



## **Aislamiento de células endoteliales cerebrales de ratas para cultivo primario**

*Generado por Juan Zolezzi y Nivaldo Inestrosa, Centro de Envejecimiento y Regeneración CARE, FCB*

### **Materiales**

- 1.- Se utiliza mascarilla, delantal y guantes.
- 2.- Instrumental quirúrgico esterilizado con solución acuosa de etanol al 70%. Este debe incluir tijera mayo, tijera fina,
- 3.- Anestésico
- 4.- Rasuradora eléctrica
- 5.- Gasa y algodón estériles
- 6.- Etanol 70%
- 7.- Medios de cultivo.

### **Procedimientos**

1.- Eutanasia: Posterior a la inducción de anestesia con isoflurano 5%, se procede a colocar al animal en decúbito esternal, se fija la cabeza mediante compresión de la zona cervical, a nivel de la articulación atlanto-occipital. Mediante tracción mecánica del cuerpo del animal, se secciona la médula espinal, generando la muerte del animal. En los procedimientos posteriores es importante minimizar el tiempo transcurrido entre eutanasia y extracción de las células endoteliales, el cual puede afectar la sobrevivencia de las células durante el proceso de extracción, disminuyendo el rendimiento por animal, así como afectar las etapas de purificación y proliferación consideradas como las primeras fases del cultivo.

3.- Decapitación: Posterior a la eutanasia del animal, se procede con la decapitación, para lo cual se utiliza una tijera mayo, con la cual se separa la cabeza del resto del cuerpo, a nivel de la articulación atlanto-occipital o atlanto-axial.

4.- Debridación de piel y extracción del cerebro: A fin de evitar la contaminación del tejido cerebral, previo a la decapitación, se rocía la cabeza y cuello del animal con etanol al 70%. Mediante el uso de tijera fina, se procede a debridar la piel exponiendo el cráneo. El procedimiento de extracción del cerebro se realiza bajo campana de flujo laminar a fin de evitar la contaminación del material biológico. Mediante el uso de la misma tijera se realizan tres cortes. Dos de ellos en dirección rostral desde el foramen magno hacia el conducto acústico. El tercer corte se realiza a nivel del hueso frontal, en el punto determinando por el margen superior de las órbitas oculares. Posteriormente, con ayuda de un fórceps se procede a abrir la bóveda craneana. Nuevamente, con ayuda de la tijera fina, se corta el nervio óptico y con la ayuda de unas pinzas anatómicas se extrae el cerebro del animal. Éste es depositado en buffer de disección para la



### **Aislamiento de células endoteliales cerebrales de ratas para cultivo primario**

*Generado por Juan Zolezzi y Nivaldo Inestrosa, Centro de Envejecimiento y Regeneración CARE, FCB*  
posterior extracción de las células endoteliales. Los medios de disección y cultivo contienen antibióticos de amplio espectro a fin de minimizar los riesgos de contaminación secundaria del material obtenido.

5.- Una vez obtenido el cerebro, mediante disección fina en medio de disección a 4°C en base a HBSS, BSA y antibiótico se aísla la corteza cerebral, eliminando el cerebelo, meninges y cerebro medio. Las cortezas son homogenizadas mediante un homogeneizador tipo Dounce de 70 y 20  $\mu\text{m}$  de despeje y la suspensión resultante es sometida a una primera digestión en base a colagenasa/dispasa, DNasa y antibiótico por 30min. Posteriormente, la microvasculatura de la corteza es precipitada mediante centrifugación dependiente de densidad mediante el uso de una solución de 25%BSA/HBSS, logrando separar el parénquima cerebral y la mielina de la microvasculatura. El pellet obtenido es lavado con medio de disección 4°C y nuevamente sometido a una segunda digestión, con el mismo tipo de solución por 1hr. Posterior a un último lavado, las células son suspendidas en medio para célula endotelial (ECM) el cual consiste en DMEM/F12, FBS o ABS, bFGF, heparina, antibiótico y HEPES; contadas y sembradas en botellas de cultivo T75. Adicionalmente, durante los 4 primeros días se adiciona al medio concentraciones decrecientes de puomicina (4 y 2 $\mu\text{g/ml}$ ), a fin de purificar el cultivo endotelial, evitando la contaminación con fibroblastos o células gliales, realizándose 1 lavado entre ambas. Al quinto día se cambia el ECM y entre el quinto día y la confluencia (7<sup>o</sup>/8<sup>o</sup> día), se suplementa el medio con insulina, transferrina y selenio, a fin de favorecer la proliferación de las células endoteliales. Una vez alcanzada la confluencia, las células son tripsinizadas y sembradas en ECM en placas multipocillo e insertos transwell. Al día siguiente, el medio se cambia por ECM fresco, para eliminar detritos celulares, y al tercer día se agrega hidrocortisona (medio de diferenciación). Tres días después se realiza la caracterización molecular de las células endoteliales (12 pocillos, discos de 60mm y insertos transwell de 12mm, inmunofluorescencia, WB, PCR para PECAM1, ZO-1, OCLN y MDR1) y análisis de resistencia eléctrica transepitelial (células en insertos transwell) mediante un óhmetro comercial.

6.- Respecto al rendimiento obtenido por animal, tres ratas de 4-5 semanas son suficientes para sembrar una botella de cultivo T75, a partir de la cual, a confluencia, se obtienen 3x10<sup>6</sup> células. En base a esta cantidad se debe establecer el número de pocillos o placas a subcultivar considerando que deben ser sembradas a alta densidad (160x10<sup>3</sup> células/cm<sup>2</sup>).

Referencias: Camós y Mallolas, 2010, *Molecules*, doi: 10.3390/molecules15129104; Eigenmann DE, et al., 2013, *Fluids and Barriers on the CNS*, doi: 10.1186/2045-8118-10-33; Helms HC, et al., 2016, *J Cereb Blood Flow Metab*, doi: 10.1177/0271678X16630991).