

Estandarización del proceso de aislamiento y cultivo de miofibras de rata con sus células satélites a partir del músculo extensor largo de los dedos (EDL)

Giovanny Andres Marmolejo Garrido

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Farmacéuticas

2018

Estandarización de un proceso de aislamiento y cultivo de miofibras de rata con sus células satélites a partir del músculo extensor largo de los dedos (EDL)

Giovanny Andres Marmolejo Garrido

Tutor:

Julián Arbey González Ospina

Universidad Icesi

Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de Ciencias Farmacéuticas

2018



APROBADO POR:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Julio C.', is written over a horizontal line.

Director(a) del Proyecto.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Amparo', is written over a horizontal line.

Evaluador (a)



Proyecto de Grado II

FACULTAD
DE CIENCIAS
NATURALES

Estandarización del proceso de aislamiento y cultivo de miofibras de rata con sus células satélites a partir del músculo extensor largo de los dedos (EDL)

Giovanni Andrés Marmolejo G.^a, Julián Arbey González^b

^a Programa de Química Farmacéutica, Departamento de Ciencias Farmacéuticas
Universidad Icesi, Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Palabras claves:

Miofibras, Células
satélite, Fibroblastos,
Cultivos in-vitro,
Viabilidad celular,
renovación muscular,
EDL, Aislamiento, Ratas
Wistar.

RESUMEN

Los ensayos *in-vitro* de células provenientes de tejidos animales, se han convertido en una herramienta que permite la evolución de métodos moleculares que logran facilitar el trabajo por medio de cultivos celulares y cultivos de tejidos. Por ello, en este proyecto se describe el procedimiento para el aislamiento y cultivo de miofibras con sus células satélite a partir de ratas Wistar. Donde se estandarizó el proceso de extracción, aislamiento y cultivo de miofibras en un medio apropiado para su mantenimiento, logrando conservarlas en cultivo por 30 días con crecimiento celular y expresión de células satélite, demostrando que el procedimiento desarrollado es apropiado para el mantenimiento de células viables.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Tejido Muscular

El tejido muscular es responsable del movimiento de los organismos y de sus órganos. Dentro de su composición se encuentran unas células denominadas miocitos o fibras musculares quienes tienen la capacidad de contraerse. Su capacidad contráctil depende de su asociación entre dos filamentos, los de actina y los de miosina II. El tejido muscular se divide en tres tipos: esquelético, liso y cardiaco. Se diferencian por su aspecto y forma. Donde las células presentes en el músculo esquelético son muy largas y estriadas, las células del músculo cardiaco, o cardiomiocitos, son mucho más cortas, son

ramificadas y poseen también estrías, y las células musculares lisas son fusiformes y sin bandas transversales, de ahí el nombre de músculo liso⁽¹⁾.

Las células musculares, aunque pueden incrementar y disminuir su tamaño (hipertrofia), no se suelen dividir en condiciones normales. En la vida postnatal la reparación y crecimiento, es decir, aumento del número de células del tejido muscular, se debe a otras células denominadas células satélite. Éstas son células mononucleadas que se localizan asociadas a las células musculares estriadas, y se localizan entre su membrana celular y la lámina basal. Actúan como células madre adultas que tienen la capacidad de producir nuevas células estriadas maduras con capacidad contráctil⁽¹⁾.

*Correspondencia autores a:

Edificio L, Universidad Icesi, Santiago de Cali, Colombia
e-mail: jgonzalez@icesi.edu.co

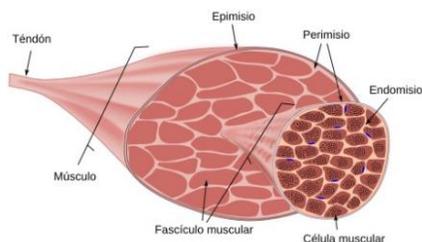


Imagen 1. Organización del músculo esquelético ⁽¹⁾.

1.2 Células Satélite

Las células satélite son células madre específicas del músculo esquelético localizadas entre la lámina basal muscular y las miofibras en estado activo e inactivo (G_0). Las células satélite se originan a partir de somitas o del mesodermo craneal y expresan factores en el núcleo que son usados como marcadores moleculares como lo son Pax3+ y Pax7+, células progenitoras musculares ⁽²⁾.

Estas células madre son necesarias para el crecimiento, el mantenimiento y la regeneración del músculo esquelético. A su vez también se pueden distinguir en función de sus características celulares, por ejemplo, su alta relación núcleo-citoplasma ⁽³⁾. Las células satelitales inicialmente proporcionan mioblastos para el crecimiento muscular, antes de convertirse en mitóticamente inactivas a medida que el músculo madura. En los adultos, se pueden reclutar células satélite para suministrar mioblastos para la homeostasis rutinaria de la fibra muscular o para las demandas más esporádicas de hipertrofia o reparación de las miofibras, además de producir progenie destinada a la diferenciación, las células satélite también mantienen su propia población por auto renovación, cumpliendo así los criterios definitorios de una célula madre como se describió anteriormente ⁽⁴⁾.

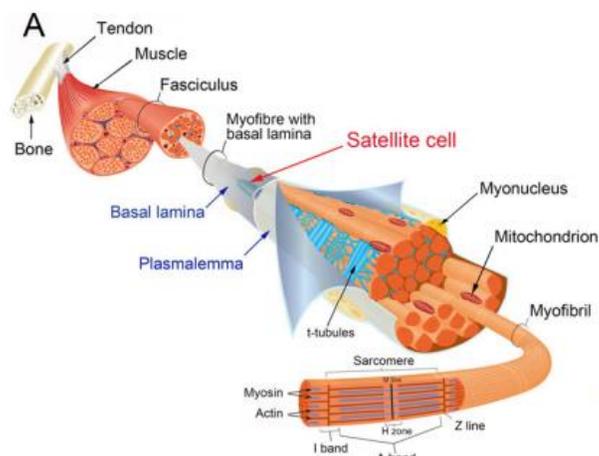


Imagen 2. Estructura muscular de una célula satélite⁽⁴⁾.

1.3 Regeneración de las células satélite

Las células madre pueden dividirse y autorrenovarse de dos maneras: división celular asimétrica y división celular simétrica. En la división de células asimétricas, una célula madre parental da lugar a células hijas doblemente diferentes: una célula madre hija y otra célula hija destinadas a la diferenciación. En la división celular simétrica, una célula madre parental se divide en dos células madre hijas de igual raíz. De ninguna manera, el número de células madre se mantiene en un nivel constante. La auto renovación de células madre por división celular asimétrica se ejemplifica por células madre neuronales. La auto renovación de las células madre por división celular simétrica se observa frecuentemente en células madre hematopoyéticas y células madre de la línea masculina de mamífero. La capacidad de auto renovación de las células satélite está claramente demostrada por su notable capacidad para mantener la capacidad de regeneración muscular⁽⁵⁾.

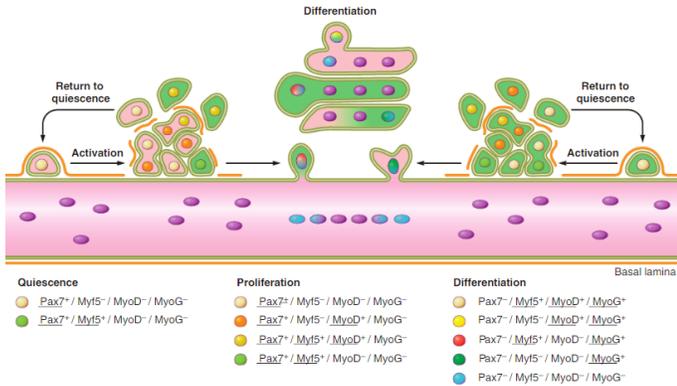


Imagen 3. Activación y diferenciación de las células satélite (5).

2. METODOLOGIA

2.1 Modelo Experimental

En el presente proyecto se utilizaron 2 ratas Wistar con pesos de 320 y 360 gramos, los biomodelos se mantuvieron en el bioterio de la Universidad Icesi con la aprobación del comité de ética animal de la universidad Icesi. Estos se mantuvieron en ayuno por 8-10 horas antes de dar inicio a la ejecución del proyecto.

2.2 Preparación de reactivos y materiales

La metodología desarrollada para la elaboración del proyecto se obtuvo a partir de adaptaciones realizadas a los protocolos propuestos por Yann Simon et al⁽⁶⁾ y Paul Keire et al⁽⁷⁾.

2.3 Preparación de medios de cultivo y de lavado

- **Medio de lavado:** se prepararon 9 mL de solución salina con 1% de penicilina/estreptomicina.
- **Medio de digestión:** a partir de un tubo falcón que contiene 30 mg de colagenasa tipo I en 1 ml, se tomaron 0,33mL y se completó con DMEM para alcanzar un volumen final de 10mL, obteniendo una concentración de 0,1%P/V.

- **Medio de Cultivo:** Para un volumen de 30mL, se suplemento un DMEM rico en glucosa con 20% de suero fetal bovino (SFB) ,10% de suero de caballo (HS), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de l-glutamina y 2% de extracto embrionario de pollo (CEE).

2.4 Preparación para la extracción del EDL

Se procede a rociar con etanol al 70% las extremidades del biomodelo a trabajar, posteriormente se retira el vello mediante el uso de cuchillas de manera que sea evidenciable el musculo a extraer. La rata fue anestesiada en una cámara adecuada que contenía isoflurano al 30%, luego se trasladó a un sistema de sujeción donde se inmovilizaron sus extremidades facilitando su manejo.

2.5 Extracción del EDL

Mediante el acompañamiento de un profesional capacitado en cirugía, se procedió a realizar la extracción del musculo EDL, tras lograr exponer el musculo objetivo, se procede a extraerlo con precaución evitando dañar el tejido a trabajar.

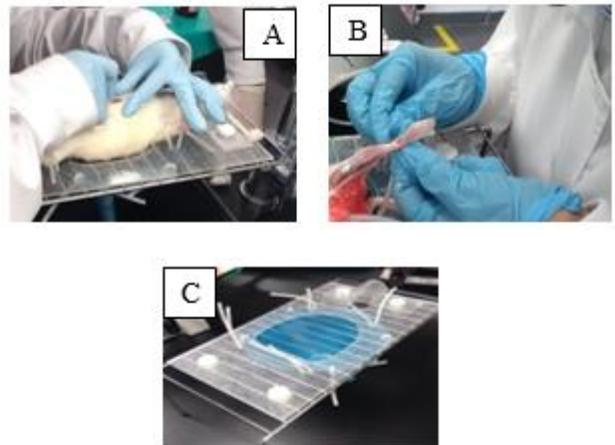


Imagen 4. A) Sujeción del biomodelo. B) Procedimiento de extracción del EDL de rata Wistar. C) Soporte para cirugía.

*Correspondencia autores a:
Edificio L, Universidad Icesi, Santiago de Cali, Colombia
e-mail: jgonzalez@icesi.edu.co

2.6 Digestión Enzimática

Para la digestión muscular, se adicionan 3 mL del medio de digestión a cada musculo EDL extraído, las placas se llevan a incubar por 1,5 h a 2 h a 37°C y 5% CO₂. Se realizó un seguimiento a las placas mediante el uso de un microscopio cada 10 minutos después de la primera media hora, asegurando una apropiada digestión enzimática.

2.7 Cultivo Celular

En primera instancia se procede a inactivar la solución de colagenasa con una mezcla de DMEM y SFB al 10%. Posteriormente mediante el uso de una pasteur de vidrio autoclavada y el acompañamiento visual de un microscopio, se procede a pasar las fibras libres a una placa de 24 pozos adicionando una cantidad suficiente de fibras por pozo y completando con medio de cultivo.

Las fibras fueron monitoreadas semanalmente durante 30 días con cambio de medio cada 8 días.

3. RESULTADOS

- Extracción del EDL

El procedimiento de extracción del musculo diana fue exitoso logrando extraerlo en perfecto estado sin signos de lesión alguna. Los músculos EDL fueron llevados a placas Petri individuales para su posterior tratamiento.



Imagen 5. Músculos EDL de rata Wistar.

- Digestión enzimática

La digestión del musculo se realizó utilizando una solución de colagenasa al 0,1% P/V arrojando los

siguientes resultados para las dos extracciones realizadas.

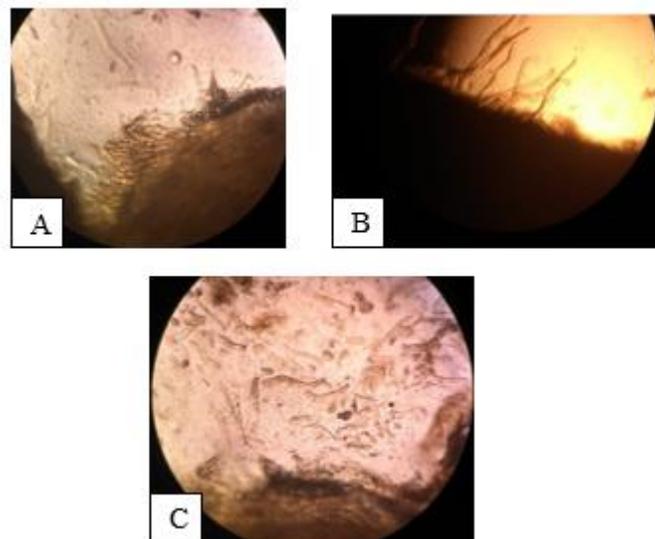


Imagen 6. A) Digestión Enzimática para el biomodelo 1. B) Digestión enzimática para el biomodelo 2. C) Fibras liberadas tras 1 hora de contacto con la solución de colagenasa. (Fotografías bajo un objetivo de 10X).

- Cultivo Celular

Los resultados obtenidos para el cultivo celular a partir del musculo EDL para el biomodelo 1 y 2, se presentan en las tablas 1 y 2 respectivamente.

*Correspondencia autores a:

Edificio L, Universidad Icesi, Santiago de Cali, Colombia
e-mail: jgonzalez@icesi.edu.co

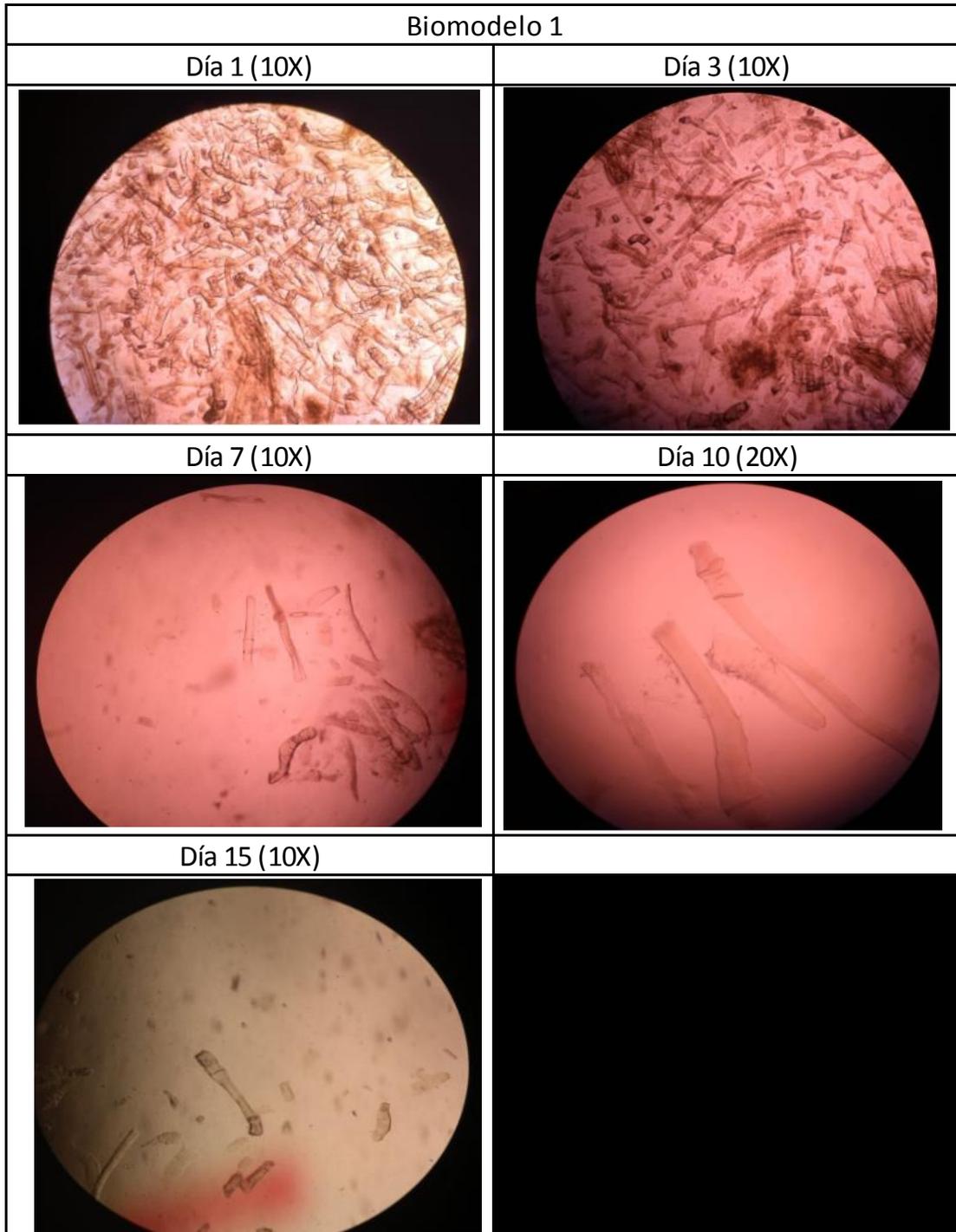


Tabla 1. Cultivo de miofibras para el biomodelo 1.

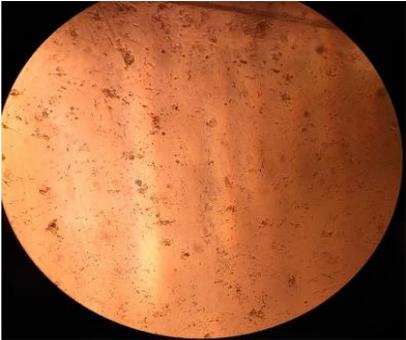
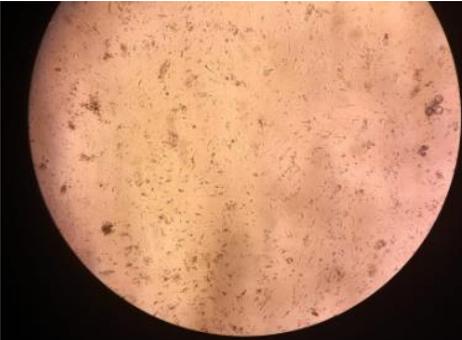
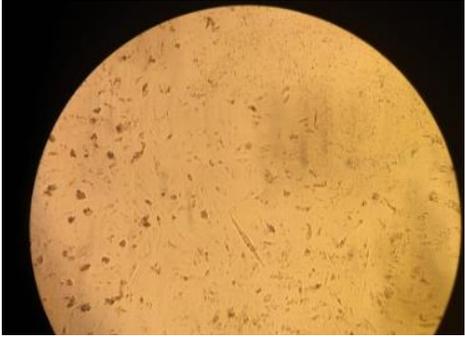
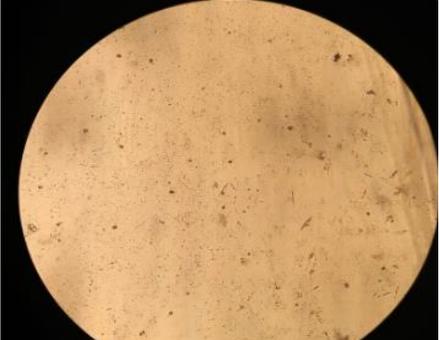
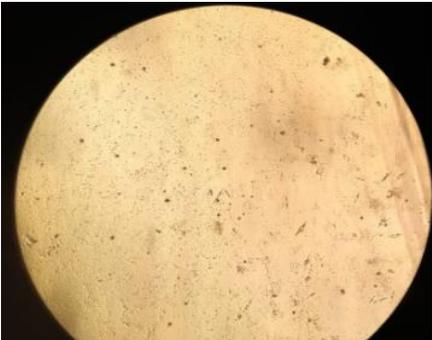
Biomodelo 2		
Día 1 (20X)	Día 5 (20X)	Día 7 (20X)
		
Día 10 (10X)	Día 15 (10X)	Día 20 (10X)
		
Día 25 (10X)	Día 30 (10X)	
		

Tabla 2. Cultivo de miofibras para el biomodelo 2.

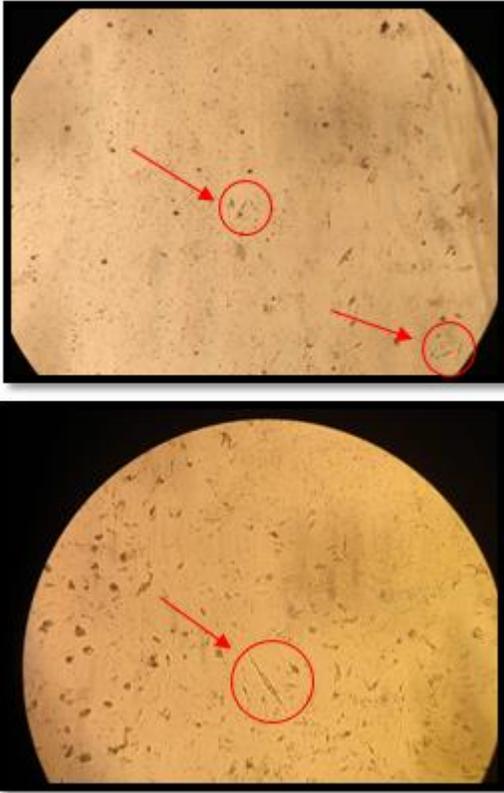


Imagen 7. Crecimiento de células satélite tras 15 y 20 días de Cultivo.

4. DISCUSIÓN

Para el correcto entendimiento de la estandarización del protocolo desarrollado, es indispensable abordar los puntos críticos que surgieron en el proceso de digestión enzimática y cultivo celular.

En primera instancia, la digestión enzimática fue el proceso más meticuloso del protocolo, esto debido al control de factores tales como: el tamaño del músculo, la hipercontracción de las fibras y la sobre digestión enzimática.

El tamaño del músculo resultó ser un inconveniente en el proceso de adición del medio de digestión, generando que este solo actuara en la periferia del tejido. En trabajos realizados por Yann Simon et al⁽⁶⁾, se observa que se realiza el proceso con un músculo de ratón y que una mínima cantidad de medio de digestión es suficiente para cubrir a plenitud el músculo extraído. Por ello, dado que se trabajó con músculo de rata y esta presenta grandes diferencias

en dimensiones, fue necesario realizar cortes longitudinales en el sentido de las fibras, de manera que se fragmento el músculo en 3 porciones generando que el medio de digestión tuviera mayor contacto y pudiera actuar de una manera más efectiva.

La hipercontracción de las fibras puede generarse tras someter a un estrés mecánico significativo a las células musculares, esto se evidencio en la primera extracción donde fue necesario triturar mecánicamente el músculo para que este pudiera liberar una mayor cantidad de fibras al medio. Como resultado se obtuvieron fibras contraídas y aglomeradas, de manera que el pasaje individual de estas fibras a placas de cultivo resultó dificultoso. Este problema estuvo íntimamente relacionado con la digestión enzimática, donde inicialmente se planteó una concentración de 0,05% P/V de solución de colagenasa, la cual resulto ineficiente para llevar a cabo el protocolo. Lo anterior debido a que tras 1 hora de digestión las fibras no se liberaban de manera eficiente, por lo que resulto necesario acompañar el proceso con trituración mecánica, razón que explica la hipercontracción en el proceso. Además, dado que el proceso de digestión resultó ineficiente se alargó el periodo de contacto con la solución de colagenasa pudiendo causar daño en el tejido.

La hipercontracción de las fibras, asociada a factores como el tiempo de digestión y la trituración mecánica, se reproducen en la misma medida en protocolos como el de Yann Simon et al⁽⁶⁾ y Paul Keire et al⁽⁷⁾, donde se hace hincapié en no exceder la trituración del músculo mediante esfuerzo mecánico. Por lo cual, para corregir el problema en el proyecto se planteó una segunda concentración de colagenasa del 0,1% P/V, una concentración menor a la utilizada en los protocolos descritos anteriormente (0,2% P/V). Tras realizar este ajuste las fibras comenzaron a liberarse sin necesidad de realizar un acompañamiento con trituración mecánica, obteniendo fibras libres fáciles de llevar a medios de cultivo tal como se observa en la **imagen 6, B**. Por ello, se cambian las placas de cultivo individuales, a

*Correspondencia autores a:
Edificio L, Universidad Icesi, Santiago de Cali, Colombia
e-mail: jgonzalez@icesi.edu.co

placas de 24 pozos donde se reduce el volumen de medio de cultivo y se ajusta a un número suficiente de fibras por pozo facilitando su control rutinario.

El segundo punto crítico en el proyecto corresponde al cultivo de células satélite, donde para el primer ensayo no fue posible su cultivo dado que la composición del medio no era la adecuada para su crecimiento. Dicho medio constaba de 10% FBS, 1% Penicilina/Estreptomina, 1% l-glutamina y 2% CEE, donde se prescindía del HS dado que protocolos homólogos como el desarrollado por Hindi L et al ⁽⁸⁾, no contemplaban dicho reactivo y obtenían fibras adheridas tras un periodo de cultivo.

Por ello, se ajustan las concentraciones y se incorpora HS para el trabajo con el segundo biomodelo, donde tal y como se observa en la **imagen 7**, tras 15 días de cultivo se comienzan a expresar las células satélite en el medio. Cabe resaltar que la cantidad de células satélites obtenidas fue muy reducida, donde aproximadamente un 95% de las células correspondía a fibroblastos. Dicha limitación puede solucionarse mediante la implementación de factores de crecimiento como el FGF2, factor de crecimiento de fibroblastos básico tipo 2, el cual es un agente que estimula la supervivencia y crecimiento celular.

Por otra parte, el proceso de asepsia y limpieza de los equipos resultó indispensable en el proyecto permitiendo que no se evidenciara contaminación en ninguno de los dos ensayos realizados. En el proceso de pasaje de células para su cultivo, es indispensable mantenerlas en un ambiente con flujo laminar o en su defecto no mantenerlas más de 3 minutos fuera de la incubadora, de manera que se mantenga su estado de inocuidad.

Por último, cabe resaltar que mediante los cultivos obtenidos no fue posible realizar un conteo celular ni cálculos de viabilidad. Lo anterior se debe a que las fibras libres no lograron adherirse al medio, dado que este no contaba con factores de crecimiento ni una matriz que les facilitara su adhesión. Por ello, el alcance de este proyecto se delimita hasta lograr la expresión y el mantenimiento de células satélite.

5. CONCLUSIÓN

Mediante el protocolo obtenido, tras realizar los ajustes necesarios, fue posible lograr la extracción y el cultivo de miofibras libres junto con sus células satélites, sin embargo, es indispensable tener presente los puntos críticos mencionados, realizando los ajustes necesarios que faciliten futuras réplicas del protocolo, para obtener resultados aceptables y reproducibles.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Megías M, Molist P, Pombal M. Atlas de Histología Animal y Vegetal. 1st ed. Vigo; 2017.
2. Suzuki Y, Fukada S, Takeda S. Muscle Satellite Cells and Duchenne Muscular Dystrophy [Internet]. intechopen. 2012 [cited 7 October 2018]. Available from: http://cdn.intechopen.com/pdfs/36742/InTech-Muscle_satellite_cells_and_duchenne_muscular_dystrophy.pdf
3. Dumont N, Bentzinger F, Sincennes M, Rudnicki M. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration [Internet]. Comprehensive Physiology. 2015 [cited 14 October 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26140708>
4. Relaix F, Zammit P. Satellite cells are essential for skeletal muscle regeneration: the cell on the edge returns centre stage [Internet]. Semantic Scholar. 2012 [cited 2 October 2018]. Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/cdd1/2e5611d39e0a965a497c42688fe99b429264.pdf>
5. Yin H, Price F, Rudnicki M. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche [Internet]. Researchgate. 2013 [cited 10 October 2018]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/234099555_Satellite_Cells_and_the_Muscle_Stem_Cell_Niche
6. Simon Y, Hindi S, Mann A, Kumar A. Isolation, Culture, and Staining of Single Myofibers

*Correspondencia autores a:

[Internet]. Bioprotocol. 2016 [cited 6 October 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5094811/>

7. Keire P, Shearer A, Shefer G, Yablonka R. Isolation and culture of skeletal muscle myofibers as a means to analyze satellite cells [Internet]. NCBI. 2013 [cited 3 October 2018]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23179849>
8. Hindi L, McMillan J, Afroze D, Hindi S, Kumar A. Isolation, Culturing, and Differentiation of Primary Myoblasts from Skeletal Muscle of Adult Mice [Internet]. Bioprotocol. 2017 [cited 5 October 2018]. Available from: <https://bio-protocol.org/e2248>