



Memoria del XLVIII Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

## Aislamiento, purificación y cultivo de hepatocitos de rata.

Isolation, purification and culture of rat hepatocytes.

Vilchis-Landeros, María Magdalena <sup>1\*</sup>.

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.

\*Correspondencia. Edificio D, Facultad de Medicina, Circuito Escolar, Ciudad Universitaria, Coyoacan, CDMX, México.  
CP. 04510 Tel. +52 (55) 56 23 25 10, vilchisl@bq.unam.mx

### Resumen

El órgano implicado en el metabolismo y la toxicidad de los xenobióticos es el hígado. Las principales células que forman parte de este órgano son los hepatocitos que se denominan genéricamente como células parenquimatosas y desempeñan las funciones metabólicas de este órgano. Por tanto, los hepatocitos aislados de varias especies, incluida la humana y sus cultivos, constituyen modelos *in vitro* atractivos para la investigación básica de la función hepática, la fisiopatología, farmacología, y otros temas relacionados con el hígado. El método para el aislamiento de hepatocitos intactos se basa en la perfusión del hígado con colagenasa y fue introducido por primera vez por Berry y Friend en 1969, y desde entonces, ha sufrido modificaciones. Esencialmente, los hepatocitos se disocian del hígado de ratas adultas anestesiadas, por una perfusión de colagenasa a través de la vena porta. Las células aisladas se filtran a través de una malla de nylon para eliminar los restos de tejido no deseados y se obtiene una suspensión enriquecida de células parenquimatosas que se puede purificar mediante el método de elutriación para obtener hepatocitos puros. Los hepatocitos se pueden utilizar inmediatamente para realizar ensayos metabólicos en suspensión o se pueden cultivar en placas y utilizarlos por un periodo de 3 a 5 días.

**Palabras claves:** Aislamiento hepatocitos, elutriación, cultivo primario.

### Abstract

The liver is the organ involved in the metabolism and toxicity of xenobiotics. The main cells that are part of this organ are the hepatocytes that are generically called parenchymal cells and perform the metabolic functions of this organ. Thus, isolated hepatocytes from various species, including humans and their cultures, constitute attractive *in vitro* models for basic research on liver function, disease, pathophysiology, pharmacology, and other topics related to the liver. The method for the isolation of intact hepatocytes is based on perfusion of the liver with collagenase, it was first introduced by Berry and Friend in 1969 and has undergone many modifications since then. Essentially, hepatocytes are dissociated from the liver of anesthetized adult rats by perfusion of collagenase through the portal vein. The isolated cells are filtered through a nylon mesh to remove unwanted tissue debris and an enriched suspension of parenchymal cells is obtained that can be purified by the elutriation method to obtain only hepatocytes. Hepatocytes can be used immediately for suspension metabolic assays or can be plated and used for a period of 3 to 5 days.

**Keywords:** Hepatocyte isolation, elutriation, primary culture.

## Introducción

El hígado es el principal órgano implicado en el metabolismo y la toxicidad de los xenobióticos. Las principales células que forman parte de este órgano son los hepatocitos y el resto, son células no parenquimatosas entre las que se encuentran principalmente las células de Kupffer, endoteliales y hepáticas estrelladas o de Ito [1]. Los hepatocitos aislados y sus cultivos, sirven como un modelo *in vitro* para la investigación de temas relacionados con el funcionamiento del hígado.

El cultivo de tejidos se refiere al cultivo de órganos, tejidos y células dispersas, mantenidas en un medio estéril con nutrientes necesarios para mantener sus propiedades y funciones *in vivo*. Los cultivos celulares *in vitro* se han desarrollado para estudiar la complejidad de los sistemas biológicos. Con esta técnica se logra analizar los fenómenos celulares, como son los procesos de transducción de señales que participan en la respuesta de la célula a estímulos ambientales, las aplicaciones diagnósticas y las proyecciones terapéuticas donde se pueden probar medicamentos en cuanto a toxicidad, seguridad y efectividad, etc. Las líneas celulares permiten la caracterización de una muestra homogénea, evitando el problema de heterogeneidad de los resultados cuando se usan animales de experimentación; reduciendo la cantidad de reactivo o fármaco que se utiliza en los ensayos, ya que las células tienen un acceso directo de estos compuestos.

Los tipos de cultivos celulares son clasificados en cuatro categorías:

1. *Cultivo de órganos*. Se coloca el órgano sobre una rejilla situada en la interfase líquido-gas de un medio del que obtiene los nutrientes y al que puede liberar los desechos. Este tipo de cultivo permite mantener, la arquitectura característica del tejido *in vivo*.
2. *Explantos primarios*. Se coloca un fragmento de tejido o de órgano en la interfase sólido-líquido de un soporte de vidrio o de plástico. Las células se adhieren a la superficie y las células de la periferia del explante pueden migrar y proliferar por la superficie del soporte.
3. *Cultivo celular primario*. Es el tipo de cultivo más utilizado. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula

y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. A partir de un cultivo primario se obtiene una línea primaria que es el primer subcultivo o líneas celulares continuas. Estas se generan por medio de transformación espontánea o manipulada por oncogenes y/o factores mitogénicos.

4. *Cultivos histotípicos y organotípicos*. Los cultivos histotípicos son cultivos de un sólo tipo celular que consigue alcanzar una elevada densidad celular (tal y como ocurre en los tejidos). Los cultivos organotípicos constan de varios tipos celulares que interaccionan entre sí de una forma que intenta parecerse lo más posible a la original. El objetivo final de este tipo de cultivos es la creación *in vitro*, de tejidos u órganos completamente funcionales que puedan ser utilizados en injertos o en trasplantes. Los cultivos organotípicos constituyen la base de una nueva disciplina denominada ingeniería de tejidos [2].

## Aislamiento de hepatocitos de rata

Los hepatocitos aislados de varias especies incluida la humana, constituyen un buen modelo *in vitro* para diferentes estudios [3]. Los intentos iniciales de aislar células parenquimatosas adultas por métodos mecánicos no fueron muy exitosos. En ese momento los investigadores estaban más preocupados por el rendimiento celular que por la integridad celular, viabilidad, y funcionalidad [4].

Posteriormente, se logró un gran progreso en este procedimiento con la introducción de enzimas como agentes disociantes, como colagenasa y hialuronidasa. En 1969, Berry y Friend establecieron un técnica de perfusión de colagenasa *in situ* para hígado de rata, donde obtuvieron un alto rendimiento de hepatocitos viables [5]. Una modificación importante fue la de Seglen [6,7] en la que la solución de colagenasa la suplementó con  $\text{Ca}^{2+}$  en un segundo paso de perfusión. Este procedimiento de colagenasa de dos pasos aún es utilizada con algunas modificaciones menores. La solución de Hanks que se usaba inicialmente fue reemplazada por la solución de Krebs-Ringer [8]. El  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario para activar a la colagenasa, que digiere el colágeno de la matriz extracelular. Esta técnica se puede aplicar al hígado de varias especies y generalmente se obtiene una población celular de hepatocitos con <5% de células no parenquimatosas.

## Purificación de hepatocitos por el método de elutriación

La elutriación centrífuga es utilizada principalmente para la separación de mezclas de linajes celulares (células sanguíneas, cerebrales, hepáticas y tumorales transformadas). Este procedimiento fue implementado como método de separación por el científico estadounidense P.E Lindahl [9,10] y posteriormente desarrollado por la compañía *Beckman Instruments Inc.* Durante la separación, las células se suspenden en una solución reguladora, en la que se puede utilizar cualquier solución o medio de cultivo que mantenga la integridad fisiológica de las células. Las células separadas mediante elutriación se pueden utilizar para experimentos posteriores [11].

El elutriador consiste en una centrífuga adaptada para utilizar un rotor especialmente diseñado para la separación de células (*Centrifuge J2-21, Beckman, and rotor JE-6B, Beckman*). El proceso comienza cuando las células, que están suspendidas en una solución adecuada, son bombeadas hasta la cámara de separación, localizada en el interior del rotor, mientras éste gira. La corriente de este medio entra a la cámara en sentido opuesto al campo de fuerza centrífuga que existe en el rotor. Dentro de la cámara diversas variables como: densidad de la partícula (g/ml), tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ ), densidad del fluido (g/ml), fuerza centrífuga (rpm), viscosidad del fluido (mPa/s), flujo a contracorriente (ml/min) y velocidad del fluido (m/s) establecen un equilibrio; permitiendo el mantenimiento de las células en una posición espacial determinada dentro de la cámara de acuerdo a su velocidad de sedimentación (m/s). Las células serán secuencialmente expulsadas del rotor basándose principalmente en su tamaño. Las células más pequeñas eluirán primero y las grandes eluirán al final cuando el equilibrio dentro de la cámara sea alterado mediante el incremento del flujo de volumen o la disminución de la velocidad de centrifugación o fuerza centrífuga [10,12,13]. De esta forma las células de un tamaño determinado pueden ser selectivamente removidas de la cámara.

### Cultivo de hepatocitos de rata

Aunque los cultivos primarios de hepatocitos son considerados un desafío por su complejidad en el método de obtención y su aislamiento; estos son el mejor modelo utilizado *in vitro* para estudiar el metabolismo de estas células [14]. Sin embargo, los cultivos primarios de hepatocitos mantienen su diferenciación hasta por dos semanas. Es por ello, que se han utilizado metodologías para prolongar la viabilidad y funcionalidad celular, entre las que podemos mencionar: *i)* las matrices de colágeno, *ii)*

*matrigel*, *iii)* sándwich de colágeno y *iv)* cultivo en tres dimensiones. Mediante éstas técnicas, se han logrado mantener cultivos primarios de hepatocitos a largo plazo por períodos que van desde 120 a 150 días (sin subcultivos), manteniendo las funciones de estos en condiciones óptimas. Sin embargo, el tiempo de cultivo sigue siendo limitado [15].

La obtención de una línea continua de hepatocitos sería de gran importancia para el estudio de las funciones específicas del metabolismo del hígado, las interacciones entre las células hepáticas y los agentes infecciosos, fármacos y un modelo muy importante para estudios de citotoxicidad [16]. Se han descrito algunas líneas continuas de hepatocitos obtenidas por transformación oncogénica, pero éstas no mantienen la totalidad de sus funciones metabólicas, por lo que no se pueden extrapolar los resultados al hígado completo [14].

### Materiales y reactivos

#### Material biológico

- Rata de la cepa Wistar, macho de 150 a 200 g de peso.

#### Reactivos

Los reactivos que se emplean para preparar las soluciones en estos protocolos son de la marca *Sigma-Aldrich* a menos que se indique otra cosa. Los reactivos para los cultivos celulares son de la marca *Gibco* y el material de plástico es de la marca *Corning*.

#### A) Obtención de células hepáticas

- Solución de Krebs-Ringer (KR): NaCl 120 mM, KCl 5.7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2 mM,  $\text{NaHCO}_3$  12 mM, pH 7.3-7.4.
- Solución Krebs-Ringer-1.2 mM  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{KR}/\text{Ca}^{2+}$ ).
- $\text{NaHCO}_3$  al 6.5%.
- Colagenasa tipo IV marca Worthington.
- Anestésicos (ketamina y xilacina).
- Azul tripano al 0.4% en solución salina isotónica.
- Hemocitómetro.
- Material para disección.
- Tubos cónicos de 50 ml.
- Malla de nylon.
- Tanque de carbógeno (95% $\text{O}_2$  / 5% $\text{CO}_2$ ).

#### B) Purificación de hepatocitos por el método de elutriación

- Solución de Krebs-Ringer (KR).
- Suspensión celular a purificar.

- Jeringas de plástico de 10 ml.
- Tubos cónicos 50 mL

### C) Cultivo de hepatocitos

*NOTA: Todo el material debe ser estéril.*

- Solución reguladora de fosfatos salina (PBS)
- Solución reguladora Hanks (HBSS): 500 ml de HBSS, 5 mL hepes 1M.
- Solución de Percoll: 180 ml Percoll, 18 ml HBSS 10X, 2 ml hepes 1M.
- Colágena tipo I (de cola de rata) 1 mg/ml en ácido acético 0.02 M (Becton-Dickinson)
- Medio de cultivo de adhesión: DMEM adicionado con albúmina serica bovina (BSA) 0.02%, hepes 3 mM, piruvato de sodio 1 mM, galactosa 0.1%, prolina 0.003%, glutamina 4mM, gentamicina 0.05 mg/ml, insulina-transferrina-sodio-selenito (ITS), penicilina/estreptomocina, suero fetal bovino (SFB) 10%.
- Medio de cultivo de alimentación: Medio de adhesión sin SFB.
- Tubos cónicos de 50 ml.
- Cajas de petri para cultivo.

### Equipo

- Aparato de perfusión.
- Sistema de elutriación (*Centrifuge Beckman J2-21 y rotor JE-6B*).
- Báscula para roedores.

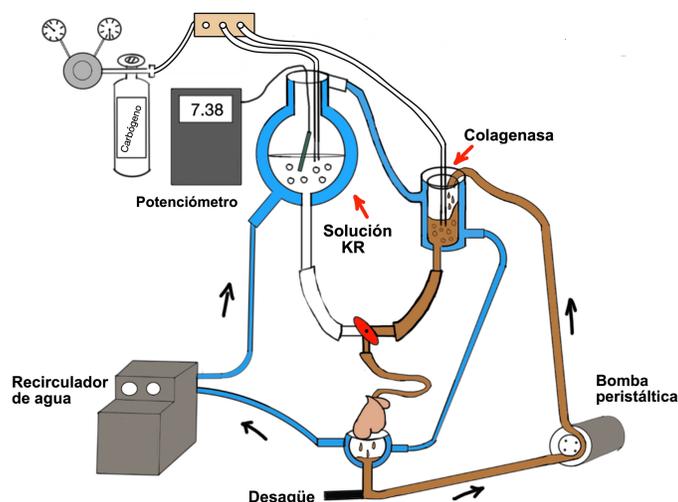
- Centrifuga clínica.
- Microscopio invertido.
- Gabinete de bioseguridad I.
- Incubadora de CO<sub>2</sub>.
- Bomba peristáltica.
- Recirculador de agua.

### Procedimiento

#### A) Obtención de las células hepáticas [17,18]:

##### 1. Preparación del aparato de perfusión

- Colocar solución de Krebs-Ringer (KR) en el matraz balón del aparato de perfusión (Figura 1), prender baño recirculador a 37°C e iniciar el burbujeo de carbógeno (95%O<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub>).
- Después de 15 a 30 min, se mide el pH de la solución que debe estar entre 7.34 y 7.4. Se puede ajustar el pH con NaHCO<sub>3</sub> o carbógeno.
- Tomar 200 ml de la solución KR anterior y adicionar Ca<sup>2+</sup> a concentración de 1.2 mM (KR/Ca<sup>2+</sup>). Mantener esta solución en un baño a 37°C con burbujeo de carbógeno.
- Dejar pasar un poco de la solución de KR por el perfusor para eliminar las burbujas en las mangueras.



**Figura 1. Aparato de perfusión.** Este aparato está constituido por un sistema de 3 contenedores de vidrio de doble pared y un baño recirculador de agua a 37°C (mangueras azules). Se coloca la solución de Krebs Ringer (KR) en el matraz balón y en el otro contenedor la solución KR con Ca<sup>2+</sup> y colagenasa, como se indica en el esquema. Ambas soluciones tienen que tener un pH de 7.38 y deben estar continuamente burbujeadas con carbógeno. La solución con colagenasa perfundida a través del hígado se colecta y se regresa al contenedor de vidrio mediante una bomba peristáltica (mangueras cafés). Este aparato fue diseñado por el Dr. Adolfo García Sainz del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. (Modificado de Sosa-Garrocho M, 2017).

## 2. Obtención del material biológico

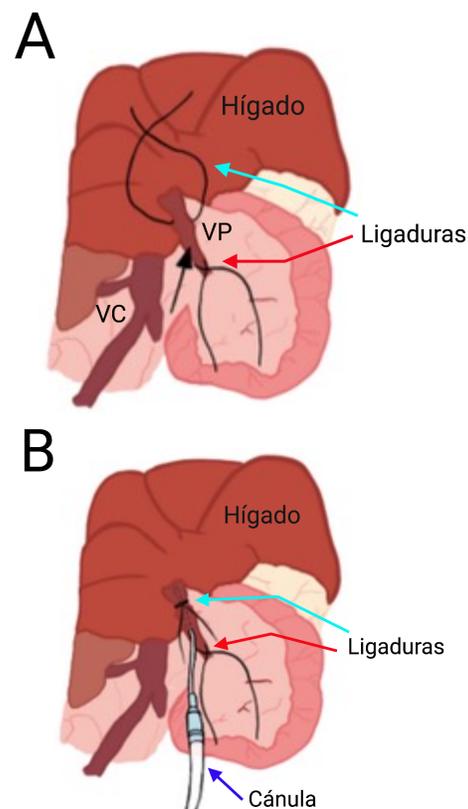
- Utilizar ratas macho de la cepa Wistar de 150 a 200 g de peso.
- Pesar la rata para determinar la dosis exacta de anestésico.
- Preparar la mezcla de ketamina y xilacina (12 U de cada anestésico/100 g de peso) y colocar en una jeringa para insulina.
- Inyectar al animal por vía intraperitoneal.
- Iniciar procedimiento quirúrgico cuando la rata no responda a estímulos externos.

## 3. Perfusión y digestión del hígado.

- Para realizar la perfusión del hígado, abrir el abdomen del animal con una incisión en línea recta y dos cortes perpendiculares a nivel de las extremidades.
- Remover los intestinos fuera de la cavidad abdominal para tener acceso a la vena porta.
- Colocar dos ligaduras por debajo de la vena porta; una en la parte inferior de la vena con un nudo sencillo y la otra antes de la bifurcación hacia el hígado, con doble hilo pero solo se deja indicado sin hacer el nudo (Figura 2A).
- Introducir la cánula previamente conectada al perfusor y por la cual sale la solución de KR a un flujo lento. Si la canulación se hizo correctamente el hígado cambia de color rojo oscuro a café claro. Si no se observa este cambio en la coloración, mover un poco la cánula hasta conseguirlo.
- Realizar un nudo sujetando la vena y la cánula, apretar y repetir el nudo para evitar que se mueva la cánula (Figura 2B).
- Separar el hígado de la cavidad abdominal, sujetando la cánula y el hilo.
- Colgar el hígado por medio de la cánula en el aparato de perfusión y drenar todo el líquido hacia el desagüe.
- Para la digestión del hígado, preparar una solución de colagenasa (20 mg de colagenasa tipo IV en 20 ml de KR/Ca<sup>2+</sup>) y colocarla en el

contenedor para colagenasa que tiene el flujo cerrado.

- Cerrar el flujo del matraz balón y abrir el flujo del contenedor con colagenasa y dejar pasar la solución por el hígado.
- Prender la bomba peristáltica, cerrar con una pinza el flujo hacia el desagüe y dejar recircular la solución de colagenasa por el hígado durante 5 a 10 min. Supervisar la apariencia y consistencia del hígado hasta observar que se empieza a digerir. Es muy importante este punto porque si se deja actuar mucho tiempo la colagenasa, se pueden cortar los receptores celulares del hepatocito y ya no se pueden utilizar los hepatocitos para realizar ensayos en suspensión.



**Figura 2. Procedimiento de canulación.** Para realizar la perfusión del hígado se abre el abdomen y se remueven los intestinos fuera de la cavidad abdominal para dejar libre el acceso a la vena porta (VP) y vena cava (VC). (A) Se colocan 2 ligaduras por debajo de la vena porta; una en la parte inferior de la vena y otra antes de la bifurcación hacia el hígado. La flecha negra indica donde se debe hacer el corte para introducir la cánula. (B) Introducir la cánula previamente conectada al perfusor y por la cual sale la solución de KR y realizar un nudo sujetando la vena y la cánula.

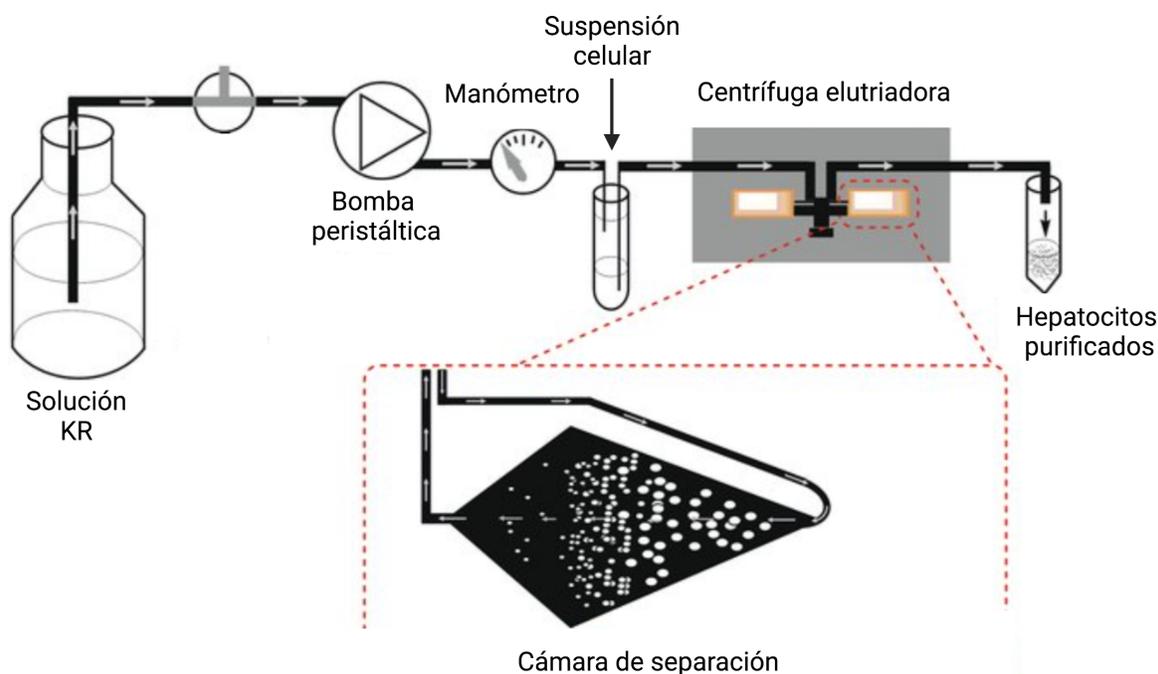
- Detener la perfusión con colagenasa y pasar solución KR/Ca<sup>2+</sup> durante 5 min para eliminar la colagenasa del hígado.
- Retirar el hígado de la cánula y colocarlo sobre una caja petri de plástico con un poco de solución de KR/Ca<sup>2+</sup>, disgregar el hígado suavemente con ayuda de un tubo pequeño de plástico, para obtener la suspensión celular.
- Filtrar la suspensión celular a través de una malla de nylon para remover fragmentos de tejido.
- Realizar 3 lavados de la suspensión celular con solución de KR/Ca<sup>2+</sup> centrifugando a 500 rpm por 2 min y resuspender las células en 20 ml de solución de KR/Ca<sup>2+</sup>.
- Medir la viabilidad de las células mediante la prueba de exclusión con azul tripano. Para ello, tomar una alícuota de 100 µl, añadir una cantidad

igual de azul tripano al 0.4% y contar las células en un hemocitómetro. Si la viabilidad es mayor al 90%, las células se pueden utilizar en ensayos como células parenquimatosas enriquecidas, se puede proceder a la purificación de los hepatocitos mediante el método de elutriación o se pueden utilizar para realizar cultivos celulares de hepatocitos.

#### B) Purificación de hepatocitos por el método de elutriación [19]:

##### 1. Preparar el sistema de elutriación.

- Pasar agua destilada por todo el sistema de elutriación para enjuagar el equipo y posteriormente solución KR fría, mediante una bomba peristáltica a un flujo de 9 ml/min (Figura 3).
- Encender la centrífuga y ajustar la velocidad de centrifugación a 800 rpm.



**Figura 3. Sistema de elutriación.** Las células son resuspendidas en solución Krebs-Ringer (KR) y bombeadas hasta la cámara de separación en el interior del rotor. Las células son secuencialmente expulsadas del rotor basándose principalmente en su tamaño. Las células más pequeñas eluyen primero y las grandes eluyen al final cuando se aumenta el flujo de volumen (Modificado de Benz C., 2017).

##### 2. Purificar los hepatocitos.

- Inyectar 10 ml de la suspensión de células hepáticas (obtenidas mediante el protocolo anterior) en el tubo colector del sistema.

- Dejar pasar solución KR durante 2 min. Eliminar la solución que sale de la centrífuga la cual contiene las células hepáticas pequeñas diferentes a los hepatocitos.

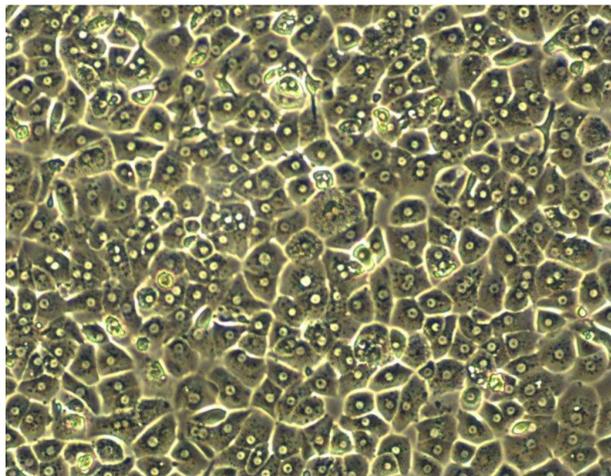
- Cambiar el flujo de la solución a 30 ml/min para eluir a los hepatocitos.
- Colectar en 3 tubos cónicos de 50 ml la solución que sale de la centrifuga. En estos tubos se encuentran los hepatocitos purificados.
- Centrifugar las células a 500 rpm durante 2 y juntar en un solo tubo para tener finalmente los hepatocitos purificados.
- Lavar el equipo pasando por el sistema de centrifugación una solución de etanol al 50% sin apagar la centrifuga. Una vez que se elimina esta solución la centrifuga se apaga.
- Resuspender el botón de células hepáticas (obtenidas mediante perfusión con colagenasa) en 40 ml de solución de PBS suplementado con antibióticos.
- Centrifugar a 500 rpm por 2 min y retirar sobrenadante.
- Resuspender el botón celular en 20 ml de PBS y adicionar 20 ml de la solución de Percoll, mezclar por inversión.
- Centrifugar a 800 rpm por 5 min.
- Descartar el sobrenadante (celulas no parenquimatosas y restos celulares).

**NOTA:** Los hepatocitos obtenidos mediante esta metodología alcanzan una pureza de 99% y se pueden utilizar para realizar ensayos de vías metabólicas en suspensión. Alternativamente, se pueden utilizar lotes de hepatocitos para preparar membranas plasmáticas [19].

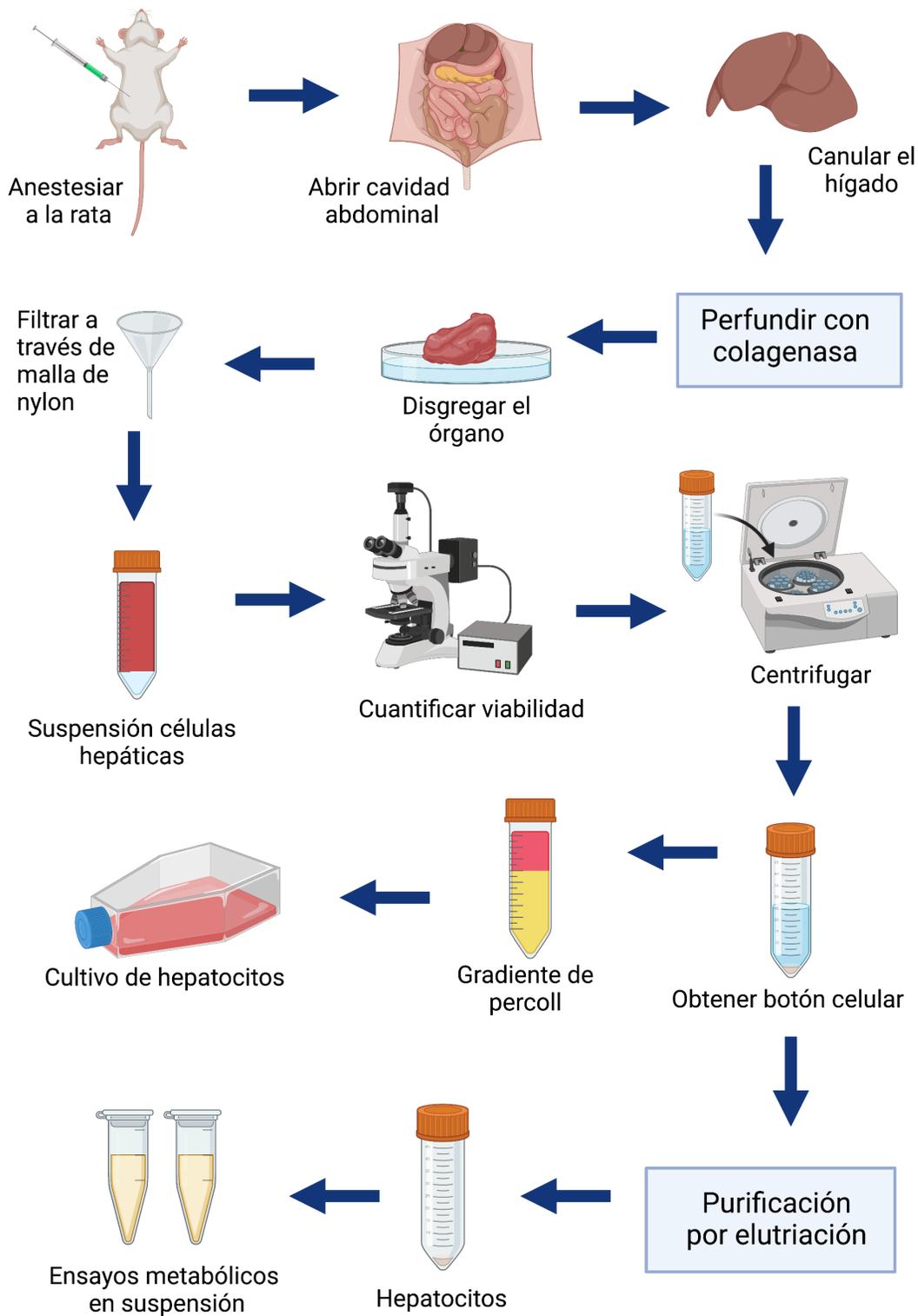
#### C) Cultivo de hepatocitos [18].

**NOTA:** Se sigue el protocolo en condiciones de esterilidad y en un gabinete de seguridad I.

- Cubrir las cajas de plástico para cultivo celular con una solución de colágena tipo I (1mg/ml) en condiciones estériles. Recuperar la solución y guardar para su reutilización.
- Esterilizar las cajas en el gabinete de bioseguridad por 30 min bajo luz UV y almacenar a 4°C en bolsa de polietileno cerrada.
- Resuspender en botón de células en 10 ml de Medio de adhesión (DMEM suplementado con 10% de SFB, penicilina y estreptomina). Mantener en condiciones estériles.
- Contar las células en un hemocitómetro y calcular la dilución apropiada para sembrar  $2.5 \times 10^6$  cel en cajas de plástico de 10 cm de diámetro cubiertas con colagena. Colocar las cajas en una incubadora a 37°C y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Dejar al menos 2h.
- Cuando las células ya se han pegado, reemplazar el medio de adhesión por medio de alimentación y regresar a la incubadora. Cambiar el medio cada 48 horas y usar el cultivo en los primeros 5 días (Figura 4).
- Si se quiere utilizar los cultivos de un día para otro, sembrar  $4.5 \times 10^6$  células.



**Figura 4. Cultivo primario de hepatocitos de hígado de rata.** Las células hepáticas son aisladas mediante el método de perfusión y posteriormente son cultivadas *in vitro*.



**Figura 5. Resumen esquemático del proceso de aislamiento, purificación y cultivo de hepatocitos de rata.** Imagen realizada con el programa BioRender.

**Tabla 1. Posibles problemas técnicos durante la realización de las técnicas**

Paso	Problema	Posible razón	Solución
<b>Aislamiento de las células hepáticas</b>	Viabilidad celular baja o pérdida de receptores de membrana	Perfusión inadecuada, pH de soluciones y concentración de colagenasa inadecuadas, daño mecánico durante disgregación del hígado	Practicar el proceso de perfusión, oxigenar la sol KR con carbógeno, probar diferentes concentraciones de colagenasa, disgregar el tejido suavemente.
<b>Purificación de hepatocitos por elutriación</b>	No se logró la purificación	No se tiene la velocidad de centrifugación y el flujo correcto de la solución que pasa por el rotor.	Probar varias velocidades de centrifugación y flujo para encontrar las condiciones adecuadas para la purificación
<b>Cultivo de hepatocitos</b>	Contaminación	No se manejan buenas prácticas de esterilidad	Todo el material debe estar estéril y se debe trabajar en un gabinete de seguridad tipo I

Las células aisladas pueden posteriormente ser sometidas a un procedimiento de purificación por el método de elutriación para obtener suspensión de hepatocitos libres de células no parenquimatosas y poder realizar ensayos en suspensión o pueden ser cultivadas *in vitro* para su análisis posterior (Figura 5). Estas metodologías son complejas porque las células son muy sensibles al daño por cambio en pH, daño mecánico o por la acción de la colagenasa, por lo que estos 3 puntos deben ser mantenidos en condiciones óptimas durante el procedimiento. Una vez que se obtienen células viables y son sometidas a purificación mediante elutriación es importante tener las condiciones óptimas de purificación que son la velocidad de centrifugación y el flujo de la solución reguladora que nos va a permitir eluir las células del sistema. La población pura de hepatocitos obtenida, se puede utilizar para hacer ensayos metabólicos que duran un par de horas. Por otra parte, cuando se realizan ensayos que duran varios días, se puede realizar el cultivo *in vitro* de estas células. En este caso es muy importante mantener las condiciones de

esterilidad para tener un ensayo experimental exitoso (Tabla 1).

### Conclusión

El aislamiento, purificación y cultivo de los hepatocitos son metodologías importantes en el estudio del metabolismo de estas células y otros aspectos relevantes del funcionamiento hepático. En este trabajo se describe el método de aislamiento de células hepáticas basado en la perfusión del hígado con colagenasa. Adicionalmente, remarcamos la importancia de observar detenidamente la ejecución del protocolo, de tal manera que podamos obtener células viables y funcionales para realizar experimentos posteriores exitosos y reproducibles.

### Agradecimientos

Se agradece el apoyo del proyecto IN218821 DGAPA-PAPIIT de la UNAM.

### Referencias

1. I.R., W. (2002) Anatomy, Histology, Embryology, and Developmental Anomalies of the Liver. in *Gastrointestinal and Liver Disease* (Fordtran, F.-S. ed.), 7a. Ed., Elsevier, Philadelphia, Pennsylvania pp 1662-1675
2. Schaeffer, W. I. (1990) Terminology associated with cell, tissue, and organ culture, molecular biology, and molecular genetics. *Tissue Culture Association Terminology Committee. In Vitro Cell Dev Biol* 26, 97-101
3. Papeleu, P., Elaut, G., Rogiers, V., and Vanhaecke, T. (2002) Cell-based cultures as *in vitro* tools for biotransformation studies. in *Recent Research Developments* (Pandalai, S. G. ed.), Transworld Research Network, India. pp 199-234
4. Anderson, N. G. (1953) The mass isolation of whole cells from rat liver. *Science* 117, 627-628
5. Berry, M. N., and Friend, D. S. (1969) High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43, 506-520
6. Seglen, P. O. (1972) Preparation of rat liver cells. I. Effect of Ca<sup>2+</sup> on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Exp Cell Res* 74, 450-454
7. Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13, 29-83
8. Krebs, H. A. H., K. (1932) Studies on urea formation in the animal organism. *Physiol. Chem.* 210, 33-66
9. Bachere, E., Chagot, D., and Grizel, H. (1988) Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and counterflow centrifugal elutriation. *Dev Comp Immunol* 12, 549-559
10. Lindahl, P. E. (1948) Principle of a counter-streaming centrifuge for the separation of particles of different sizes. *Nature* 161, 648

11. Davies, R., Cain, K., Edwards, R. E., Snowden, R. T., Legg, R. F., and Neal, G. E. (1990) The preparation of highly enriched fractions of binucleated rat hepatocytes by centrifugal elutriation and flow cytometry. *Anal Biochem* 190, 266-270
12. Banfalvi, G. (2017) Synchronization of Mammalian Cells and Nuclei by Centrifugal Elutriation. *Methods Mol Biol* 1524, 31-52
13. Benz, C., Dondelinger, F., McKean, P. G., and Urbaniak, M. D. (2017) Cell cycle synchronisation of *Trypanosoma brucei* by centrifugal counter-flow elutriation reveals the timing of nuclear and kinetoplast DNA replication. *Sci Rep* 7, 17599
14. Aguillón-Osma, J., Loango-Chamorro, N., Landazuri, P. . (2019) Modelos celulares hepáticos para el estudio del metabolismo de los lípidos. *Rev. Fac. Med* 67, 109-116
15. Chen, H. L., Wu, H. L., Fon, C. C., Chen, P. J., Lai, M. Y., and Chen, D. S. (1998) Long-term culture of hepatocytes from human adults. *J Biomed Sci* 5, 435-440
16. Cabané TP., D. J., Rojas CJ., Maluenda GF., Rencoret PG., Saud IK., Godoy VL., Ibacache AD., Ledezma SA., Caviedes CR. y Caviedes FP. (2007) Optimización de cultivos de hepatocitos humanos para estudios de citotoxicidad. *Rev. Chilena de Cirugía.* 59, 116-121
17. Guinzberg, R., Laguna, I., Zentella, A., Guzman, R., and Pina, E. (1987) Effect of adenosine and inosine on ureagenesis in hepatocytes. *Biochem J* 245, 371-374
18. Sosa Garrocho, M. (2017) Aislamiento y cultivo de células hepáticas. *Avances en el estudio experimental de la bioquímica hepática*
19. Diaz-Cruz, A., Vilchis-Landeros, M. M., Guinzberg, R., Villalobos-Molina, R., and Pina, E. (2011) NOX2 activated by alpha1-adrenoceptors modulates hepatic metabolic routes stimulated by beta-adrenoceptors. *Free Radic Res* 45, 1366-1378



**DRA. MARIA MAGDALENA VILCHIS  
LANDEROS**

**ID: ORCID:0000-0002-7659-7646**

Egresada de la carrera de Químico bacteriólogo y parasitólogo del Instituto Politécnico Nacional. Realizó la Maestría en Ciencias con especialidad en Inmunología en el mismo Instituto y el Doctorado en Ciencias Biomédicas en la UNAM.

Actualmente se desempeña como Profesora Asociada C de Tiempo Completo en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Es profesora de la asignatura de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM desde hace 15 años y durante ese tiempo ha colaborando con el Doctor Enrique Piña Garza en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, en proyectos relacionados con la Caracterización de la NADPH oxidasa tipo 2 (NOX2) de hepatocitos y su participación en la regulación de algunas vías metabólicas de estas células como la glucogenólisis, la gluconeogénesis y ureagénesis utilizando hepatocitos en suspensión o cultivos primarios.

Su trabajo está descrito en 12 publicaciones internacionales, 2 publicaciones nacionales y 1 capítulo de libro. A participado en la formación de alumnos de licenciatura, maestría y doctorado.