humanos sembrados en submucosa intestinal porcina. *Rev. Cienc. Salud. Bogotá (Colombia)* 6 (3): 8-22.

Arvelo, F. (2007) Ingeniería de tejidos y producción de piel humana *in vitro*. *Revista Investigación Clínica* 48(3): 367 – 375.

Buttery, L., Shakesheff, K., (2008). *Advances in tissue engineering. Chapter 2: A brief introduction to different cell types.* (pp. 15-33). Imperial College Press.

Ebling F, Eady R. *Anatomy and organization of human skin.* *Dermatology*

encyclopedia, cap 3, Oxford: Editado por Lowell A. Goldsmith, 1997.

Eckert R. & Rorke E. (1989) Molecular biology of keratinocyte differentiation. *Environ Health Perspect.*;5:109–116.

Gragnani A, Morgan JR, Ferreira LM (2003). Experimental model of cultured keratinocytes. *Acta Cir Bras.* Vol 18 Special Edition. Available from URL: <http://www.scielo.br/acb>.

Horch, R., Kopp, J., Kneser, U., Beier, J., & Bach, A. (2005). Tissue engineering of cultured skin substitutes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(3), 592-608.

Junqueira, L., & Carneiro, J.(2005). *Histología básica*. (6th ed., pp. 74-77). Ed. Masson.

Krause, W. J. (2005). *Krause's essential human histology for medical students*. (1 ed., pp. 149-155). Universal Publishers.

Limat, A. & Noser, FK. (1986) Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles. *Journal of Investigative Dermatology* 87: 485–488.

Lurá de Calafell, M.C., González, A., Basilisco, J.C., Sarsotti, P.V., Gomez, R.G., & Freyre, L. B. (1997). *Introducción al estudio de la micología*. (pp. 27-29). Santa fe, Argentina: Universidad Nacional del Litoral.

Marques, P., Teixeira, M., & Estilita, P. (2008). Animal cell technology: From biopharmaceuticals to gen therapy. Chapter 1: *Introduction to animal cell technology*. (pp. 1-12). New York: Taylor & Francis Group.

Moraes, A., Zucatelli, R., & Torres, C. (2008). Animal cell technology: From biopharmaceuticals to gen therapy. Chapter 5: *Culture media for animal cells*. (pp. 111-125). New York: Taylor & Francis Group.

Núñez, E. (2009). *Obtención de un modelo dermoepidérmico autólogo artificial*. (Master's thesis, Universidad de Valladolid, Valladolid, España).

Perez, S., Doncel, A., Roa, C., & Fontanilla, M. (2001). Estandarización de un método para la elaboración de un análogo de dermis humana. *Revista Colombiana de ciencias químico-farmacéuticas*,30, 9-15.

Ponec, M, Weerheim, A, Kempenaar, J, Boonstra, J. (1988) Proliferation and differentiation of human squamous carcinoma cell lines and normal keratinocytes: Effects of epidermal growth factor, retinoids, and hydrocortisone. *In Vitro* 24: 764–770.

Prignano F., Domenici L., Gerlini G., Pimpinelli N. & Romagnoli P. (1999) Human keratinocytes cultured without a feeder layer undergo progressive loss of differentiation markers. *Histology and Histopathology*. 14: 797-803

Rheinwald JG, Green H. (1975) Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* (6) 331–343.

Ross, M., & Pawlina, W. (2013). *Histología: Texto y atlas con biología celular y molecular*. (6 ed., p. 485). Medica Panamericana.

Solomon, E., Berg, L., & Martin, D. (2013). Capítulo 10, Cromosomas, mitosis y meiosis. In *Biología* (9th ed., pp. 213 -233). Cengage Learning.

Sun HY, Zhou GM, Wang Q, Lin XC, Xu B. (2013) In vitro culture system for keratinocytes obtained from oral lichen planus lesions. *Journal of Clinical Oral Investigations*. Published online. Online ISSN 1436-3771 DOI 10.1007/s00784-013-1083-3

Takagi, R., Yamato, M., Murakami, D., Kondo, M., Yang, J., Ohki, T., & ... Okano, T. (2011). Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *Journal Of Tissue Engineering And Regenerative Medicine*, 5(4), e63-e73. doi:10.1002/term.337

Thews, G., Mutschler, E., & Vaupel, P. (1983). *Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre: Manual para farmacéuticos y biólogos*. (1 ed., p. 26). Editorial Reverte

Vilata, J. J. (2005). *Micosis cutáneas*. Capítulo 4. Dermatofitosis (pp. 49-54). Buenos aires: Editorial Medica Panamericana.

Wells, J. (1982). A simple technique for stablishing cultures of epithelial cells. *British Journal of Dermatology*. 107: 481-482.

Weterings, P., Vermorcken, A. & Bloemendal, H. (1981) A method for culturing human hair follicle cells. *British Journal of Dermatology*. 104: 1–5.

Winn, W.C., Allen S.D., Janda W.M., Koneman E.W., Procop G.W., Schrenckenberger P.C. & Woods G.L. (2008) Koneman. *Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color*. (6 ed., pp. 1122-1123). Madrid, España: Editorial Medica Panamericana.

Enlaces de internet:

EURL-ECVAM: Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para las

alternativas a la experimentación animal - Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos. (s.f) Recuperado de: http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam

Isolation, Primary Culture, and Cryopreservation of Human Keratinocytes. Life technologies. (s.f) Recuperado de: <http://www.lifetechnologies.com/co/en/home/references/protocols/cell-culture/primary-cell-protocols/keratinocyte-protocols/isolation-primary-culture-and-cryopreservation-of-human-keratinocytes.html>

Assay Methods "Protocol: Human Embryonic Stem Cell Culture" BD Biosciences. (s.f) Recuperado de: http://csmedia2.corning.com/LifeSciences/Media/pdf/protocol_DL_032_Human_Embryonic_Stem_Cell_Culture.pdf

Identificación de hongos dermatofitos. Autor: Javier Cabañes Saenz. Revista Iberoamericana de micología (2001) Recuperado de: <http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo12.pdf>

Aspergillus y aspergilosis. Servicio de Microbiología Clínica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. (s.f) Recuperado de: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/asperguillus.pdf>

Ilustración 1. Estructura de la piel. (s.f) Recuperado de: <http://rincones.educarex.es/byg/index.php/sindicacion/1111-estructura-de-la-piel-y-funciones>


Ilustración 2. Estratificación de la piel. (s.f) Recuperado de http://spaces.imperial.edu/thomas.morrell/cha_5_tortora_integument.htm

Aspergillus e infecciones quirúrgicas. Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Ramón y Cajal. Madrid. (s.f) Recuperado de: http://www.semicrobiologia.org/pdf/actualidad/SEM27_15.pdf

3. ANEXOS

ANEXO 1. FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO.

A continuación se presenta el consentimiento informado firmado por el donante voluntario en la presente investigación, en donde se consigna la firma del investigador que realiza la lectura del consentimiento informado al voluntario y el nombre del médico que realiza el procedimiento.

CONSENTIMIENTO INFORMADO Investigador: María Camila Morales Núñez Química Farmacéutica – Universidad Icesi	
---	---

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN Y EL USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO CON FINES DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE:

Finalidad y descripción del proceso

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de una pequeña muestra de tejido (piel), con el fin de utilizarla en investigación científica relacionada con el aislamiento e identificación de células características de la piel y establecerlas como una base para la investigación a futuro. La principal vía de obtener dichas células es la utilización de muestras de tejido que posteriormente serán tratadas en el laboratorio.

La donación de tejido se realizará bajo el cuidado de un profesional médico especializado en dermatología, en donde tras la aplicación de anestesia local, se retirará un fragmento circular de piel (de un tamaño aproximado de 3 milímetros). Una vez retirado dicho fragmento de piel, se suturará la herida generada (un -1- punto) y tras 10 (diez) días de realizado el procedimiento, usted deberá volver a las institución designada por el médico para retirar el punto.

La donación de este tejido es voluntaria, por lo que si Usted da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo. En caso de producirse esta revocación ello no supondrá ningún cambio en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico /tratamiento y/o seguimiento. En caso de revocación, su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma, procediendo a la destrucción de la muestra.

Carácter altruista de la donación

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma, ni tendrá derechos sobre posibles beneficios comerciales de los descubrimientos que puedan conseguirse como resultado de la investigación científica. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

Protección de datos y confidencialidad

Los datos personales que se recojan sobre Usted, serán confidenciales y ninguna persona ajena a la investigación tendrá acceso a ellos. Los resultados obtenidos serán expuestos al público en la sustentación de la investigación, sin embargo su identidad y demás datos serán confidenciales. Su muestra será identificada por un código que consta de sus datos personales registrados en este documento.

En el momento que usted consienta el uso de su muestra de piel para los fines de investigación descrito anteriormente, dicho tejido será sometido a un proceso de identificación en donde se asignará un número y/o código constando todos sus datos debidamente codificados, por lo que los investigadores implicados nunca conocerán su identidad o dato alguno que pudiera llegar a identificarle; sin embargo, los mismos, sí

1

podrán en todo caso acceder a otros datos como su sexo o edad, pero siempre manteniendo la debida confidencialidad conforme a la legislación vigente.
Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio referido como trabajo de grado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO:

Le agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la investigación y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre el aislamiento de células que conforman la piel para su aplicación en investigación biomédica.

Nombre y apellidos del donante: [Redacted]

Yo [Redacted] mayor de edad, identificado con CC. N° [Redacted] y como paciente, autorizo a

MD/ADGORA CLINICA con profesión o especialidad [Redacted], para la realización del procedimiento de toma de muestra de piel, teniendo en cuenta que el objetivo de la investigación a la cual estoy aportando mi muestra de tejido consiste en el establecimiento de un cultivo de las células que se van a aislar con fines académicos y científicos.

Afirmo que si he comprendido la información que se me ha proporcionado, he resuelto cualquier duda que pudiese tener y decidí colaborar con este proyecto de investigación en los términos antes explicados.

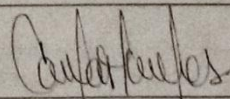
El abajo firmante autoriza al investigador que el material biológico sea incorporado en el registro de muestras biológicas de origen humano como parte del proyecto de investigación mencionado anteriormente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la información adjunta.

Recuerde que su participación en este estudio es voluntaria, puede retirarse de este estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.

Confirmo que:

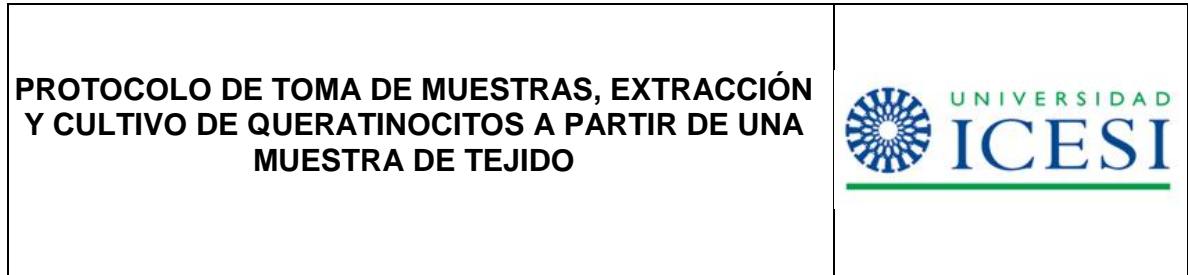
1. Autorizo que el material biológico donado y la información clínica asociada se utilice para investigación en los términos recogidos en la hoja de información al paciente.

Si	<input checked="" type="checkbox"/>	No	<input type="checkbox"/>
----	-------------------------------------	----	--------------------------

[Redacted]	
Firma del Donante	Firma de la persona que informa

Firmado en la ciudad de Cali, a los 10 del mes 06 del año 2014.

ANEXO 2: PROTOCOLO DE TOMA DE MUESTRAS, EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE QUERATINOCITOS A PARTIR DE UNA MUESTRA DE TEJIDO.



1. DEFINICIÓN:

Protocolo de extracción de queratinocitos humanos a partir de una muestra de tejido.

1.1. OBJETIVO:

Aislar queratinocitos a partir de un tejido vivo a fin de cultivar dichas células y propiciar su crecimiento bajo condiciones de laboratorio.

2. NOTAS DE CAMBIO:

Registrar si se realiza un cambio referente a equipos, reactivos y demás que modifiquen el presente protocolo.

N ^o	Descripción	Página (s)	Fecha	Responsable (Firma)
01				
02				
03				
04				

3. RESPONSABILIDAD:

El procedimiento a llevar a cabo debe ser realizado por personal competente en el área de cultivo celular animal. El personal debe ser previamente entrenado en procedimientos básicos de manipulación de tejido y técnicas de aislamiento celular.

4. GLOSARIO Y SIGLAS:

DMEM Por sus siglas en inglés “Dulbecco's modified Eagle's medium”, es un medio de cultivo enriquecido con aminoácidos y otros componentes esenciales para el crecimiento celular.

Se destina al cultivo de células humanas y de otros animales.

Epilife Medium Medio de cultivo específico para queratinocitos (células epidérmicas).

HK Human keratinocyte / Queratinocitos humanos

HGKS Human Growth keratinocyte suplement. / Suplemento adicionado al medio de cultivo para queratinocitos.

5. CONTENIDO:

5.1. GENERALIDADES:

Se describe el procedimiento general por medio del cual a partir de una muestra de tejido vivo de piel (sin distinción de ubicación) donado por una persona quien previamente debe ser informada del objetivo de la investigación, así como también la lectura y firma voluntaria del consentimiento informado, se extraen de manera los queratinocitos ubicados en la epidermis.

El tejido extraído se manipula de tal forma que conserve sus propiedades físicas hasta ser tratado física y químicamente (por la acción de enzimas) en el laboratorio de cultivo celular para desprender la epidermis, capa a partir de la cual se van a obtener los queratinocitos de interés.

Las células obtenidas se sembrarán según sea la necesidad en frascos de cultivo de 25 cm² o 75 cm² o en cajas de Petri

5.2. DESCRIPCIÓN:

5.2.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO:

La extracción de células a partir de un tejido implica la disgregación, por diferentes métodos de dicho tejido, a fin de obtener las unidades que lo componen, siendo en este caso los queratinocitos y en menor cuantía otros tipos celulares que también se encuentran presentes en la piel. Dichas células se utilizarán posteriormente para su cultivo.

El procedimiento se realiza en un cuarto de cultivo con un nivel de bioseguridad

tipo II y temperatura controlada de 20°C ± 2°C.

5.2.2. EQUIPOS, REACTIVOS, MATERIALES Y VESTIMENTA:

5.2.2.1. Equipos:

Micropipetas (20 µl, 200 µl, 1000 µl)

Cabina de flujo laminar.

Incubadora con CO₂

Centrífuga de mesa.

Cajas de Petri.

Pipeteador.

Kit de microcirugía.

Baño termostataado (Baño maría).

Microscopio óptico invertido.

Balanza analítica.

5.2.2.2. Reactivos:

Tabla 1. Reactivos y temperaturas de almacenamiento.

Reactivo	Marca	Temperatura
DMEM	Gibco o Lonza	4°C ± 2
Tripsina	Sigma	4°C ± 2
SBF	Gibco o biowittaker	4°C ± 2
PBS	Gibco	4°C ± 2
HBSS	Gibco o Lonza	25°C ± 2
Epilife medium	Life Technologies	4°C ± 2
HGKS	Life Technologies	4°C ± 2
Colagenasa IA	Sigma	4°C ± 2
Matrigel	BD Biosciences	4°C ± 2

5.2.2.3. Materiales:

Tubos Falcon de 15 - 50 mL estériles.

Puntas estériles (10, 20, 200 y 1000 µL)

Pipetas Pasteur estériles.

Pipetas de 5 ml y de 10 ml estériles.

Frascos de cultivo de 25 o 70 cm² estériles.

Cajas de Petri de 50 – 100 mm de vidrio estériles.

Recipientes para descartar material contaminado.

Recipiente para descartar material utilizado.

Cámara Neubauer

Parafilm.

5.2.2.4. Vestimenta:

Bata de laboratorio para utilizar exclusivamente en el cuarto de cultivo.
Zapatos utilizados únicamente para ingresar al cuarto de cultivo.
Guantes de latex o nitrilo.
Gafas de seguridad.

5.2.3. ALISTAMIENTO DEL ÁREA:

Antes de realizar el procedimiento descrito se debe verificar lo siguiente:

- 5.2.3.1. Área de trabajo:** la limpieza debe efectuarse como se indica en el protocolo correspondiente a la limpieza tanto de la cabina de flujo laminar, como del cuarto de cultivo.
- 5.2.3.2. Reactivos:** Los reactivos deben retirarse de su sitio de almacenamiento y ser aclimatados a una temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ antes de emplearse. (Se debe tener especial cuidado con la utilización del Matrigel®)
- 5.2.3.3. Materiales:** No deben presentar signos de deterioro o de uso previo. Todo material esterilizado debe estar en su empaque individual correspondiente sin estar abierto.
Las puntas para utilización de micropipetas, deben tener fecha máxima de esterilización de 15 días, transcurrido este tiempo deben enviarse de nuevo a re-esterilizar.

5.3. DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA:

1- Toma de muestras: humano.

- 1.1. Lectura y firma del consentimiento informado.
- 1.2. Reunión con voluntario y médico dermatólogo en las instalaciones del laboratorio de investigación.
- 1.3. El médico dermatólogo con ayuda de un punch para biopsia de 3,0 mm de diámetro debe limpiar el área con yodopovidona solución, aplicar un anestésico local (5mL lidocaína) y verificando la ausencia de sensación en el área, tomar una muestra de un diámetro aproximado de 3,0 mm de la región lumbar de la espalda del voluntario.
- 1.4. Retirar la muestra y sumergirla en etanol al 70% durante 4 segundos a modo de eliminar contaminación.
- 1.5. Almacenar la muestra en un tubo Falcon estéril de 50 mL con 15 mL de DMEM no suplementado (Sin suero fetal bovino).
- 1.5. Sellar tubo con Parafilm a fin de evitar la contaminación, limpiar el exterior

con alcohol al 70% y rotular con la fecha correspondiente.

1.6. En caso de no encontrarse en las instalaciones de la Universidad Icesi, transportar a temperatura de 4°C en el menor tiempo posible hasta las instalaciones de investigación de cultivo celular de la Universidad Icesi.

2- Alistamiento del área de trabajo.

Se debe entrar al cuarto de cultivo siguiendo las normas preestablecidas en cuanto a la vestimenta apropiada: bata y zapatos de uso exclusivo en el laboratorio. Se implementa el protocolo de limpieza ya establecido.

2.1. Limpiar la cabina de flujo laminar tipo 2 con alcohol etílico al 70% cubriendo todas las superficies e ingresar los implementos como micropipetas y recipientes de desecho, previamente sanitizados con alcohol etílico al 70%

2.2. Cerrar la cabina de flujo laminar y configurar en el panel de comandos de la misma la exposición a la radiación UV por 15 minutos.

2.3. Una vez transcurridos los 15 minutos de exposición a la radiación UV, encender el sistema de ventilación del equipo y empezar a trabajar en el equipo transcurridos 10 minutos una vez encendida la ventilación de la cabina.

2.4. Ingresar a la cabina de flujo laminar tipo 2, los reactivos necesarios para la disgregación mecánica y enzimática, consistentes en: kit de cirugía, medios de cultivo específicos, solución enzimática de colagenasa y tripsina, material estéril: pinzas, bisturí, tubos Falcon de 15 y 50 mL, puntas de micropipeta.

3- Disgregación mecánica y enzimática

3.1. Retirar el medio de cultivo en el cual viene el tejido y descartarlo en el frasco de desechos correspondiente.

3.2. Tomar una caja Petri de 50mm, retirar la tapa y depositar 4 mL de medio de cultivo específico para queratinocitos (Gibco®, Grand Island, NY, USA) suplementado con HGKS (Human Growth Keratinocytes Supplement - Gibco®, Grand Island, NY, USA)

3.3. Tomar el tejido con ayuda de unas pinzas estériles y depositarlo en tapa de la caja Petri de 100mm (numeral 3.3)

3.4. Lavar el tejido con el medio depositado en la caja de Petri (numeral 3.2)

utilizando una micropipeta de 200 μ L.

3.5. Utilizando pinzas curvas de microcirugía previamente esterilizadas, aplanar el tejido ubicando la epidermis en el fondo de la tapa de la caja de Petri (numeral 3.3).

3.6. Retirar grasa y contaminantes macroscópicos utilizando pinzas lisas de microcirugía previamente esterilizadas. Tener especial cuidado en evitar que el tejido se seque, razón por la cual se debe lavar constantemente con el medio depositado en la caja de Petri (numeral 3.2).

3.7. Cortar el tejido en pequeñas secciones (cortar tejido en tiras de 0.5 cm x 1.5 cm en caso de disponerse de gran cantidad de tejido) con ayuda de un bisturí de hoja 24, y llevarlos a una caja de Petri.

3.8. Lavar las secciones con solución salina estéril y descartar la solución salina empleada en el frasco de desechos correspondiente.

3.9. Preparar 20 mL de solución de colagenasa tipo 1A (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, USA) al 0,2%. Nota: debe tenerse en cuenta las unidades de enzima/mg de sólido, así mismo se ajustará la cantidad a pesar.

3.10. Preparar 20 mL de solución de tripsina (Gibco®, Grand Island, NY, USA) al 0,5% (g/L) en un tubo Falcon estéril.

3.11. Mezclar en un tubo Falcon estéril de 50 mL las dos soluciones de enzima preparadas previamente.

3.12. Adicionar los fragmentos de tejido previamente seccionados a un tubo Falcon estéril de 15 mL que contenga 5-7 mL de la mezcla de las enzimas preparadas previamente (numerales 3.9-3.11).

3.13. Incubar en baño María a una temperatura de 37°C por 30 minutos. Agitar vigorosamente el tubo que contiene los fragmentos y la solución enzimática cada 5 minutos.

3.14. Transcurrido el tiempo de incubación, agitar el contenido del tubo gentilmente con ayuda de una micropipeta y dejar asentar los fragmentos más grandes.

3.15. Traspasar a otro tubo Falcon estéril la suspensión celular y adicionar la solución de inactivación: medio de cultivo DMEM suplementado al 5% con Suero fetal bovino (Gibco®, Grand Island, NY, USA)

3.16. Tomar los fragmentos restantes de tejido (numeral 3,14) y adicionar 25-50 mL de la mezcla de las enzimas preparadas previamente (numerales 3.9-3.11).

3.17. Incubar en baño María a una temperatura de 37°C por 30 minutos. Agitar vigorosamente el tubo que contiene los fragmentos y la solución enzimática cada 5 minutos.

3.18. Transcurrido el tiempo de incubación, traspasar a otro tubo Falcon estéril la suspensión celular y adicionar la solución de inactivación: medio de cultivo DMEM suplementado al 5% con Suero fetal bovino (Gibco®, Grand Island, NY, USA)

3.19. Centrifugar por 10 minutos a 1200RPM las suspensiones celulares.

3.20. Resuspender el pellet en 1-2mL de medio de cultivo específico para queratinocitos suplementado con HGKS al 1% y penicilina-estreptomomicina/anfotericina B al 1%.

4- Determinación de viabilidad celular

En este segmento se utiliza un colorante que permita identificar células vivas/células muertas, para su observación bajo el microscopio óptico invertido. Se lleva a cabo mediante la utilización de cámaras de conteo celular, en donde se determina con esto la cantidad de células disponibles para realizar el cultivo.

4.1. Tomar 90µL del colorante azul de tripano al 0.4% (Lonza®, Walkersville, MD, USA.) utilizando una micropipeta y disponerlos en un portaobjetos de vidrio estéril.

4.2. Tomar 10 µL de la suspensión celular previamente obtenida tras la resuspensión del pellet (numeral 3.20) utilizando una micropipeta y disponerlos en el mismo portaobjetos de vidrio estéril.

4.3. Homogenizar utilizando la micropipeta para asegurar una correcta dispersión del colorante y las células.

4.4. Realizar el conteo utilizando una Cámara de Neubauer, teniendo en cuenta las respectivas diluciones y factores de conversión.

5- Preparación de matriz de revestimiento y cultivo celular

Dadas las condiciones de almacenamiento del Matrigel, es necesario que todo material que va a entrar en contacto con este reactivo se encuentre pre-acondicionado a baja temperatura (mantener en hielo a una temperatura de -4°C), como lo son las pipetas estériles, puntas de micropipetas y tubos Falcon estériles.

- 5.1. Alicuotar 270 - 350µL de un vial de Matrigel (BD Biosciences®, Billerica, MA, USA) en un tubo Falcon estéril de 50 mL y adicionar 25 mL de medio de cultivo DMEM (Lonza® Group Ltd, Brandenburg, KY, USA) frío.
- 5.2. En una nevera con hielo, disponer los platos de cultivo a sembrar.
- 5.3. Adicionar la solución de revestimiento (numeral 5.1) preparada anteriormente, 8 mL para cajas Petri de 10,0 cm de diámetro, 2,6 mL para cajas Petri de 5,0 cm de diámetro, 1,3 mL para cajas Petri de 3,5 cm de diámetro; 0,3 mL para platos de cultivo de 24 pozos; 0,5 mL para platos de cultivo de 12 pozos. (El cálculo se realiza con base al área efectiva de cultivo.)
- 5.4. Distribuya el líquido por toda la superficie del plato. Evite burbujas (Si hay burbujas, reventarlas con punta de pipeta fría)
- 5.5. Cerrar los frascos de cultivo e incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por al menos 1 hora antes de usarlos.
- 5.6. Una vez formada la película en el fondo de los frascos de cultivo, aspirar la solución de revestimiento teniendo especial cuidado de no remover del fondo del plato la película formada.
- 5.7. Sembrar las células a una densidad de siembra apropiada: 20000/cm².
- 5.8. Adicionar el medio de cultivo específico de queratinocitos suplementado.

Nota: no remover el líquido si no se van a usar los platos inmediatamente. Pueden almacenarse máximo por una semana a 4°C sellados con parafilm, para evitar la deshidratación.

6. DOCUMENTOS DE REFERENCIA:

- 6.1. Assay Methods "Protocol: Human Embryonic Stem Cell Culture" BD Biosciences. En: https://www.daigger.com/Portals/0/Literature/7117A_IM_BECTON%20DI%20CKINSON.pdf
- 6.2. Isolation, Primary Culture, and Cryopreservation of Human Keratinocytes, Life technologies. En: <http://www.lifetechnologies.com/co/en/home/references/protocols/cell-culture/primary-cell-protocols/keratinocyte-protocols/isolation-primary-culture-and-cryopreservation-of-human-keratinocytes.html>
- 6.3. Surface Areas of Cell Culture Vessels. En: <http://www.pottslab.org/protocols/Cell%20Culture/Surface%20Areas%20of%20Cell%20Culture%20Vessels.pdf>

7. LISTA DE REGISTROS:

- Formato de limpieza del cuarto de cultivo (si aplica).
- Cuaderno de registro experimental.
- Notas de cambio.

8. ANEXOS:

Consentimiento informado para donación de tejido para investigación. (Anexo 1)

ANEXO 3: APROBACIÓN COMITÉ DE ÉTICA PROYECTO “EVALUACIÓN PROTEÓMICA Y FUNCIONAL DE LOS FENOMENOS DE GLICOSILACIÓN TIPO O-GLCNAC Y SUS IMPLICACIONES TERAPEÚTICAS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE PRECONDICIONAMIENTO, ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN CEREBRAL”



Santiago de Cali, Febrero 25 de 2013
CIECUAE-009/2013

Dr. César Augusto Arango Dávila, MD Psiquiatra, MSc, PhD
Investigador principal -
Dr. Juliana Rengifo Gómez, MSc, PhD
Dr. Alejandro Vera González, MD, Estudiante de Doctorado
Cali

Asunto: Aprobación de Proyecto -Isquemia Cerebral con preconditionamiento

El día 8 de Febrero del presente año, los miembros del CIECUAE de la Universidad Icesi, se reunieron y aprobaron el siguiente proyecto de investigación, dando cumplimiento a la Ley 84 de 1989 y a la resolución de Rectoría N° 847 (9 de julio de 2012):

"Evaluación proteómica y funcional de los fenómenos de glicosilación tipo O-glcNAc y sus implicaciones terapéuticas en un modelo experimental de preconditionamiento, isquemia y reperfusión cerebral" -Versión 2.

La presente se firma, el día (25), mes (Febrero), del año (2013)

Cordialmente,

Gabriel Jaime Echeverri, M.D
Presidente -CIECUAE- Universidad Icesi