

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



TESIS:

**Efecto de la digestión enzimática y medios de cultivo en la
viabilidad, rendimiento y proliferación de fibroblastos
obtenidos por biopsia de oreja de *Vicugna pacos* “alpaca”**

Para optar el título profesional de:

BIÓLOGO, ESPECIALIDAD: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. Jhon Wacnerson PRADO YUPANQUI

ASESOR:

Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA

COASESORES:

**M.V. Mijail CONTRERAS HUAMANÍ
Blga. Crissthel Yverlin GUILLÉN PALOMINO**

AYACUCHO - PERÚ

2025

A Dios, por darme y guiarme en la vida;
a mi madre y hermanos, por darme las
fuerzas y motivos para luchar y salir
adelante.

AGRADECIMIENTOS

A los docentes, personal administrativo y alumnos de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; por sus servicios, conocimientos y experiencias impartidas.

A la Facultad de Ciencias Biológicas y la especialidad de Biotecnología por afianzar mi formación profesional.

Al Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA- Ayacucho, por brindarme la oportunidad de realizar mi investigación, acogerme en sus instalaciones y permitirme el uso de sus equipos, materiales y reactivos.

Al Blgo. Fidel Rodolfo Mujica Lengua, por su apoyo incondicional, dinamismo, seguimiento y sabios consejos, que permitieron culminar satisfactoriamente mi tesis de pregrado.

Al M.V. Mijail Contreras Huamaní responsable del Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA- Ayacucho.

A la Blga. Crissthel Yverlin Guillen Palomino, por su apoyo constante, sabios consejos y sus vastos conocimientos.

A la Blga. Katherine Milagros Tacza Paquiyauri y Bach. Florcita de María Gaspar Morote, por su paciencia, enseñanza y apoyo constante.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	xi
I. INTRODUCCIÓN	12
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
II. MARCO TEÓRICO	14
2.1 Antecedentes	14
2.2 Bases teóricas	16
III. MATERIALES Y METODOS	28
3.1 Ubicación de la zona de estudio	28
3.2 Población y Muestras	28
3.3 Metodología y recolección de datos	28
3.3.1 Obtención de muestras	28
3.3.1.1 Desinfección de zona de punch	28
3.3.1.2 Extracción de biopsia de tejido por punch	28
3.3.2 Aislamiento celular	29
3.3.3 Cultivo primario de fibroblastos	30
3.3.4 Evaluación de viabilidad celular mediante ensayo de exclusión mediante la coloración de azul de Tripán	31
3.3.4.1 Evaluación de viabilidad y apoptosis celular mediante tinción doble fluorescente (Hoechst 33342/PI)	32
3.3.5 Evaluación del rendimiento	32
3.3.6 Evaluación de proliferación celular	32

3.3.7	Evaluación de la morfología celular	33
3.4	Procesamiento de datos	33
IV.	RESULTADOS	35
V.	DISCUSIONES	45
VI.	CONCLUSIONES	50
VII.	RECOMENDACIONES	51
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
IX.	ANEXOS	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Organización estructural de la piel y distribución de los componentes de la matriz extracelular	17
Figura 2. Estructura de la piel y componentes celulares	19
Figura 3. Fibroblastos del tejido epidérmico	21
Figura 4. Elementos que afectan la integridad y reproducibilidad del cultivo celular	22
Figura 5. Mecanismo de acción de la colagenasa	24
Figura 6. Mecanismo de acción de la hialuronidasa	25
Figura 7. Muestras de biopsias de oreja de alpaca	29
Figura 8. Distribución de disgregación enzimática de biopsias obtenidas de <i>Vicugna pacos</i> "alpaca" en medio DMEM o TCM-199	30
Figura 9. Imagen de referencia utilizada para el análisis del área celular ocupada mediante el software ImageJ	33
Figura 10. Efecto de tratamiento enzimático en la fase de aislamiento celular sobre el rendimiento, viabilidad y apoptosis. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho	37
Figura 11. Efecto del tratamiento enzimático en la fase de cultivo celular sobre el número de células, viabilidad y apoptosis. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho	38
Figura 12. Efecto de tratamiento enzimático en la fase de aislamiento celular sobre la viabilidad y apoptosis celular. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.	39
Figura 13. Efecto del tratamiento enzimático en la fase de cultivo celular sobre la viabilidad y apoptosis. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.	41

	Pág.
Figura 14. Confluencia y morfología celular según grupo de tratamiento y días en la fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho	42
Figura 15. Proliferación de fibroblastos de alpaca de acuerdo al área de confluencia. Programa Image J. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.	43
Figura 16. Tiempo de duplicación de fibroblastos de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.	44

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Medios comunes y sus aplicaciones	26
Tabla 2. Condiciones aplicadas en aislamiento de fibroblastos de alpaca	29
Tabla 3. Métodos aplicados en cultivo celular de fibroblastos	30
Tabla 4. Efecto de tratamiento enzimático en la fase de aislamiento celular sobre el rendimiento, viabilidad y apoptosis. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho	36
Tabla 5. Efecto del tratamiento enzimático en la fase de cultivo celular sobre el número de células, viabilidad y apoptosis. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho	40

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Aislamiento celular de fibroblastos de alpaca	60
Anexo 2. Zona de trabajo en aislamiento y cultivo celular de fibroblastos de alpaca	60
Anexo 3. Viabilidad y apoptosis mediante Hoechst 3342/PI en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca	60
Anexo 4. ANOVA rendimiento en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca	61
Anexo 5. ANOVA de viabilidad según prueba de exclusión de azul de tripán en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca	61
Anexo 6. ANOVA de viabilidad según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca	61
Anexo 7. Tukey post ANOVA de viabilidad según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca	61
Anexo 8. ANOVA de apoptosis según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca	62
Anexo 9. Tukey post ANOVA de apoptosis según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca	62
Anexo 10. ANOVA de viabilidad según prueba de exclusión de azul de tripán en la fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca	62
Anexo 11. Tukey post ANOVA de viabilidad según prueba de exclusión de azul de tripán en la fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca	63
Anexo 12. ANOVA de viabilidad según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca	63
Anexo 13. Tukey post ANOVA de viabilidad según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca	63
Anexo 14. ANOVA de apoptosis según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca	64
Anexo 15. Tukey post ANOVA de apoptosis según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca	64
Anexo 16. ANOVA de proliferación celular de fibroblastos de alpaca	64

	Pág.
Anexo 17. Tukey post ANOVA de proliferación celular de fibroblastos de alpaca	64
Anexo 18. ANOVA de tiempo de duplicación celular de fibroblastos de alpaca	65
Anexo 19. Tukey post ANOVA de tiempo de duplicación celular de fibroblastos de alpaca	65
Anexo 20. Matriz de Consistencia	66

RESUMEN

Los fibroblastos son esenciales para la reparación tisular y los modelos *in vitro* de medicina regenerativa. Sin embargo, los protocolos optimizados para su aislamiento y expansión en Camélidos Sudamericanos (CSA) siguen siendo limitados. El objetivo fue evaluar el efecto de la digestión enzimática y los medios de cultivo sobre la viabilidad, el rendimiento y la proliferación de fibroblastos obtenidos de biopsias de oreja de alpaca. Las biopsias se procesaron utilizando colagenasa (3 mg/mL) sola o en combinación con hialuronidasa (1 mg/mL), seguido de cultivo en TCM-199 y DMEM. La viabilidad celular se evaluó mediante tinción con azul tripán y Hoechst/PI, mientras que la proliferación y el tiempo de duplicación se determinaron en condiciones de cultivo estándar. Los resultados mostraron que la combinación de colagenasa e hialuronidasa no mejoró el número de células aisladas y se asoció con un aumento de la apoptosis en comparación con la colagenasa sola. El medio de cultivo tuvo una mayor influencia que el tratamiento enzimático: los fibroblastos expandidos en DMEM mostraron tasas de proliferación significativamente mayores ($p < 0,001$) y tiempos de duplicación más cortos en comparación con los del TCM-199. Estos hallazgos indican que la digestión con colagenasa a 3 mg/mL es suficiente para el aislamiento eficaz de fibroblastos del tejido de la oreja de alpaca, mientras que el DMEM proporciona condiciones superiores para la expansión celular. Este trabajo establece las bases metodológicas para el cultivo de fibroblastos en alpaca, con posibles aplicaciones en medicina regenerativa veterinaria y biotecnología.

Palabras clave: fibroblastos, alpaca, digestión enzimática, viabilidad, rendimiento proliferación.

I. INTRODUCCIÓN

El aislamiento de fibroblastos a partir de diversos tejidos es esencial para múltiples áreas de la biología celular y la ingeniería tisular, ya que estos son los principales productores de la matriz extracelular y juegan un papel crucial en la cicatrización, remodelación tisular y respuestas inflamatorias (Gentile et al., 2019). El empleo de tratamientos enzimáticos se ha consolidado como la estrategia más eficiente para liberar células de la compleja red de proteínas que conforma el tejido conjuntivo, permitiendo obtener altos rendimientos celulares y, a menudo, una mayor viabilidad en comparación con métodos mecánicos (Aronowitz et al., 2015). Asimismo, la preservación de la morfología fibroblastoide y de los marcadores específicos como la expresión de vimentina y la ausencia de marcadores epiteliales es determinante para la aplicación de estas células en terapias regenerativas y en la preparación de modelos *in vitro* (Franco-Barraza et al., 2016).

El procedimiento enzimático para la disgregación tisular se basa en la utilización de enzimas proteolíticas capaces de degradar componentes específicos de la matriz extracelular. Entre las enzimas comúnmente utilizadas se destacan la colagenasa, que degrada las fibras de colágeno presentes en el tejido adiposo, la dispasa, que complementa la acción de la colagenasa degradando otras proteínas matriciales, y la tripsina, que se emplea tanto para la disociación del tejido como para el subcultivo de células adherentes (Gentile et al., 2019; Tsuji et al., 2017). En investigaciones recientes, se han comparado protocolos basados en diferentes concentraciones de colagenasa (usualmente entre 0.075% y 0.3% peso/volumen) y se ha evidenciado que la eficiencia de la liberación celular y la preservación de la viabilidad dependen en forma crítica del ajuste de estos parámetros (Aronowitz et al., 2015). La incorporación de pasos mecánicos, como el pipeteo suave o la utilización de sistemas de agitación, se ha

implementado para complementar la acción enzimática y facilitar el desprendimiento de células adherentes, lo que resulta especialmente relevante en tejidos densos (Franco-Barraza et al., 2016).

Sobre esta base se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general

Establecer el efecto de las condiciones enzimáticas y medio de cultivo en la viabilidad, rendimiento y proliferación celular de fibroblastos de alpaca.

Objetivos específicos

- a. Obtener fibroblastos por digestión enzimática de biopsia de oreja de alpaca con colagenasa y hialuronidasa.
- b. Evaluar la proliferación de los fibroblastos en dos medios de cultivo TCM-199 y DMEM suplementados; y describir su morfología.
- c. Comparar la viabilidad y rendimiento de la digestión enzimática y la proliferación de fibroblastos en condiciones de cultivo primario.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

La tecnología de cultivo de células animales se originó en el Siglo XIX. En 1866, Recklinghausen aisló células de anfibios y las mantuvo vivas en cultivos *in vitro*, siendo el plasma el sustrato para la supervivencia celular ; Burrows y Carell en 1910, quienes utilizaron plasma sanguíneo de pollo para alimentar explantes de tejido de embrión de pollo; Rous y Jones en 1916, quienes utilizaron extractos enriquecidos en tripsina para aislar células de embriones de pollo y establecieron los primeros cultivos celulares, y Carrel en 1913, quien demostró que las células extraídas de animales podían mantenerse en cultivo durante más tiempo que su vida útil. El primer medio de cultivo libre de suero, inicia la introducción de medios definidos que facilita el mantenimiento indefinido de ciertos cultivos de células de mamíferos (Lozano et al., 2019; Santacruz et al., 2017). Para la digestión enzimática se ha utilizado Colagenasa I y Tripsina-EDTA, estudio en el que se trabajó con conejos silvestres y cuyes, mostrando que el uso de Colagenasa I genera mayor velocidad de crecimiento en cultivos primarios (Cortez & Murga, 2016). Aunque el uso conjunto de estas dos enzimas fue planteado desde 1967 en un estudio en el cual se utiliza colagenasa al 0.15% junto a hialuronidasa 0.15%, para obtener células parenquimatosas de hígado, produjo un numero adecuado de células destinados para ciertos estudios mostrando un 75% de integridad estructural mediante microscopia óptica (Howard et al., 1967).

En otros estudios similares en donde se utiliza medios como Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) y Roswell Park Memorial Institute (RPMI), se obtuvo proliferación y formación de islotes a partir de la descélularización de páncreas con colagenasa (Guruswamy & Vermette, 2018). Con el uso de DMEN suplementado con suero fetal bovino (SFB) + buffer HEPES + solución de aminoácidos + glutamina y antibióticos; la incubación de fibroblastos aislados le tomó de 3 a 4 horas dependiendo

del grado de digestión enzimática y es posible cultivar fibroblastos en el laboratorio de los autores a partir de muestras de piel de 1 o 2 días conservadas a 4 °C en un medio de crecimiento completo, lo más recomendable fue que los cultivos se establezcan inmediatamente después de la biopsia (Bernardi, 2015; Sulca-Cervan, 2021).

En el estudio realizado por Sulca-Cervan,(2021) en el cual se estableció el cultivo de células madre espermato goniales (SSC), para su aislamiento se utilizaron métodos de digestión enzimática con Tipo I (0.5 mg/ml) (SigmaAldrich, cat. no. H3506), Colagenasa Tipo V (1 mg/ml) (Sigma-Aldrich, cat. no. C9263) y DNasa Tipo II (2,6 µl/ml) (Sigma-Aldrich, cat. no. D4527) (Enzima 1); y Hialuronidasa Tipo I (0.5 mg/ml) y Colagenasa Tipo V (1 mg/ml) (Enzima 2) posteriormente pasó por gradientes discontinuos de Percoll, a partir de muestras testiculares de alpacas adultas. La población celular se cultivó por 8 días mostrando proliferación de las SSC en los cultivos, cultivados en medio DMEM +10% SFB.

(Sulca-Cervan, 2021) estableció un protocolo de enriquecimiento de células madre espermato goniales (SSC) utilizando gradientes discontinuos de Percoll, a partir de muestras testiculares de alpacas adultas provenientes del Camal Municipal de Huancavelica. Las biopsias fueron sometidas a dos digestiones enzimáticas secuenciales y clasificadas como Grupo Control (GC) y Grupo Post Percoll (GPP). La identificación y cuantificación de SSC se realizó mediante Citometría de Flujo (CF) y Microscopía de Fluorescencia (MF) empleando el marcador DBA-FITC, observándose una mayor proporción de células sDBA+ en el GPP respecto al GC ($p < 0.05$), sin diferencias en viabilidad celular (GC: $92.59 \pm 6.92\%$ vs GPP: $92.47 \pm 5.79\%$, $p > 0.05$). Ambas poblaciones (GC y GPP) fueron cultivadas durante 8 días en medio DMEM, con y sin enriquecimiento, denominándose Grupo Cultivo Control (GCC) y Grupo Cultivo Post Percoll (GCP), respectivamente. La evaluación mostró un incremento significativo de células sDBA+ en los cultivos, especialmente en GCP ($p < 0.05$). Paralelamente, se aislaron células de Sertoli mediante lectina DSA y se cultivaron en medio DMEM + 10% SFB hasta alcanzar el 90% de confluencia. Luego, se realizó un co-cultivo con SSC enriquecidas, observándose un crecimiento rápido y la formación de quistes sincitiales tras aproximadamente dos semanas, fenómeno ausente en los cultivos sin células de Sertoli.

Semejante a otros estudios enfocados en la búsqueda de fuentes accesibles para medicina regenerativa, se logró el aislamiento de células madre a partir de piel de

camello, empleando muestras dérmicas obtenidas de la región auricular de cinco camellos de élite. A partir de estas muestras se identificaron y separaron fibroblastos, queratinocitos y progenitores esferoides, utilizando digestión enzimática y separación por tripsinización diferencial. Se observó que los tiempos de resistencia frente a la tripsina fueron variables según el tipo celular: 1.5 minutos para fibroblastos, 4 minutos para queratinocitos y 7 minutos para los progenitores esferoides. Posteriormente, todas las líneas celulares fueron sometidas a choque térmico, tras el cual se evidenció una recuperación completa, destacando la capacidad de los progenitores esferoides para diferenciarse en neuronas. De forma similar, se evaluó la criopreservación de fibroblastos y progenitores esferoides, conservando ambos su capacidad proliferativa tras el proceso. Las células formadoras de quistes dérmicos, al ser sometidas a presión osmótica, colapsaron momentáneamente, pero lograron restaurar su estructura celular en condiciones normales (Saadeldin et al., 2019).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Camélidos Sudamericanos (CSA)

Los CSA de Perú, Bolivia, Argentina, Chile y Ecuador influyen en el desarrollo socioeconómico de las poblaciones de las tierras altas de los Andes debido a su adaptación a climas extremos (3000 a 5000 m) y su habilidad para transformar eficazmente los pastos áridos de estas tierras altas en productos de alta calidad, como fibra y productos cárnicos, además de ser utilizados para el transporte, proporcionando estiércol como fertilizante, como fuente de ingresos económicos y desempeñando un papel relacionado en las celebraciones festivas (Quispe et al., 2009; Sotomaior et al., 2019).

La alpaca es considerada como la especie en el país con mayor aprovechamiento por el hombre y tiene una importancia socioeconómica para el desarrollo de las regiones Altoandinas (Bustinza et al., 2021). Tanto los camélidos silvestres al igual que los domésticos fueron, y en varios casos aún son, el recurso más apreciado para el sustento andino (Vilá & Arzamendia, 2022). Llegando a adaptarse a vivir en alturas y zonas de escasos recursos naturales proporcionando carne de alto valor proteico con bajo colesterol, del mismo modo su fibra de gran demanda nacional y mundial (Paredes et al., 2009; Pinto J et al., 2010).

2.2.2 Tejido conectivo

Es un tejido que se caracteriza por su función de sostén del tejido epitelial y muscular a los cuales da soporte al rellenar espacios vacíos, ubicado en entre la dermis y la hipodermis. Los tejidos conectivos se originan de la mesénquima embrionaria y están ampliamente distribuidos en nuestro organismo. Desempeñan funciones mecánicas (relleno, armazón, sostén), nutrición e intercambio metabólico, defensa. reserva y reparación. Se clasifican en tejidos conectivos propiamente tales y tejidos conectivos especiales: el cartilaginoso y el óseo. Están constituidos por células y sustancias intercelulares llamadas matriz extracelular (MEC). Las células son de uno o más tipos en los diferentes tejidos y están presentes en diferente cantidad. La matriz extracelular (MEC) está formada por fibras y sustancia fundamental. Las fibras son las colágenas y reticulares formadas por la proteína colágena y las elásticas formadas principalmente por elastina. (De Castro et al., 2024; Lacolla et al., 2010; Sepúlveda & Soto, 2016; Zanuzzi et al., 2022).

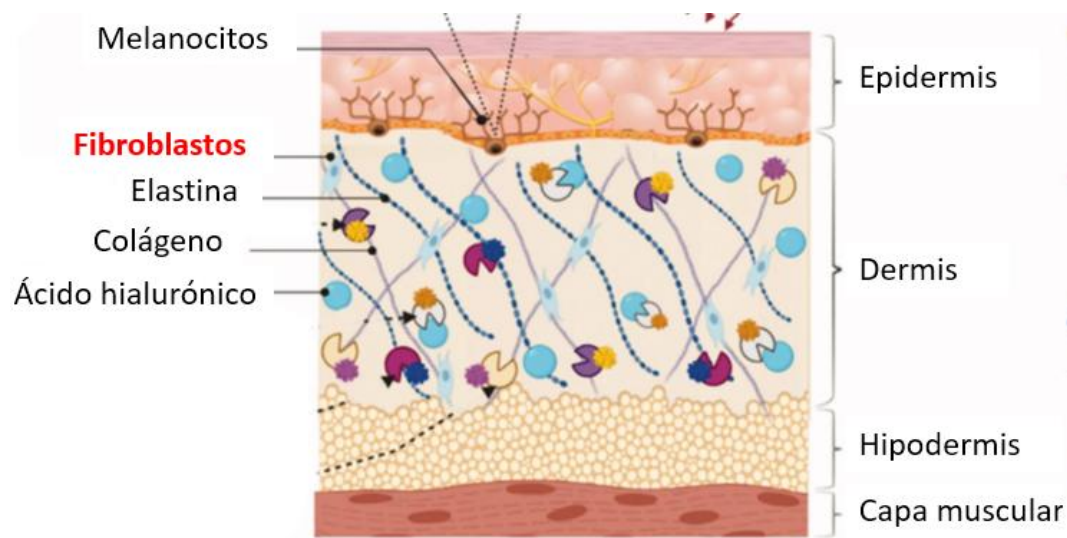


Figura 1. Organización estructural de la piel y distribución de los componentes de la matriz extracelular.

Fuente: Modificado de (Favas et al., 2021)

2.2.2.1 Tejido conectivo en camélidos

El conocimiento respecto al tejido conectivo y los fibroblastos en CSA ha sido abordado a través de estudios morfológicos, moleculares y bioquímicos, aunque nunca en ensayos clínicos en plataformas como Clinical Trials.gov, lo que sugiere una brecha en la investigación clínica de esta área (Clinical Trial Search). La información existente proviene principalmente de investigaciones en animales como llamas, alpacas, vicuñas y guanacos y abarca desde la caracterización ultraestructural y la composición proteica

de tendones, ligamentos, órganos oculares y tejidos reproductivos, hasta las implicancias de estas estructuras en la integridad mecánica y funcional de los sistemas orgánicos.

El tejido conectivo en CSA se caracteriza por su alta resistencia y organización, lo cual se debe en gran medida a una matriz extracelular dominada por fibras colágenas, en particular colágeno tipo I, que forma fibrillas de gran diámetro encargadas de conferir soporte mecánico a estructuras como tendones y ligamentos (Reed et al., 2007) . En CSA según Lacolla et al.,(2010), en guanaco, llama y cruces la epidermis es gruesa en la cabeza y cuello, delgada generalmente en regiones inguinales, axilares y en toda la piel de la vicuña. Los folículos pilosos pueden presentarse en forma aislada o en agrupaciones, según la zona cutánea y la especie (De Castro et al., 2024; Lacolla et al., 2010). Esta matriz extracelular también contiene menores cantidades de colágeno tipo III, frecuentemente asociados con procesos de reparación y remodelación, aunque en condiciones de hiperextensión articular en llamas no se registra un aumento significativo de este componente, lo que evidencia una estabilidad en el entramado conectivo (Reed, 2008; Reed et al., 2007) . Además, la actividad enzimática de la oxidasa una enzima crucial para el establecimiento de enlaces cruzados entre las fibras de colágeno se ha documentado como normal en muestras tanto de animales afectados como de controles, lo que indica un mecanismo de estabilización eficaz en el tejido conectivo de estas especies (Reed, 2008; Reed et al., 2007). La integridad estructural y la resistencia mecánica del tejido se ven reforzadas por un equilibrio adecuado entre la síntesis y degradación de componentes, regulado por enzimas como las metaloproteinasas de matriz (MMPs) y sus inhibidores (TIMP) , cuya actividad ha sido objeto de estudio en diversas investigaciones. En este contexto, los fibroblastos juegan un papel fundamental en la producción, mantenimiento y remodelación de la matriz extracelular, siendo responsables de sintetizar colágeno, proteoglicanos y otros componentes que aseguran la función estructural de los tejidos (Gartner, 2021; Reed, 2008).

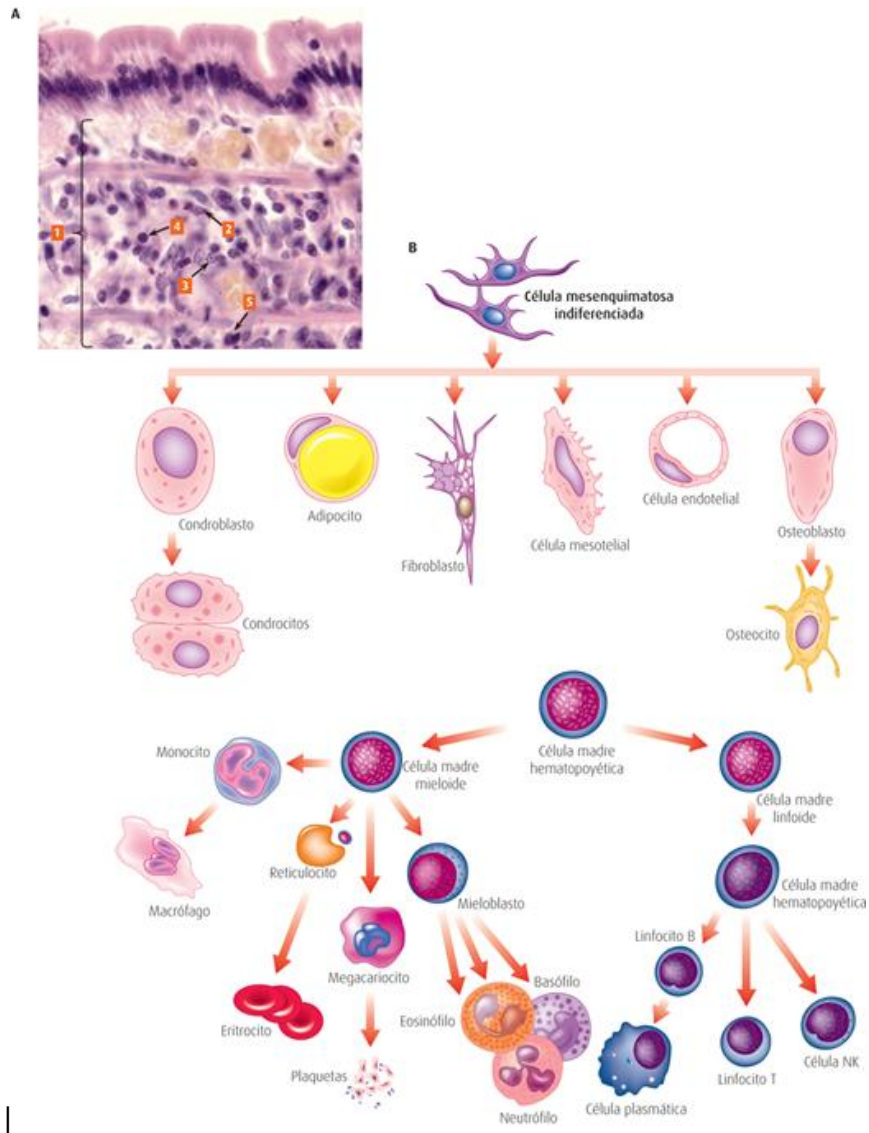


Figura 2. Estructura de la piel y componentes celulares.

A. Fotomicrografía de intestino delgado que muestra el tejido conectivo (1) con fibroblastos (2), células plasmáticas (3), linfocitos (4) y macrófagos (5). H y E. B. Esquema que muestra los tipos celulares que se encuentran en el tejido conectivo y que se derivan de las células mesenquimatosas y hematopoyéticas. Fuente: (Sepúlveda & Soto, 2016)

2.2.3 Fibroblastos

Los fibroblastos son un tipo especial de células de tejido conectivo que se encuentran en la piel, los tendones y otros tejidos duros del cuerpo. Son de particular importancia en la investigación genética porque se encuentran en la piel, células que pueden aislarse fácilmente del cuerpo humano, cultivarse en el laboratorio y analizarse para determinar

el genotipo y ciertos fenotipos específicos (National Human Genome Research Institute, 2023).

Los fibroblastos son potencialmente útiles para ser aplicados en biotecnología reproductiva, como la clonación (fin de obtener células). Las células identificadas como fibroblastos son un tipo de células somáticas y su cultivo avanza a través del tiempo en diferentes especies de bovinos, roedores, artrópodos y anfibios que pueden ser usados para el estudio de mecanismos celulares, obtención de productos celulares, generación de tejidos artificiales y la transferencia de núcleos celulares, que consiste en que a un ovocito enucleado se introduzca el núcleo de una célula. Las células fibroblásticas son un excelente donante nuclear en diferentes especies (García, 2019; Kim et al., 2022). Sin embargo, el cultivo de fibroblastos implica el uso de enzimas que facilitan su desprendimiento del tejido, entre las cuales se utiliza colagenasa, tripsina y hialuronidasa con el fin de obtener mayor porcentaje de desprendimiento celular (Candelise et al., 2023; García, 2019); y un medio de cultivo que aporta los nutrientes como DMEN, Tissue Culture Medium-199 (TCM-199) o RPMI (Simancas et al., 2018); y factores de crecimiento necesarios para su proliferación y supervivencia.

Por ello, es fundamental evaluar el tipo de enzima y el medio de cultivo a utilizar para obtener un efecto significativo en la viabilidad y el rendimiento celular de fibroblastos de alpaca, y que este permita obtener una combinación óptima entre estos factores evidenciando un mayor número y calidad de células en un cultivo primario.

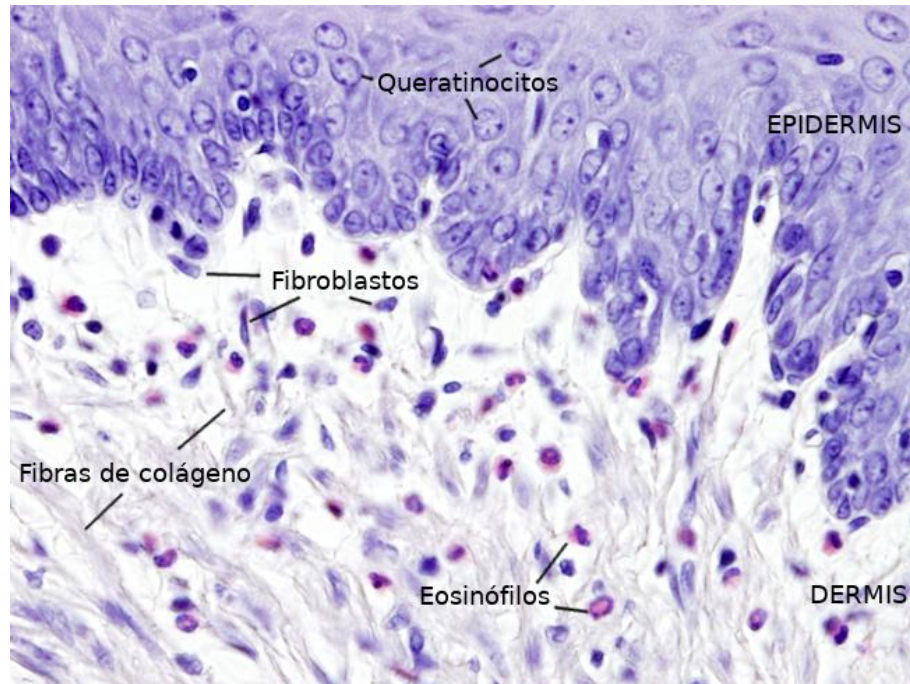


Figura 3. Fibroblastos del tejido epidérmico.

Fuente: Tipos celulares. Fibroblasto. Atlas de Histología Vegetal y Animal

2.2.4 Cultivo celular

El cultivo celular es un método de mantenimiento y propagación de tejidos, que se lleva a cabo en condiciones fisiológicas adecuadas, tales como fisiológica, temperatura, pH, CO₂, O₂ y nutrientes; juntamente se deben añadir condiciones de esterilidad. Para que para las células animales puedan crecer fuera del órgano o tejido se deben cumplir las condiciones mencionadas. Dependiendo del tipo de célula que se desea cultivar, ya sea con el propósito de obtención de células o productos celulares, el medio de cultivo y suplementos son esenciales, debido a su aporte de carbohidratos, aminoácidos, minerales, hormonas, factores de crecimiento (Segeritz & Vallier, 2017; Verma et al., 2020; Zhao, 2023).

El cultivo de células en condiciones artificiales controladas se ha convertido en una herramienta fundamental en biología celular y molecular. Tanto las células primarias como las líneas celulares establecidas son esenciales para la investigación básica, biomédica y aplicada. No obstante, estas líneas suelen sufrir problemas de mala identificación o contaminación, ya sea por otras células, bacterias, hongos, levaduras, virus o compuestos químicos. Además, su manipulación implica riesgos biológicos y

químicos que requieren medidas estrictas de bioseguridad, como cabinas especializadas, sistemas cerrados y equipo de protección adecuado, con el fin de evitar la exposición a agentes peligrosos y mantener la asepsia (Weiskirchen et al., 2023).

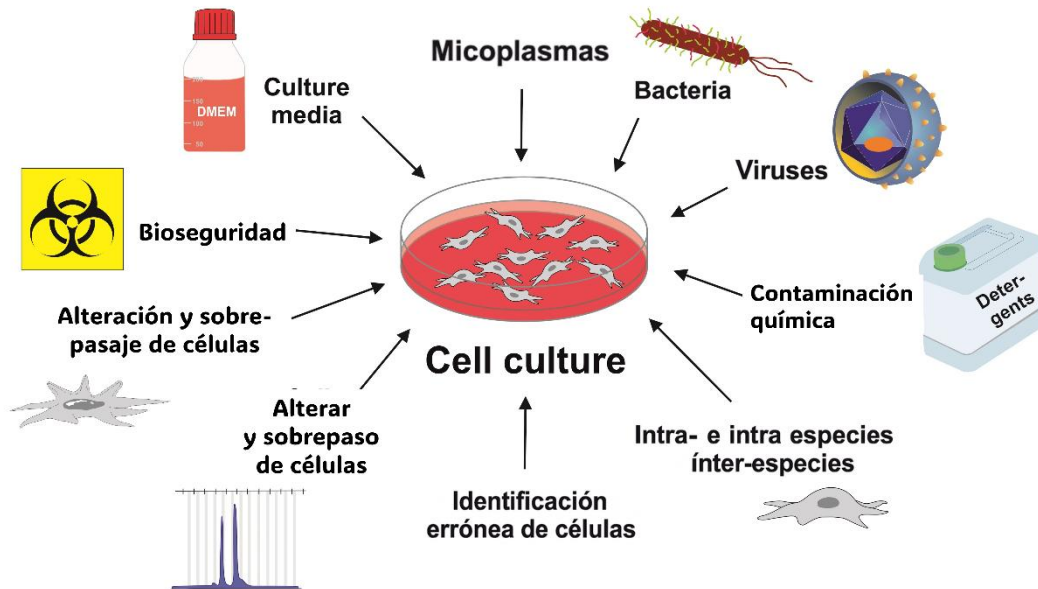


Figura 4. Elementos que afectan la integridad y reproducibilidad del cultivo celular

Fuente: Modificado de (Weiskirchen et al., 2023)

2.2.4.1 Cultivo de línea celular

Las células de un cultivo primario son subcultivos que se dispersan por digestiones enzimáticas y se ponen en un nuevo recipiente de cultivo, convirtiéndose en una línea celular que puede cultivarse finita o infinitamente, dependiendo del número de células que se puede obtener una mayor tasa de crecimiento con población semejante y uniforme; y de tu tiempo de vida útil en el cultivo. Sus características se conservan durante las sucesivas generaciones y, si se conservan en nitrógeno líquido de forma indefinida (Verma et al., 2020).

2.2.4.2 Cultivo celular primario

El cultivo celular primario es fundamental en los experimentos *in vitro*. Actualmente, se emplean diversas técnicas de cultivo, entre las que destacan la digestión enzimática y el cultivo en bloques de tejido (Deng et al., 2023). El cultivo en el cual se utiliza acción de una enzima, comienza cortando el tejido en pequeños pedazos de tejido y digerirlos

con la enzima con el fin de disgregar las células (Babayev et al., n.d.; Deng et al., 2023; Eikmans et al., 2022). Posteriormente, cultivadas en placas con medios adecuados, debido a esto tienen una baja tasa de crecimiento; pero comparten el mismo cariotipo del padre. Los fenotipos comunes de las células primarias son: epiteliales, endoteliales, queratinocitos, melanocitos, fibroblastos, osteoblastos, miocitos y hepatocitos (Sigma Aldrich, 2023; Verma et al., 2020).

2.2.4.3 Cultivo celular de fibroblastos

Como las células principales en la dermis, los fibroblastos (FB) son las células más comunes y fáciles de obtener en el cultivo primario (Deng et al., 2023; Jia et al., 2022). Responden a la lesión tisular y la inflamación diferenciándose en miofibroblastos y secretando proteínas de la matriz extracelular. Son los principales mediadores de la respuesta fibrótica en todos los tejidos y órganos. Los fibroblastos primarios adultos representan una herramienta esencial para estudios *in vitro* (Almazloum & Khalil, 2023). Aunque el método de cultivo de digestión enzimática facilita una cosecha rápida de células, tiene algunas desventajas como el tiempo de digestión incontrolable, el alto consumo de material, la baja capacidad de proliferación y la vulnerabilidad de las células a la contaminación en los procesos de cosecha (Jia et al., 2022).

2.2.5 Digestión enzimática

Las enzimas son moléculas de naturaleza proteica que forman parte de todos los seres vivos dotadas de una actividad catalítica de reacciones biológicas teniendo especificidad al sustrato, manteniendo a la célula activa metabólicamente. Estas son obtenidas de plantas, animales y microorganismos; los grupos más importantes son las lipasas y proteasas, utilizados como catalizadores de ruptura de enlaces; oxidorreductasas y transferasas e isomerasas utilizadas para fines industriales (Cortez & Murga, 2016; Renneberg et al., 2017).

2.2.6 Enzimas utilizadas para digestión enzimática

2.2.6.1 Colagenasa

Pertenece a un grupo de metaloproteínas de matriz (MMP), son una familia de proteasas neutras que contienen zinc, dependientes de calcio y tienen semejante estructura de

dominio. Las MMP secretan 3 tipos de colagenasas que son más eficaces al degradar colágeno de triple hélice (Cerri et al., 2022; Jiménez, 2023). Ahora comúnmente es obtenida de *Clostridium histolyticum* debido a la efectividad de la enzima y a su acción a bajas temperaturas de 10°C, que previamente debe ser activada por calcio (Thams, 2016).

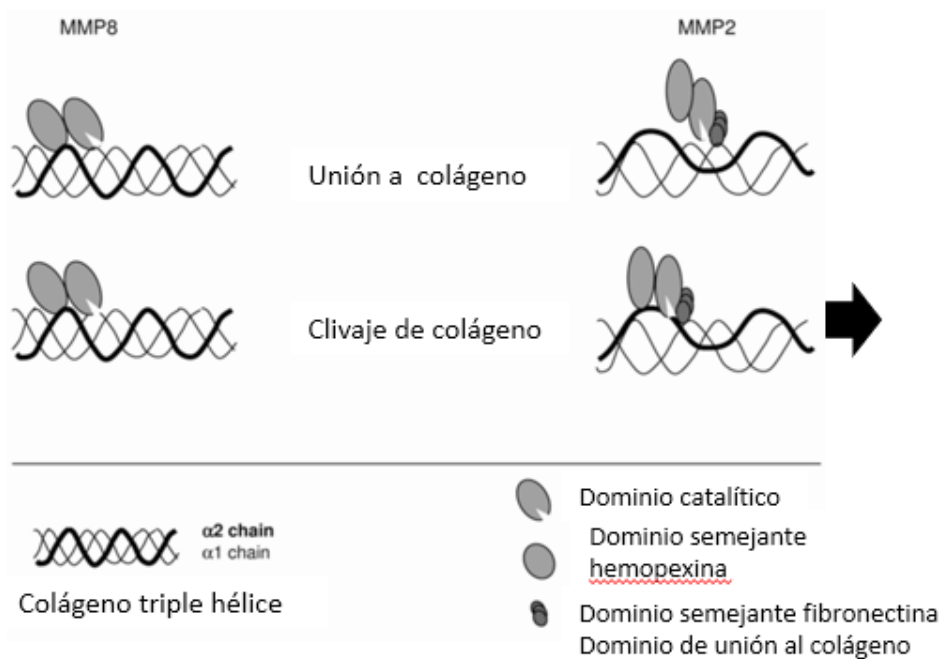


Figura 5. Mecanismo de acción de la colagenasa

Fuente: Modificado de (Aureli et al., 2008)

La colagenasa actúa uniéndose específicamente al colágeno en su estructura de triple hélice, gracias a dominios de unión al colágeno (similares a fibronectina y hemopexina). Una vez unida, su dominio catalítico hidroliza enlaces peptídicos específicos del colágeno, utilizando agua. Este proceso produce el clivaje de las cadenas de colágeno, generando fragmentos más pequeños. La colagenasa reconoce secuencias características como Gly-Pro y Gly-Hyp, que son puntos clave de corte. Dependiendo del tipo de colagenasa, el clivaje puede ocurrir en los extremos (ColG) o en regiones internas (ColH) de la molécula (Aureli et al., 2008).

2.2.6.2 Hialuronidasa

Es una enzima que actúa descomponiendo el ácido hialurónico, que se ubica en la matriz extracelular; esta enzima rompe sus enlaces glucosídicos y también descompone partes ácidas del tejido conectivo. Existen seis tipos conocidos de hialuronidasa, el tipo 1 y HYALP1 actúa en plasma sanguíneo, el tipo 2 es menos efectivo que el tipo 1; del tipo 3 se desconoce su función, el tipo PH20 está ubicado en la membrana acrosomal y actúa degradando el ácido hialurónico del ovulo al momento de la fecundación (Jung, 2020).

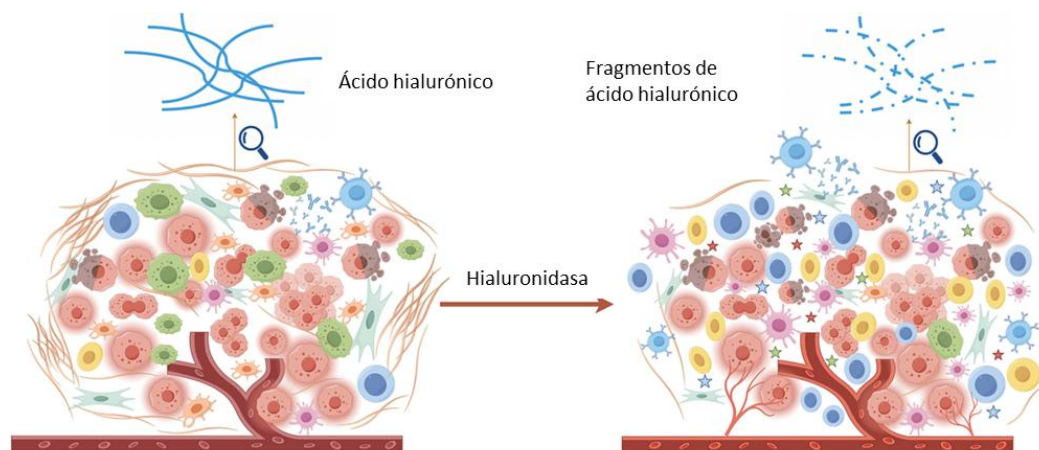


Figura 6. Mecanismo de acción de la hialuronidasa

Fuente: Modificado de (Lu et al., 2025)

La acción de la hialuronidasa se basa en la hidrólisis de los enlaces glucosídicos, lo que preserva la estructura de los polímeros de ácido hialurónico formando fragmentos más pequeños. Este proceso reduce la viscosidad de la matriz extracelular, facilita el desprendimiento celular y aumenta la permeabilidad de los tejidos. Por esta razón, la hialuronidasa se describe comúnmente como un "factor de difusión" porque promueve la difusión de moléculas, células y fluidos a través del tejido conectivo (Lu et al., 2025). Desde una perspectiva biológica, la degradación controlada del ácido hialurónico es fundamental en procesos como la remodelación tisular, la inflamación, la angiogénesis y la cicatrización de heridas. Además, en contextos experimentales y clínicos, la hialuronidasa se utiliza para mejorar la penetración del fármaco, facilitar la digestión enzimática de los tejidos y optimizar la liberación celular durante los procedimientos de aislamiento primario (Lu et al., 2025).

2.2.7 Medios de cultivo celular

Los medios de cultivo proporcionan a las células las condiciones favorables para su desarrollo, tales como la administración de nutrientes, energía, pH, osmolaridad;

incubados a una temperatura que depende del origen de la célula. Algunos medios tales como TCM-199 y DMEM, con un complemento adecuado tiene una amplia aplicabilidad (Segeritz & Vallier, 2017).

Tabla 1. Medios comunes y sus aplicaciones

Medio de cultivo	Tejidos o líneas celulares
MEM	Fibroblasto embrionario de pollo, células COCH, células nerviosas embrionarias, células tipo alveolares, endotelio, epidermis, fibroblastos, glia, glioma, tumores humanos, melanoma
DMEM	Endotelio, células epiteliales alveolares fetales tipo II, epitelio del cuello uterino, células gastrointestinales, neuroblastoma de ratón, células porcinas de las glándulas tiroides, líneas celulares de carcinoma ovárico, células musculares del esqueleto, células de Sertoli, fibroblasto de hámster sirio
RPMI-1640	Células T y timocitos, células madre hematopoyéticas, tumores humanos, líneas celulares de leucemia mielóide humana, líneas celulares de leucemia linfoblastoide humana, mieloma de ratón, leucemia de ratón, eritroleucemia de ratón, hibritoma de ratón, células hepáticas de rata
Mezcla de nutrientes F-10 y F-12	de Retina, hueso, cartílago, tejido adiposo, células pulmonares embrionarias pigmentadas de pollo, células musculares esqueléticas
IMDM	Médula ósea, células progenitoras hematopoyéticas, líneas celulares de leucemia linfopoyóide humana

Fuente: (Arora, 2023).

2.2.8 Medios de cultivo celular comunes

2.2.8.1 *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*

El DMEM contiene casi el doble de aminoácidos y cuatro veces más vitaminas que el EMEM, además de nitrato férrico, piruvato de sodio y aminoácidos extra. Su formulación original incluía 1000 mg/L de glucosa y fue diseñada para cultivar células embrionarias de ratón; posteriormente, una versión con 4500 mg/L resultó más adecuada para diversos tipos celulares; como medio basal, no aporta proteínas ni factores de crecimiento, por lo que suele suplementarse con 5–10% de SFB. Utiliza un sistema tampón de bicarbonato de sodio, por lo que requiere CO₂ para mantener el pH. En su versión en polvo se omite el bicarbonato, que debe añadirse (3,7 g/L) al preparar el

medio, demostrado amplia utilidad en cultivos de células primarias de ratón y pollo, estudios virales y propagación de hibridomas.(Arora, 2023)

2.2.8.2 RPMI-1640

El RPMI-1640 es un medio de uso general ampliamente empleado en cultivos de células mamíferas, especialmente aquellas de origen hematopoyético. Fue desarrollado en el *Roswell Park Memorial Institute* como una modificación del medio McCoy's 5A, con el fin de sustentar el cultivo prolongado de linfocitos de sangre periférica. Utiliza un sistema tampón basado en bicarbonato y se caracteriza por su formulación habitual con pH cercano a 8. Este medio favorece el crecimiento de células tanto en suspensión como en monocapa. Cuando se suplementa adecuadamente con suero o sustitutos de suero, resulta apto para diversas aplicaciones, entre ellas el cultivo de linfocitos humanos frescos, protocolos de fusión celular y la expansión de hibridomas para la producción de anticuerpos. También se emplea de forma rutinaria para conservar o suspender células mononucleares de sangre periférica (Arora, 2023; Thermo Fisher Scientific, 2025).

2.2.8.3 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)

El EMEM, uno de los primeros medios ampliamente utilizados, fue formulado por Harry Eagle a partir del Basal Medium Eagle. Contiene sales balanceadas, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio, y se formula con una concentración reducida de bicarbonato (1500 mg/L) para su uso con atmósferas de 5% de CO₂. Debido a su naturaleza poco compleja, suele enriquecerse con suplementos o mayores concentraciones de suero, lo que permite su aplicación en diferentes líneas celulares mamíferas. Ha sido empleado, por ejemplo, para el mantenimiento de células HepG2 y líneas como HeLa (Arora, 2023).

III. MATERIALES Y METODOS

3.1 Ubicación de la zona de estudio

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal de la Estación Experimental Agraria Canaán del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), ubicado en el distrito de Andrés Avelino Cáceres Dorregaray de la provincia de Huamanga, región Ayacucho, a una altitud de 2735 msnm, con coordenadas UTM, Zona (Z): 18 L, Coordenada Este (X): 586182.71 m, Coordenada Norte (Y): 8544663.29 m, Hemisferio sur, según (Google, 2025).

3.2 Población y Muestras

La población de estudio comprendió a las alpacas del plantel de reproductores de la Estación Experimental Agraria Canaán, INIA, Ayacucho. La muestra consistió en 12 biopsias colectadas de 6 alpacas macho de la raza Huacaya, adultos boca llena.

3.3 Metodología y recolección de datos

3.3.1 Obtención de muestras

3.3.1.1 Desinfección de zona de *punch*

Se ubicó una zona libre de lesiones, luego se procedió a lavar con jabón carbónico, rasurar, lavar otra vez con jabón carbónico y limpiar con alcohol de 70° y alcoyodo 2%; seguidamente con ayuda de papel toalla se eliminó restos de pelos y piel muerta (Navarrete et al., 2016).

3.3.1.2 Extracción de biopsia de tejido por *punch*

Posteriormente, utilizando un sacabocado de 6 mm, se aplicó tensión rotatoria girando el mango sobre la epidermis hasta percibir una disminución de la resistencia, lo que indicó que se había atravesado la capa de grasa y alcanzado la hipodermis. A continuación, se retiró el punzón y se controló cualquier sangrado con una gasa estéril. Con la ayuda de pinzas dentadas, se levantó la muestra y se colocó en un tubo Falcon etiquetado que contenía una solución de transporte compuesta por PBS suplementado con 10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina y 25 µg/ml de anfotericina B (Levitt et al., 2013; Navarrete et al., 2016).

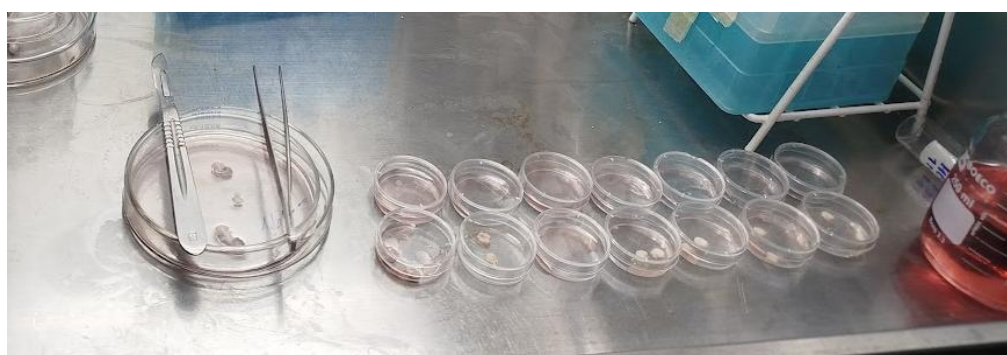


Figura 7. Muestras de biopsias de oreja de alpaca.

Fuente: elaboración propia

3.3.2 Aislamiento celular

Con la ayuda de un bisturí y pinzas dentadas, se realizaron cortes en pequeños fragmentos de aproximadamente 0,3 × 0,3 mm. Posteriormente, los fragmentos se colocaron en placas que contenían colagenasa y, en paralelo, en otras que contenían una mezcla de colagenasa-hialuronidasa. Las muestras se mantuvieron en incubación a 37 °C y 5% de CO₂. Finalmente, las células se separaron utilizando una membrana de nailon de 100 µm y se transfirieron a un tubo que contenía medio de cultivo DMEM o TCM-199 (Ávila et al., 2015; García, 2019).

Las muestras obtenidas fueron sometidas a dos enzimas de digestión:

Enzima 1: Colagenasa 3mg/ml

Enzimática 2: Colagenasa 3mg/ml - Hialuronidasa 1mg/ml

Tabla 2. Condiciones aplicadas en aislamiento de fibroblastos de alpaca

Tratamiento aislamiento celular

Fase	Grupo	Método	Medio de preparación	Descripción
Aislamiento	G1	Colagenasa 3mg/ml	TCM-199	37°C, 4h
Aislamiento	G2	Colagenasa 3mg/ml	DMEM	37°C, 4h
Aislamiento	G3	Colagenasa 3mg/ml + hialuronidasa 1mg/ml	TCM-199	37°C, 2h de hialuronidasa + 4h de colagenasa
Aislamiento	G4	Colagenasa 3mg/ml + hialuronidasa 1mg/ml	DMEM	37°C, 2h de hialuronidasa + 4h de colagenasa

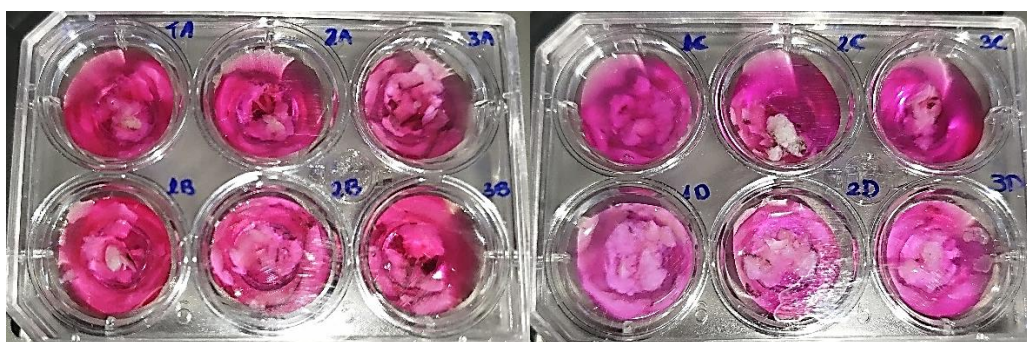


Figura 8. Distribución de disgregación enzimática de biopsias obtenidas de *Vicugna pacos* “alpaca” en medio DMEM o TCM-199.

Fuente: elaboración propia

3.3.3 Cultivo primario de fibroblastos

Las muestras digeridas fueron cultivadas en 2 ml de medio de cultivo celular DMEM y TCM-199, suplementados con 10 % de SFB, L-glutamina y una solución Antibiótico-Antimicótico (10.000 U/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomina y 25 µg/ml de anfotericina B). Las muestras se incubaron a 37 °C, con una atmósfera controlada de 5 % de CO₂ y 90 % de humedad relativa (Candelise et al., 2023). El cultivo se llevó a cabo en placas de 1.9 cm² hasta alcanzar la confluencia celular del 80%.

Todos los medios de cultivo y enzimas utilizados en la presente investigación son comercializados por Sigma-Aldrich Company, Ltd, UK; salvo se indique lo contrario.

Tabla 3. Métodos aplicados en cultivo celular de fibroblastos

Fase	Grupo	Tratamiento celular	aislamiento		Medio de cultivo	Condiciones
Cultivo	G1	Colagenasa 3mg/ml en TCM-199			TCM-199	
Cultivo	G2	Colagenasa 3mg/ml en DMEM			DMEM	Cultivo a 37.5°C con 5% CO2, hasta alcanzar 80% de confluencia.
Cultivo	G3	Colagenasa 3mg/ml + hialuronidasa 1mg/ml en TCM-199			TCM-199	
Cultivo	G4	Colagenasa 3mg/ml + hialuronidasa 1mg/ml en DMEM			DMEM	

3.3.4 Evaluación de viabilidad celular mediante ensayo de exclusión mediante la coloración de azul de Tripán

Luego de la digestión enzimática y del cultivo celular, se tomó un volumen de la suspensión celular al cual se añadió colorante azul de tripán al 4 %. La mezcla se llevó a una cámara hematocitométrica (cámara de Neubauer) y se realizó el conteo bajo un microscopio hasta alcanzar un total de 200 células, con el propósito de determinar la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión vital. En este procedimiento, se consideraron como células viables aquellas que no presentaron tinción (Huamani, 2018; Serrano, 2017).

Posterior al recuento, se aplicó la siguiente fórmula:

$$\frac{\sum(\text{total de células en } A + B + C + D)}{4} \times 10^4 \times FD = N^\circ \text{ Cell/ml}$$

FD = factor de dilución correspondiente a la proporción de suspensión celular adicionada con el azul de tripán, y

A, B, C, D = campos de la cámara de Neubauer utilizados para el conteo.

La viabilidad celular se expresó en porcentaje, aplicando la fórmula:

$$\% \text{viabilidad celular} = \frac{V \times 100}{T}$$

donde T corresponde al total de células contadas (viables y no viables).

3.3.4.1 Evaluación de viabilidad y apoptosis celular mediante tinción doble fluorescente (Hoechst 33342/PI)

Luego de la digestión enzimática y del cultivo celular, se realizó la prueba de viabilidad con Hoechst 33342, un fluorocromo capaz de atravesar la membrana plasmática y unirse de manera específica al ADN en las regiones ricas en bases A-T. Se efectuaron las lecturas correspondientes, observándose las células que se tiñeron de azul debido a la unión del fluorocromo con los núcleos celulares (Trejo, 2014). Paralelamente, se llevó a cabo la inclusión de yoduro de propidio, marcador que permite evaluar la integridad de la membrana plasmática en las etapas finales de la muerte celular (Lopez & Ayón, 2019).

Ambos colorantes fueron incubados en oscuridad durante 5 minutos y, posteriormente, se realizó el conteo bajo un microscopio de fluorescencia a 200X, hasta alcanzar un total de 100 células.

3.3.5 Evaluación del rendimiento

El rendimiento se determinó a partir del número de células obtenidas y del porcentaje de viabilidad celular durante las fases de aislamiento y cultivo. Adicionalmente, el rendimiento fue descrito mediante el tiempo de duplicación celular (días), calculado a partir de la tasa de crecimiento observada durante el periodo de cultivo (Huamani, 2018; Sanchez-Castro et al., 2021; Serrano, 2017).

$$\text{Tiempo de duplicación} = \frac{t \times \ln(2)}{\ln(N_t/N_0)}$$

Donde:

TD = tiempo de duplicación celular (días),

t = tiempo total de cultivo transcurrido (días),

N₀ = número inicial de células al inicio del cultivo,

N_t = número final de células al final del periodo de cultivo, y

ln = logaritmo natural.

3.3.6 Evaluación de proliferación celular

La evaluación de la proliferación celular se realizó a partir de imágenes obtenidas mediante microscopía óptica en distintos días de cultivo. Las imágenes fueron

analizadas con el software ImageJ (versión 1.54g). En primer lugar, se convirtieron a escala de grises (8-bit) y se aplicó un umbral de intensidad (*threshold*) que permitió diferenciar claramente las células del fondo. Posteriormente, se utilizó la herramienta *Analyze Particles* para segmentar y cuantificar el número de células por campo, ajustando los parámetros de tamaño y circularidad con el fin de excluir artefactos.

Los valores obtenidos se promediaron para cada condición experimental y se expresaron como porcentaje relativo respecto al Día 0, considerado como el valor base para el análisis de proliferación celular.

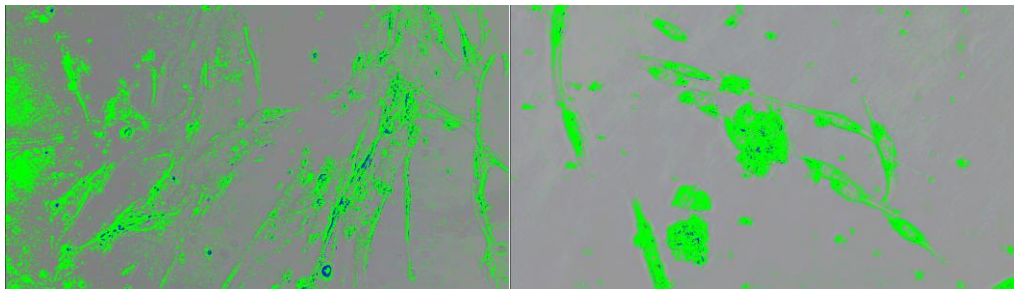


Figura 9. Imagen de referencia utilizada para el análisis del área celular ocupada mediante el software ImageJ.

Capturada a un aumento de 200× con microscopía óptica. Fuente: elaboración propia

3.3.7 Evaluación de la morfología celular

Cada tipo celular presentó características morfológicas particulares. En algunos casos, el proceso de apoptosis (muerte celular) condicionó variaciones en el tamaño de las células, observándose morfologías más grandes o en crecimiento, así como más pequeñas o en retracción. Asimismo, se evidenciaron deformaciones estructurales que, en conjunto con otros métodos de análisis, permitieron obtener una mejor interpretación de los resultados (Lopez & Ayón, 2019)..

La morfología celular se monitoreó mediante microscopía de luz, registrándose fotomicrografías del aspecto celular a una ampliación de 200X.

3.4 Procesamiento de datos

Para determinar la relación entre la enzima utilizada y el disgregado enzimático (viabilidad y rendimiento), se empleó un análisis de varianza simple (ANOVA unifactorial), considerando la viabilidad y el rendimiento como indicadores de la efectividad enzimática. Asimismo, para evaluar el efecto combinado de la enzima y el

medio de cultivo sobre la proliferación y la viabilidad celular, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA). Los datos obtenidos fueron analizados con un nivel de significancia de $p < 0,05$.

IV. RESULTADOS

Tabla 4. Efecto de tratamiento enzimático en la fase de aislamiento celular sobre el rendimiento, viabilidad y apoptosis. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.

Grupo (Fase de aislamiento)	n	Variables			
		Rendimiento, Número de células (10 ⁴ /mL)	Viabilidad Tripán (%)	Viabilidad Hoechst 33342/PI (%)	Apoptosis Hoechst 33342/PI (%)
G1	3	1.78 ± 0.26 ^a	66.99 ± 4.59 ^a	65.53 ± 10.25 ^a	34.47 ± 10.25 ^a
G2	3	2.28 ± 0.57 ^a	75.21 ± 1.53 ^a	35.10 ± 3.01 ^{bc}	64.90 ± 3.01 ^{bc}
G3	3	2.42 ± 1.29 ^a	70.13 ± 3.54 ^a	46.13 ± 0.26 ^b	53.87 ± 0.26 ^b
G4	3	2.60 ± 0.28 ^a	74.75 ± 5.55 ^a	26.93 ± 4.91 ^c	73.07 ± 4.91 ^c

n: Numero de biopsias para el aislamiento celular.

a-b: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.005).

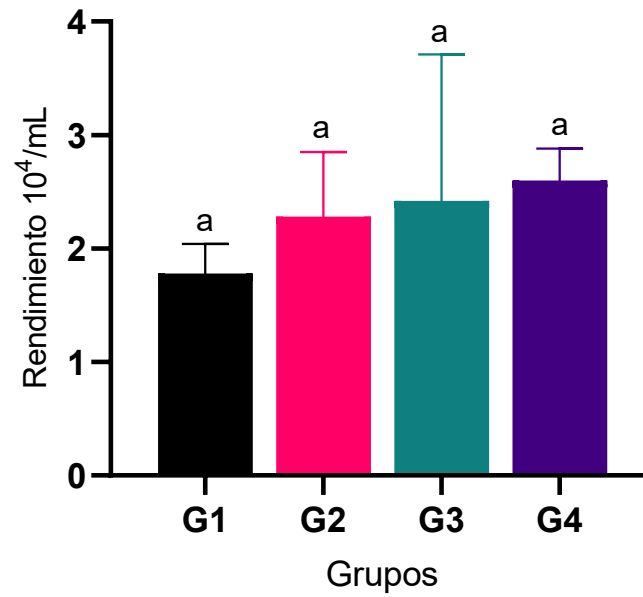


Figura 10. Efecto de tratamiento enzimático en la fase de aislamiento celular sobre el rendimiento. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.

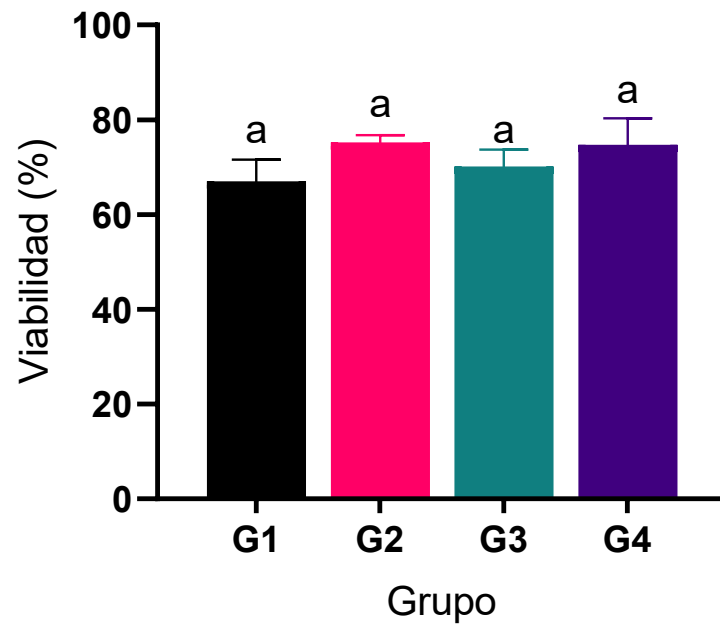


Figura 11. Efecto de tratamiento enzimático en la fase de aislamiento celular sobre la viabilidad con ensayo de exclusión mediante la coloración de azul de Tripán. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.

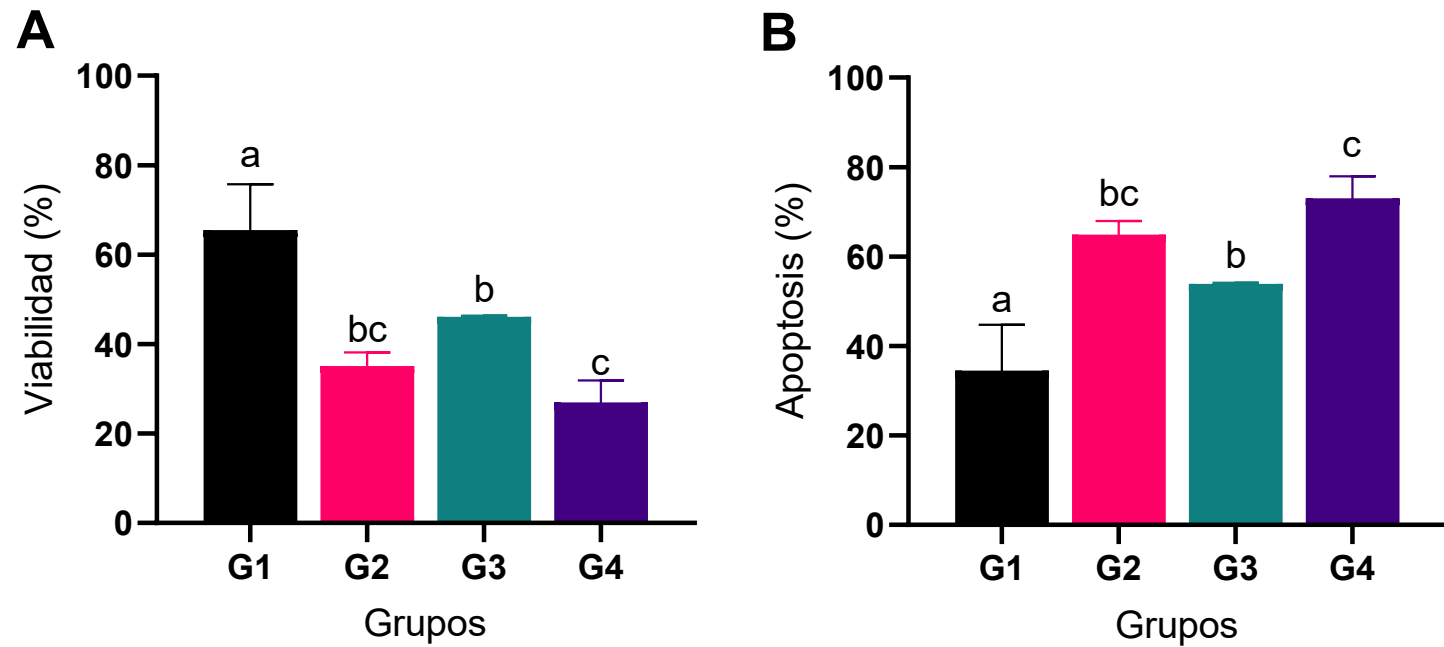


Figura 12. Efecto de tratamiento enzimático en la fase de aislamiento celular sobre la viabilidad y apoptosis celular. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho. (A) Viabilidad celular según la prueba de exclusión de Hoechst 33342/PI, (B) Apoptosis celular según la prueba de exclusión de Hoechst 33342/PI.

Tabla 5. Efecto del tratamiento enzimático en la fase de cultivo celular sobre el número de células, viabilidad y apoptosis. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.

GRUPO (Fase de cultivo)	n	Variables			
		Número de células (10 ⁴ /mL)	Viabilidad Tripán (%)	Viabilidad Hoechst 33342/PI (%)	Apoptosis Hoechst 33342/PI (%)
G1	3	4.08 ± 1.80 ^a	45.34 ± 12.38 ^a	58.33 ± 11.47 ^a	41.67 ± 11.47 ^a
G2	3	4.25 ± 1.69 ^a	71.94 ± 8.26 ^b	62.48 ± 10.94 ^a	37.52 ± 10.94 ^a
G3	3	1.10 ± 0.15 ^a	79.44 ± 2.42 ^b	67.20 ± 5.96 ^a	32.80 ± 5.96 ^a
G4	3	10.55 ± 3.70 ^a	21.88 ± 2.62 ^c	18.31 ± 6.29 ^b	81.69 ± 6.29 ^b

n: Numero de biopsias para el aislamiento celular.

a-d: Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tratamientos (p<0.005)

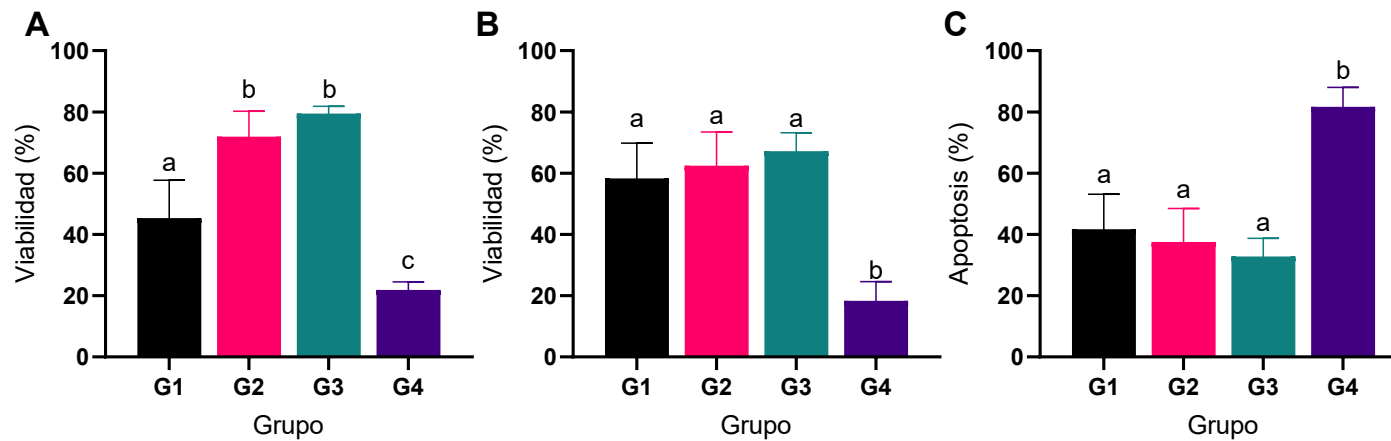


Figura 13. Efecto del tratamiento enzimático en la fase de cultivo celular sobre la viabilidad y apoptosis. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho. (A) Viabilidad con ensayo de exclusión mediante la coloración de azul de Tripán (B) Viabilidad celular según la prueba de exclusión de Hoechst 33342/PI, (C) Apoptosis celular según la prueba de exclusión de Hoechst 33342/PI.

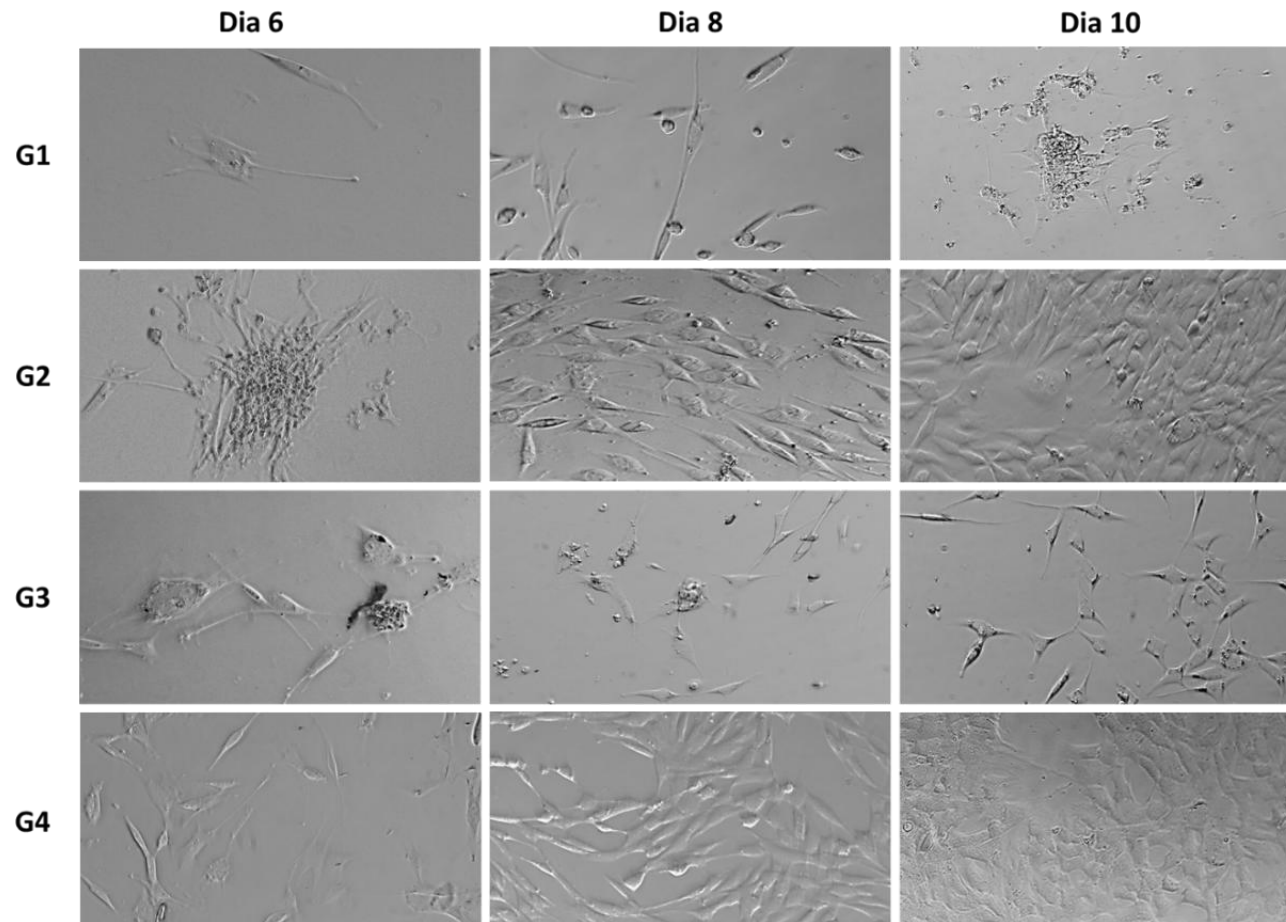


Figura 14. Confluencia y morfología celular según grupo de tratamiento y días en la fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.

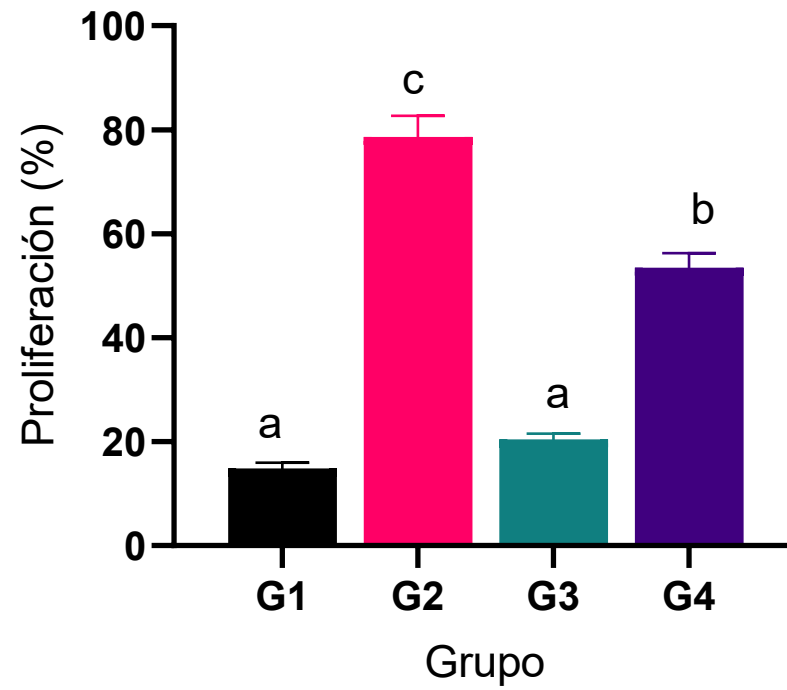


Figura 15. Proliferación de fibroblastos de alpaca de acuerdo al área de confluencia. Programa Image J. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.

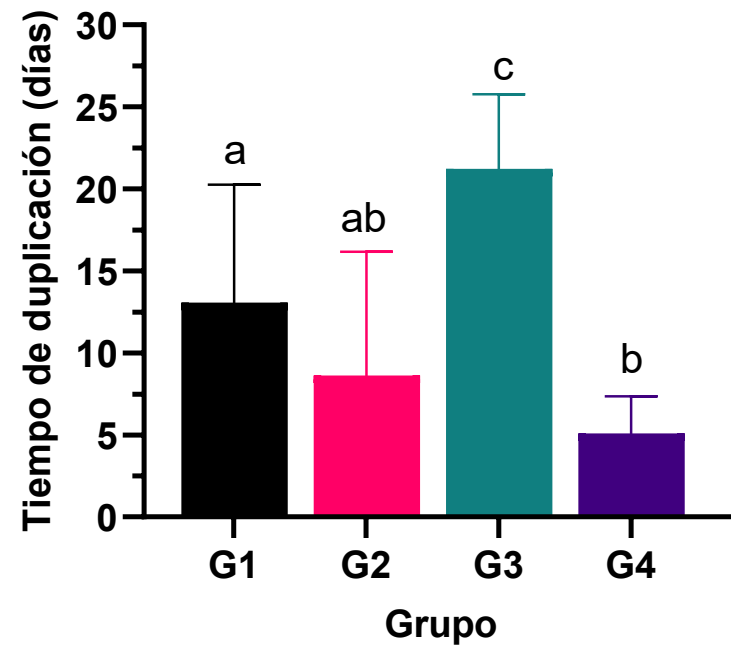


Figura 16. Tiempo de duplicación de fibroblastos de alpaca. Laboratorio de Biotecnología Reproductiva Animal, EEA Canaan INIA-Ayacucho.

V. DISCUSIONES

Durante la fase de aislamiento (Figura 10), los resultados indicaron que el número de células obtenidas fue comparable entre los tratamientos ($1.78\text{--}2.60 \times 10^4/\text{mL}$), sin diferencias significativas. Estos datos sugieren que tanto la colagenasa tipo I (3 mg/mL) por sí sola como su combinación con la hialuronidasa (1 mg/mL) resultaron efectivas para liberar fibroblastos del tejido fibroso; no obstante, la calidad celular se vio afectada. El grupo G1 (colagenasa en TCM-199) presentó un equilibrio más favorable entre viabilidad (65.53%) y apoptosis (34.47%), mientras que G2 y G4 (ambos en DMEM) mostraron una reducción significativa en la viabilidad (35.10% y 26.93%) junto con un aumento en apoptosis (64.90% y 73.07%, respectivamente) (Figura 12). Estos hallazgos demuestran que, además de la enzima empleada, el medio de soporte durante la digestión enzimática influye en la preservación de la integridad celular.

Hu et al., (2023) demostraron en células epiteliales humanas y murinas que la combinación de colagenasa y hialuronidasa mejora la viabilidad y preservación morfológica en comparación con la tripsina. En este estudio, esta combinación no mostró el mismo efecto en fibroblastos de alpaca, lo que sugiere que la respuesta varía según el tipo celular y el medio de preparación. De manera concordante, Saadeldin et al., (2019), observaron en fibroblastos de camello dromedario que la calidad del tejido inicial y la optimización del protocolo enzimático son determinantes para establecer cultivos viables y estables, destacando que la viabilidad depende tanto de la enzima como del microambiente de aislamiento.

En espermatogonias de alpaca, Huamani, (2018) reportó que el rendimiento varió según la edad de los animales (Figura 10): fue mayor en alpacas mayores de 1 año (1.94×10^6 cel/ml) y menor en ejemplares menores de 1 año (1.09×10^6 cel/ml), con valores intermedios en animales de 3-4 años (1.24×10^6 cel/ml) y menores de 5 años (1.31×10^6 cel/ml).

Este comportamiento contrasta con el observado en los fibroblastos, donde el rendimiento se mantuvo constante entre los tratamientos. Esta diferencia se atribuye a que las espermatogonias dependen de la maduración gonadal, mientras que los fibroblastos dérmicos se encuentran en abundancia y de manera relativamente estable en la oreja. Por lo tanto, en el caso de los fibroblastos, la variable crítica es la calidad celular (viabilidad y apoptosis), más que el rendimiento.

En este estudio, el aislamiento de fibroblastos de oreja de alpaca se realizó mediante digestión enzimática con colagenasa (3 mg/mL) sola o en combinación con hialuronidasa (1 mg/mL), a 37 °C durante 4 horas (colagenasa) o bien 2 horas de hialuronidasa seguidas de 4 horas de colagenasa en el protocolo combinado. Los resultados indicaron que, aunque no hubo diferencias significativas en el número de células recuperadas entre tratamientos, sí se observaron diferencias en la viabilidad y apoptosis evaluadas por Hoechst/PI. Los grupos tratados con ambas enzimas (G3 y G4) presentaron una mayor proporción de células apoptóticas en comparación con los tratados únicamente con colagenasa (G1 y G2).

Al comparar estos resultados con los métodos reportados para la obtención de la fracción vascular estromal (SVF) en tejido adiposo, se identifican tanto similitudes como diferencias. La literatura indica que los procedimientos enzimáticos, especialmente aquellos que emplean colagenasa en concentraciones de 0.075–0.2 % (w/v) (aproximadamente 750–2000 µg/mL), permiten liberar grandes cantidades de células con viabilidades entre 74–94 % (Aronowitz et al., 2015, citado de Aust et al., 2004; Yoshimura et al., 2006; Doi et al., 2013). En este estudio, la concentración de colagenasa utilizada (3 mg/mL, equivalente al 0.3 % w/v) fue superior a la de los protocolos clásicos, lo que podría explicar la disminución de la viabilidad observada en los análisis de Hoechst/PI, a pesar de obtener un rendimiento celular adecuado.

La inclusión de hialuronidasa (1 mg/mL) tuvo como objetivo facilitar la disgregación del tejido fibroso característico de la oreja de alpaca, en contraste con la matriz adiposa blanda del lipoaspirado humano. Sin embargo, este tratamiento combinado parece inducir un mayor daño celular, ya que la proporción de células apoptóticas fue significativamente mayor en G3 y G4. Este resultado es consistente con lo reportado por (Uguten et al., 2024) y Dos-Anjos Vilaboa et al. (2014) quienes señalaron que las condiciones de digestión prolongada o el uso de concentraciones enzimáticas elevadas reducen la viabilidad celular, aunque incrementen el rendimiento total (Aronowitz et al., 2015).

En conjunto, los datos sugieren que en tejidos fibrosos como el de alpaca, es fundamental equilibrar la concentración y el tiempo de exposición a las enzimas

digestivas. Mientras que los protocolos convencionales de SVF indican que dosis menores de colagenasa permiten recuperar altos porcentajes de células viables (>80 %), los resultados de este estudio evidencian que el uso de concentraciones mayores (3 mg/mL) en combinación con hialuronidasa puede comprometer la viabilidad celular, aunque se logre un mayor grado de disociación tisular.

Durante la fase de cultivo (Tabla 5), las diferencias entre los grupos fueron más pronunciadas. El grupo G4 (colagenasa+hialuronidasa en DMEM) alcanzó el mayor número de células (10.55×10^4 /mL), pero presentó la menor viabilidad (21.88% por tripán; 18.31% por Hoechst/PI) y el mayor porcentaje de apoptosis (81.69%). En contraste, G2 y G3 mostraron viabilidad superior al 70% y bajos niveles de apoptosis (32–38%), además de conservar la morfología fibroblastoide típica. El grupo G1 presentó valores intermedios.

Las observaciones morfológicas (Figura 15) respaldaron estos hallazgos. Mientras que G2 y G3 conservaron fibroblastos alargados con crecimiento progresivo, en G4 se observó una confluencia acelerada acompañada de signos de estrés celular. Estos resultados confirman que un mayor número de células no necesariamente se asocia con una mejor calidad celular.

Estos resultados concuerdan parcialmente con los de Huamani (2018) quien observó que la combinación enzimática permitió mantener células epiteliales viables y proliferativas en pasajes tempranos. De manera similar, Saadeldin et al., (2019) reportaron que los fibroblastos de camello cultivados en DMEM conservaron alta adherencia, crecimiento estable y morfología fibroblastoide típica. Estos hallazgos resaltan que el efecto del mismo medio puede variar según la especie: en camello, el DMEM fue favorable, mientras que en alpaca promovió una proliferación rápida, pero con pérdida de viabilidad.

Durante la fase de cultivo celular (Figuras 13, 14, 15 y 16), se observó que el medio empleado influyó significativamente en la calidad del cultivo. Los grupos cultivados en DMEM (G2 y G4) alcanzaron un mayor número de células, aunque con resultados contrastantes: G2 mostró un equilibrio favorable entre proliferación (Figura 14) y viabilidad, mientras que G4 presentó un crecimiento rápido, acompañado de una elevada apoptosis (81.69%) y una viabilidad reducida (<25%). Por otro lado, los grupos cultivados en TCM-199 (G1 y G3) presentaron un menor número de células, pero una morfología fibroblastoide más estable y menor apoptosis (Figura 14).

Este hallazgo es consistente con lo reportado por Katayama et al. (2021), quienes compararon fibroblastos de pollo cultivados en DMEM, Medio 199 y KAv-1. Los autores señalaron que tanto DMEM como 199 permitieron el crecimiento inicial, pero

presentaron limitaciones para mantener el cultivo a largo plazo. En DMEM, la proliferación rápida se asoció con una mayor aparición de células senescentes, mientras que en el medio 199 la tasa de duplicación fue más baja y la proliferación sostenida más limitada. En contraste, el medio KAv-1 permitió un mayor número de duplicaciones, una mejor preservación morfológica y una menor acumulación de daño en el ADN.

Estos resultados se alinean parcialmente con lo reportado por Youngsabanant et al., (2021) en la granulosa porcina, quienes compararon el comportamiento celular en M199 y DMEM durante un cultivo prolongado de 12 semanas. Los autores encontraron que las células cultivadas en DMEM presentaron una viabilidad significativamente mayor ($116.67 \pm 8.20 \%$) que las cultivadas en M199 ($39.80 \pm 4.71 \%$), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Además, las células en DMEM mostraron mayor densidad y expansión fibroblastoide a lo largo del tiempo, mientras que las mantenidas en M199 presentaron una reducción progresiva del crecimiento y de la viabilidad.

El análisis de proliferación evidenció diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 15). El grupo G2 alcanzó el mayor porcentaje de área de confluencia (78.58%), superando a G1 y G3, mientras que G4 presentó valores intermedios (53.46%). Estos resultados sugieren que el uso de DMEM en la fase de aislamiento G2 con colagenasa favorece un crecimiento sostenido y estable. En contraste, la combinación utilizada en la fase de aislamiento G4, con colagenasa y hialuronidasa, induce una rápida expansión inicial, pero se acompaña de un deterioro de la viabilidad.

Respecto al tiempo de duplicación (TD), se observaron diferencias significativas entre los grupos ($p < 0.05$) (Figura 16). El grupo G4 presentó el menor TD (5.09 ± 1.30 días), lo que se diferenció significativamente de G3, que mostró el mayor TD (22.72 ± 1.71 días). Los grupos G1 (13.06 ± 5.09 días) y G2 (8.62 ± 5.35 días) presentaron valores intermedios, sin diferencias significativas respecto de G3 ni de G4. Estos resultados confirman que tanto el protocolo enzimático como el medio de cultivo influyen en la dinámica de la proliferación celular. Los tratamientos más intensivos tienden a acelerar la duplicación celular, mientras que condiciones más conservadoras prolongan el tiempo de duplicación (TD), lo que podría favorecer la preservación de la calidad celular.

En la tesis de Huamani, (2018), aunque se trabajó con espermatogonias, también se observó que las características intrínsecas de la población celular (edad del animal y grado de maduración) determinaban la viabilidad y el comportamiento proliferativo. De

manera análoga, en fibroblastos, las condiciones iniciales de aislamiento y el medio de cultivo actúan como determinantes del crecimiento posterior.

El análisis cinético mostró que el grupo G4 presentó el menor tiempo de duplicación (5.09 ± 1.30 días), lo que indica una mayor tasa de proliferación. En contraste, G2 combinó un tiempo de duplicación intermedio (8.62 ± 5.35 días) con elevados niveles de viabilidad celular (Figura 13 y 15), lo que la posiciona como una condición favorable para el establecimiento de cultivos primarios.

Saadeldin et al., (2019), reportaron que los fibroblastos de camello mantuvieron una proliferación estable a lo largo de varios pasajes, preservando su morfología fibroblastoide, lo que demuestra que la calidad inicial de las células aisladas es determinante para asegurar el rendimiento a largo plazo. Este hallazgo coincide con nuestras observaciones, ya que los protocolos que preservan la viabilidad inicial (como G2) favorecen un desempeño más consistente del cultivo, en comparación con condiciones que inducen una proliferación más acelerada pero potencialmente menos estable (como G4).

Por otro lado, el efecto de la combinación colagenasa + hialuronidasa no mostró un aumento significativo de la proliferación respecto a la colagenasa sola. De hecho, los valores observados en G3 y G4 sugieren que la presencia de hialuronidasa no aporta ventajas proliferativas, e incluso podría estar relacionada con un mayor nivel de apoptosis inicial (como se observó en la fase de aislamiento), lo que repercute posteriormente en la capacidad proliferativa.

VI. CONCLUSIONES

- Se obtuvieron fibroblastos de biopsias de oreja de alpaca mediante digestión con colagenasa tipo I sola o combinada con hialuronidasa, destacando la colagenasa sola por su mayor viabilidad (65.53%) y potencial para cultivos primarios estables.
- La proliferación y morfología fibroblastoide se conservaron óptimamente en DMEM suplementado (viabilidad 71.94%), mientras que TCM-199 mostró menor crecimiento, pero estabilidad morfológica mantenida.
- El tratamiento con colagenasa en DMEM proporcionó un equilibrio óptimo entre rendimiento, viabilidad y estabilidad celular, en contraste con la combinación colagenasa + hialuronidasa, que indujo alta apoptosis y comprometió la integridad del cultivo.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar trabajos de investigación enfocados en optimizar la digestión enzimática, evaluando la relación entre la cantidad de tejido y la actividad específica de las enzimas utilizadas, para mejorar el rendimiento y la viabilidad celular.
- Estudiar con mayor profundidad la acción de la colagenasa y la hialuronidasa sobre la matriz extracelular del tejido auricular de alpaca, determinando las concentraciones y tiempos de exposición más adecuados que minimicen la apoptosis y el daño celular.
- Estandarizar protocolos de aislamiento y cultivo primario, considerando variables como el tipo de medio, concentración de suero fetal bovino, y densidad de siembra, con el fin de conservar la morfología fibroblastoide y la estabilidad del cultivo a largo plazo.
- Implementar ensayos para medir la actividad enzimática y la viabilidad celular mediante técnicas cuantitativas más precisas, como citometría de flujo, ensayos de apoptosis y análisis de proliferación.
- Desarrollar investigaciones complementarias sobre el efecto de factores de crecimiento, antioxidantes y condiciones de oxígeno reducido en la proliferación y mantenimiento de fibroblastos, para favorecer su aplicación en estudios de medicina regenerativa.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almazloum, A., & Khalil, H. (2023). Isolation of Adult Mouse Cardiac Fibroblasts. *Current Protocols*, 3(7), e840. <https://doi.org/10.1002/CPZ1.840;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Aronowitz, J. A., Lockhart, R. A., & Hakakian, C. S. (2015). Mechanical versus enzymatic isolation of stromal vascular fraction cells from adipose tissue. *SpringerPlus*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40064-015-1509-2/TABLES/1>
- Arora, M. (2023). Cell Culture Media: A Review. *Materials and Methods*, 3. <https://doi.org/10.13070/MM.EN.3.175>
- Aureli, L., Gioia, M., Cerbara, I., Monaco, S., Fasciglione, G., Marini, S., Ascenzi, P., Topai, A., & Coletta, M. (2008). Structural Bases for Substrate and Inhibitor Recognition by Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*, 15(22), 2192–2222. <https://doi.org/10.2174/092986708785747490>
- Ávila, L. M., Ávila, D. J., Avila, J. P., Riveros, R. A., & Arocha, R. (2015). *Comparación de la viabilidad y crecimiento en cultivo de células madre adultas obtenidas de tejido adiposo pre y post congelamiento*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000200004
- Babayev, E., Xu, M., Shea, L. D., Woodruff, T. K., & Duncan, F. E. (n.d.). *Follicle isolation methods reveal plasticity of granulosa cell steroidogenic capacity during mouse in vitro follicle growth*. Retrieved May 19, 2025, from <https://academic.oup.com/molehr/article/28/10/gaac033/6693628>
- Bernardi, M. A. (2015). *Métodos de modificación génica dirigida en células humanas y su aplicación en el Síndrome de Wiskott-Aldrich* [Universidad de Valladolid]. <https://doi.org/10.35376/10324/12377>

- Bustinza, A. V., Machaca, V., Cano, V., & Quispe, J. (2021). Evolución y desarrollo de las razas de Alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias Del Perú*, 32(5), e19876. <https://doi.org/10.15381/rivep.v32i5.19876>
- Candelise, N., Santilli, F., Fabrizi, J., Caissutti, D., Spinello, Z., Moliterni, C., Lancia, L., Monache, S. D., Mattei, V., & Misasi, R. (2023). The Importance of Stem Cells Isolated from Human Dental Pulp and Exfoliated Deciduous Teeth as Therapeutic Approach in Nervous System Pathologies. *Cells* 2023, Vol. 12, Page 1686, 12(13), 1686. <https://doi.org/10.3390/CELLS12131686>
- Cerri, S. N., Olivera-Bravo, S., & Balatto, C. (2022). Estudio de la unión neuromuscular en estadio asintomático y sintomático del modelo experimental de esclerosis lateral amiotrófica SOD1G93A en ratas. In *Estudio de la unión neuromuscular en estadio asintomático y sintomático del modelo experimental de esclerosis lateral amiotrófica SOD1G93A en ratas*. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable.
- Cortez, J., & Murga, N. (2016). Generación de cultivos celulares primarios in vitro de animales silvestres con diferentes enzimas digestivas. *Revista Científica UNTRM: Ciencias Naturales e Ingeniería*, 1(1). <https://doi.org/10.25127/UCNI.V1I1.92>
- De Castro, T. H., Durand, M., Pires, S., McManus, C. M., Chiarello, G., & Miglino, M. A. (2024). Alpaca (Vicugna pacos) Skin Analyzed Under Architecture and Structure Piel de Alpaca (Vicugna pacos) Analizada Bajo Arquitectura y Estructura. *Int. J. Morphol*, 42(2), 256–260.
- Deng, Q., Liu, L., Tang, R., Xian, D., & Zhong, J. (2023). A newly improved method of primary cell culture: Tissue block with continuous adhesion subculture in skin fibroblast. *Acta Histochemica*, 125(7), 152090. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2023.152090>
- Dos-Anjos Vilaboa, S., Navarro-Palou, M., & Llull, R. (2014). Age influence on stromal vascular fraction cell yield obtained from human lipoaspirates. *Cytotherapy*, 16(8), 1092–1097. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.02.007>
- Eikmans, M., van der Keur, C., Anholts, J. D. H., Drabbels, J. J. M., van Beelen, E., de Sousa Lopes, S. M. C., & van der Hoorn, M. L. (2022). Primary Trophoblast Cultures: Characterization of HLA Profiles and Immune Cell Interactions. *Frontiers in Immunology*, 13, 814019. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2022.814019/BIBTEX>
- Favas, R., Morone, J., Martins, R., Vasconcelos, V., & Lopes, G. (2021). Cyanobacteria and microalgae bioactive compounds in skin-ageing: potential to restore extracellular matrix filling and overcome hyperpigmentation. *Journal of Enzyme*

- Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 1829–1838.
<https://doi.org/10.1080/14756366.2021.1960830>
- Franco-Barraza, J., Beacham, D. A., Amatangelo, M. D., & Cukierman, E. (2016). Preparation of extracellular matrices produced by cultured and primary fibroblasts. *Current Protocols in Cell Biology*, 2016(1), 10.9.1-10.9.34.
<https://doi.org/10.1002/CPCB.2;SUBPAGE:STRING:ABSTRACT;JOURNAL:JOURNAL:19342616;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:19342616;WGROUP:STRING:PUBLICATION>
- García, M. (2019). *Optimización de la técnica de aislamiento y proliferación de células mesenquimales procedentes de la gelatina de Wharton*.
- Gartner, L. (2021). *Texto de histología: Atlas a color*.
https://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=rVsIEAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&ots=q9ydfBkAbd&sig=_4hlmaH2XdbllnUZ7_6q09bYQRs
- Gentile, P., Calabrese, C., De Angelis, B., Pizzicannella, J., Kothari, A., & Garcovich, S. (2019). Impact of the Different Preparation Methods to Obtain Human Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells (AD-SVFs) and Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (AD-MSCs): Enzymatic Digestion Versus Mechanical Centrifugation. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 5471, 20(21), 5471. <https://doi.org/10.3390/IJMS20215471>
- Google. (2025). *Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) - Canaán Ayacucho*.
https://www.google.com/maps/place/Canaan/@-13.16447,-74.2042605,16z/data=!3m1!4b1!4m6!3m5!1s0x91128768c3d2ae0f:0xa3d5a1ef4c90644d!8m2!3d-13.1633382!4d-74.2047256!16s%2Fg%2F1hc0_s_q6?entry=tту&g_ep=EgoyMDI1MTAwOC4wIKXMDSOASAFQAw%3D%3D
- Guruswamy, R., & Vermette, P. (2018). Decellularized pancreas as a native extracellular matrix scaffold for pancreatic islet seeding and culture. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(5), 1230–1237.
<https://doi.org/10.1002/TERM.2655>
- Howard, R. B., Christensen, A. K., Gibbs, F. A., & Pesch, L. A. (1967). THE ENZYMATIC PREPARATION OF ISOLATED INTACT PARENCHYMAL CELLS FROM RAT LIVER. *Journal of Cell Biology*, 35(3), 675–684.
<https://doi.org/10.1083/JCB.35.3.675>
- Hu, Z., Chen, Y., Gao, M., Chi, X., He, Y., Zhang, C., Yang, Y., Li, Y., Lv, Y., Huang, Y., & Deng, X. (2023). Novel strategy for primary epithelial cell isolation: Combination of

- hyaluronidase and collagenase I. *Cell Proliferation*, 56(1).
<https://doi.org/10.1111/CPR.13320>
- Huamani, J. (2018). Determinación de viabilidad y rendimiento durante el aislamiento de espermatogonias de Vicugna pacos “alpaca” a diferentes edades. In *Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga*.
<http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/2844>
- Jia, W., He, W., Wang, G., Goldman, J., & Zhao, F. (2022). Enhancement of Lymphangiogenesis by Human Mesenchymal Stem Cell Sheet. *Advanced Healthcare Materials*, 11(16), 2200464. <https://doi.org/10.1002/ADHM.202200464>
- Jiménez, J. (2023). *Dispositivos de vidrios mesoporosos bioactivos enriquecidos con iones biológicamente activos para el tratamiento de defectos e infecciones óseas*.
<https://hdl.handle.net/20.500.14352/4179>
- Jung, H. (2020). Hyaluronidase: An overview of its properties, applications, and side effects. *Archives of Plastic Surgery*, 47(4), 297.
<https://doi.org/10.5999/APS.2020.00752>
- Katayama, M., Onuma, M., & Fukuda, T. (2021). KAv-1 is Better Suited to Chick Fibroblast Culture than DMEM or 199 Media. *The Journal of Poultry Science*, 58(4), 270. <https://doi.org/10.2141/JPSA.0200085>
- Kim, D. E., Lee, J. H., Ji, K. Bin, Park, K. S., Kil, T. Y., Koo, O., & Kim, M. K. (2022). Generation of genome-edited dogs by somatic cell nuclear transfer. *BMC Biotechnology*, 22(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S12896-022-00749-3/TABLES/2>
- Lacolla, D. V., Lacolla, M. G., Corredera, C., & Buey, V. G. (2010). Estructura histológica de la piel de los camélidos sudamericanos. *Ciencia Veterinaria*, 12(1), 8–15.
<https://ojs.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1867>
- Levitt, J., Bernardo, S., & Whang, T. (2013). How to Perform a Punch Biopsy of the Skin. *New England Journal of Medicine*, 369(11), e13.
<https://doi.org/10.1056/NEJMVCM1105849>
- Lopez, E., & Ayón, E. (2019). Métodos para determinar la viabilidad celular con aplicación a la odontología. *Repositorio Académico USMP*.
- Lozano, Y., Ochoa, D., & Zapata, Á. (2019). *Cultivos de células animales: historia, aplicaciones y perspectivas Cultivos de células animales: historia, aplicaciones y perspectivas Citación recomendada Citación recomendada*. 4(1).
<https://ciencia.lasalle.edu.co/ai>
- Lu, J., Zhao, Z., Pan, L., Wu, H., Wang, S., Tong, X., & Wu, S. (2025). Hyaluronidase: structure, mechanism of action, diseases and therapeutic targets. *Molecular Biomedicine 2025 6:1*, 6(1), 50-. <https://doi.org/10.1186/S43556-025-00299-Y>

- National Human Genome Research Institute. (2023). *Fibroblasto*. NHGRI. <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Fibroblasto>
- Navarrete, C., Moll, C., Droppelmann, N., & González, S. (2016). Actualización en el uso de la biopsia de piel por punch: An update. *Revista Chilena de Cirugía*, 68(6), 467–473. <https://doi.org/10.1016/J.RCHIC.2016.05.008>
- Paredes, J. M., Condemayta, Z. C., & Charaja, L. C. (2009). Causas de mortalidad de alpacas en tres principales centros de producción ubicados en puna seca y húmeda del departamento de Puno. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 10(8), 1–13. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63617143002>
- Pinto J, C. E., Martin E, C., & Cid V, M. D. (2010). Camelidos sudamericanos: clasificación, origen y características. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 4(1), 23–37. <https://go.gale.com/ps/i.do?p=IFME&sw=w&issn=19882688&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA309979639&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
- Quispe, E. C., Rodríguez, T. C., Iñiguez, L. R., & Mueller, J. P. (2009). Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Resources Information*, 45, 1–14. <https://doi.org/10.1017/S1014233909990277>
- Reed, S. K. (2008). *A molecular and morphologic study of idiopathic fetlock hyperextension and suspensory apparatus breakdown in the llama*. https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/t722hd38s?locale=en
- Reed, S. K., Semevolos, S. A., Rist, P. K., & Valentine, B. A. (2007). Morphologic and biochemical characterization of hyperextension of the metacarpophalangeal and metatarsophalangeal joints in llamas. *American Journal of Veterinary Research*, 68(8), 879–885. <https://doi.org/10.2460/AJVR.68.8.879>
- Renneberg, R., Berkling, V., & Lorocho, V. (2017). Enzymes: Molecular Supercatalysts for Use at Home and in Industry. *Biotechnology for Beginners*, 33–63. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801224-6.00002-3>
- Saadeldin, I. M., Swelum, A. A. A., Noreldin, A. E., Tukur, H. A., Abdelazim, A. M., Abomughaid, M. M., & Alowaimer, A. N. (2019). Isolation and Culture of Skin-Derived Differentiated and Stem-Like Cells Obtained from the Arabian Camel (*Camelus dromedarius*). *Animals 2019, Vol. 9, Page 378*, 9(6), 378. <https://doi.org/10.3390/ANI9060378>
- Sanchez-Castro, E. E., Pajuelo-Reyes, C., Tejedo, R., Soria-Juan, B., Tapia-Limonchi, R., Andreu, E., Hitos, A. B., Martín, F., Cahuana, G. M., Guerra-Duarte, C., de Assis, T. C. S., Bedoya, F. J., Soria, B., Chávez-Olórtegui, C., & Tejedo, J. R. (2021).

- Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapies as Promising Treatments for Muscle Regeneration After Snakebite Envenoming. *Frontiers in Immunology*, 11, 609961. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.609961>
- Santacruz, L., Melo, Á., Rodríguez, C., & Moscoso, J. (2017). Historia de los cultivos de células animales in vitro y su importancia en la actualidad History of cultured animal cells in vitro and its significance at present. *Biociencias*, 12(2), 127–140. <https://doi.org/10.18041/2390>
- Segeritz, C. P., & Vallier, L. (2017). Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*, 151–172. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803077-6.00009-6>
- Sepúlveda, J., & Soto, A. (2016). Importancia de la biología celular y tisular y técnicas de estudio de células y tejidos | Texto Atlas de Histología. Biología celular y tisular, 2e | AccessMedicina | McGraw Hill Medical. *Texto Atlas de Histología. Biología Celular y Tisular*. <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1506§ionid=98181904>
- Serrano, T. (2017). *Trasplante de células mononucleares de médula ósea en un modelo experimental en rata para la enfermedad de Huntington*.
- Sigma Aldrich. (2023). *Cultivo celular primario*. Merck. <https://www.sigmaaldrich.com/PE/es/applications/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-culture-by-cell-type/primary-cell-culture>
- Simancas, V., Vergara, C., & Díaz, A. (2018). Influencia del suero fetal bovino en el cultivo de fibroblastos gingivales. *Avances En Odontología*, 34(6), 299–309. https://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0213-12852018000600004&script=sci_abstract&lng=ES
- Sotomaior, C. S., Dayenoff Rucik, P. M., Parraguez Gamboa, V. H., & Asociación Latinoamericana de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos (ALEPRyCS). (2019). OVEJAS, CABRAS Y CAMÉLIDOS EN LATINOAMÉRICA: producción, salud y comercialización. In *PUCPRESS* (1st ed.). PUCPRESS. <https://doi.org/10.7213/B45-565>
- Sulca-Cervan, C. C. (2021). Aislamiento y enriquecimiento in vitro de células madre espermatozonales de alpaca (*Vicugna pacos*) y caracterización de co-cultivos con células de Sertoli. In *Repositorio de Tesis - UNMSM*. <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/16372>

- Thams, C. (2016). Modelo de investigación animal para el estudio de la osteoartritis. In G. Balint, B. Antala, C. Carty, J.-M. A. Mabieme, I. B. Amar, & A. Kaplanova (Eds.), *Uniwersytet śląski* (Vol. 7, Number 1). <https://doi.org/10.2/JQUERY.MIN.JS>
- Thermo Fisher Scientific. (2025). *Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium*. https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/cell-culture/mammalian-cell-culture/cell-culture-media/rpmi.html?ef_id=CjwKCAiAlrXJBhBAEiwA-5pgwrw6LvX7APv5OfLD1ywb2Dm0zxgVtXahgHoyUEYvfjVouTUL7WRXmRoCkKtQAvD_BwE:G:s&s_kwid=AL!3652!3!721030441129!p!!g!!thermo%20medium%20rpmi!1759362861!66460964541&cid=bid_clb_cce_r01_co_cp0000_pjt0000_bid0000_0se_gaw_bt_pur_con&gad_source=1&gad_campaignid=1759362861&gbraid=0AAAAADxi_GSZsx7EdttuP8f_lmKy-aplZ&gclid=CjwKCAiAlrXJBhBAEiwA-5pgwrw6LvX7APv5OfLD1ywb2Dm0zxgVtXahgHoyUEYvfjVouTUL7WRXmRoCkKtQAvD_BwE
- Trejo, J. C. (2014). *CULTIVO TRIDIMENSIONAL DE FIBROBLASTOS CORNEALES PORCINOS TRABAJO DE FIN DE MÁSTER*. Universidad de Valladolid.
- Tsuji, K., Ojima, M., Otabe, K., Horie, M., Koga, H., Sekiya, I., & Muneta, T. (2017). Effects of different cell-detaching methods on the viability and cell surface antigen expression of synovial mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 26(6), 1089–1102. https://doi.org/10.3727/096368917X694831/ASSET/C664276B-B5FF-4E63-B2A9-6A938955E114/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.3727_096368917X694831-FIG5.JPG
- Uguten, M., van der Sluis, N., Vriend, L., Coert, J. H., Harmsen, M. C., van der Lei, B., & van Dongen, J. A. (2024). Comparing mechanical and enzymatic isolation procedures to isolate adipose-derived stromal vascular fraction: A systematic review. *Wound Repair and Regeneration*, 32(6), 1008–1021. <https://doi.org/10.1111/wrr.13228>
- Verma, A., Verma, M., & Singh, A. (2020). Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology*, 269. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4>
- Vilá, B., & Arzamendia, Y. (2022). South American Camelids: their values and contributions to people. *Sustainability Science*, 17(3), 707–724. <https://doi.org/10.1007/s11625-020-00874-y>
- Weiskirchen, S., Schröder, S. K., Buhl, E. M., & Weiskirchen, R. (2023). A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. *Cells* 2023, Vol. 12, Page 682, 12(5), 682. <https://doi.org/10.3390/CELLS12050682>

- Youngsabanant, M., Gumlungpa, N., Panyarachun, B., Chuen-Im, T., & Panyarachun, P. (2021). An establishment of long-term culture of porcine granulosa cells and comparison of DMEM and M199 for cell propagation. *Thai Journal of Science and Technology*, 167–172.
https://doi.nrct.go.th/ListDoi/listDetail?Resolve_DOI=10.14456/tjst.2021.13
- Zanuzzi, C. N., Acuña, F., & Carrettoni, G. (2022). CAPÍTULO 5 Tejido conectivo y tejido adiposo. *Texto Atlas de Histología: Biología Celular y Tisular*.
- Zhao, C. (2023). Cell culture: in vitro model system and a promising path to in vivo applications. *Journal of Histotechnology*, 46(1), 1–4.
<https://doi.org/10.1080/01478885.2023.2170772>

IX. ANEXOS

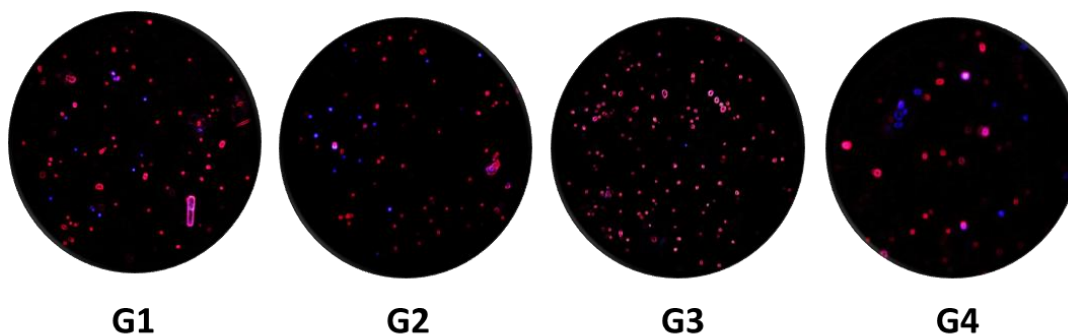
Anexo 1. Aislamiento celular de fibroblastos de alpaca



Anexo 2. Zona de trabajo en aislamiento y cultivo celular de fibroblastos de alpaca



Anexo 3. Viabilidad y apoptosis mediante Hoechst 3342/PI en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca



Anexo 4. ANOVA rendimiento en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p
Tratamiento (entre grupos)	1.11	3	0.372	F(3,8)=0.696	0.580
Residual (dentro grupos)	4.27	8	0.534		
Total	5.38	11			

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 5. ANOVA de viabilidad según prueba de exclusion de azul de tripán en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p
Tratamiento (entre grupos)	139	3	46.3	F (3, 8) = 2.77	0.111
Residual (dentro grupos)	133	8	16.7		
Total	272	11			

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 6. ANOVA de viabilidad según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p
Tratamiento (entre grupos)	2512	3	837	F (3, 8) = 24.2	P<0.001
Residual (dentro grupos)	277	8	34.6		
Total	2789	11			

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 7. Tukey post ANOVA de viabilidad según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca.

Comparación	Diferencia de medias	Resumen	p ajustado
G1 vs G2	30.4	**	0.001
G1 vs G3	19.4	*	0.016
G1 vs G4	38.6	***	<0.001
G2 vs G3	-11.0	ns	0.178
G2 vs G4	8.17	ns	0.382
G3 vs G4	19.2	*	0.017

ns: No significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Anexo 8. ANOVA de apoptosis según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p
Tratamiento (entre grupos)	2512	3	837	F (3, 8) = 24.2	P<0.001
Residual (dentro grupos)	277	8	34.6		
Total	2789	11			

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 9. Tukey post ANOVA de apoptosis según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de aislamiento celular de fibroblastos de alpaca.

Comparación	Diferencia de medias	Resumen	p ajustado
G1 vs G2	-30.4	**	0.001
G1 vs G3	-19.4	*	0.016
G1 vs G4	-38.6	***	<0.001
G2 vs G3	11.0	ns	0.178
G2 vs G4	-8.17	ns	0.382
G3 vs G4	-19.2	*	0.017

ns: No significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Anexo 10. ANOVA de viabilidad según prueba de exclusion de azul de tripán en la fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente de variación	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p valor
Tratamiento	6222	3	2074	F(3,8)=35.4	P<.001
Residual	468	8	58.6		

Total	6691	11
-------	------	----

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 11. Tukey post ANOVA de viabilidad según prueba de exclusión de azul de tripán de la fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca.

Comparación	Diferencia de medias	Resumen	p ajustado
G1 vs G2	-26.6	*	.012
G1 vs G3	-34.1	**	.003
G1 vs G4	23.5	*	.023
G2 vs G3	-7.50	ns	.643
G2 vs G4	50.1	***	<.001
G3 vs G4	57.6	***	<.001

ns: No significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Anexo 12. ANOVA de viabilidad según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p
Tratamiento (entre grupos)	4546	3	1515	F (3, 8) = 6.20	P=0.018
Residual (dentro grupos)	1956	8	245		
Total	6502	11			

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 13. Tukey post ANOVA de viabilidad según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca.

Comparación	Diferencia de medias	Resumen	p ajustado
G1 vs G2	-4.15	ns	0.940
G1 vs G3	-8.87	ns	0.642
G1 vs G4	40.0	**	0.003
G2 vs G3	-4.72	ns	0.916
G2 vs G4	44.2	**	0.001
G3 vs G4	48.9	***	<0.001

ns: No significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Anexo 14. ANOVA de apoptosis según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p
Tratamiento (entre grupos)	4546	3	1515	F (3, 8) = 18.6	P<0.001
Residual (dentro grupos)	653	8	81.6		
Total	5198	11			

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 15. Tukey post ANOVA de apoptosis según prueba de Hoechst 33342/IP en fase de cultivo celular de fibroblastos de alpaca.

Comparación	Diferencia de medias	Resumen	p ajustado
G1 vs G2	4.15	ns	.940
G1 vs G3	8.87	ns	.642
G1 vs G4	-40.0	**	.003
G2 vs G3	4.72	ns	.916
G2 vs G4	-44.2	**	.001
G3 vs G4	-48.9	***	<.001

ns: No significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Anexo 16. ANOVA de proliferación celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p
Tratamiento (entre grupos)	8017	3	2672	F (3, 8) = 393	P<0.001
Residual (dentro grupos)	54.4	8	6.80		
Total	8071	11			

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 17. Tukey post ANOVA de proliferación celular de fibroblastos de alpaca.

Comparación	Diferencia de medias	Resumen	p ajustado
G1 vs G2	-63.7	***	<0.001
G1 vs G3	-5.55	ns	0.116
G1 vs G4	-38.6	***	<0.001
G2 vs G3	58.2	***	<0.001

G2 vs G4	25.1	***	<0.001
G3 vs G4	-33.1	***	<0.001

ns: No significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Anexo 18. ANOVA de tiempo de duplicación celular de fibroblastos de alpaca.

Fuente	SS	DF	MS	F (DFn, DFd)	p
Tratamiento (entre grupos)	2298	3	766	F (3, 60) = 25.7	P<0.001
Residual (dentro grupos)	1787	60	29.8		
Total	4085	63			

SS: Suma de cuadrados (Sum of Squares); DF: Grados de libertad (Degrees of Freedom); MS: Media cuadrática (Mean Square); F (DFn, DFd): Estadístico F con grados de libertad del numerador (DFn) y denominador (DFd).

Anexo 19. Tukey post ANOVA de tiempo de duplicación celular de fibroblastos de alpaca.

Comparación	Diferencia de medias	Resumen	p ajustado
G1 vs G2	4.45	ns	0.154
G1 vs G3	-8.16	**	0.002
G1 vs G4	7.97	***	<0.001
G2 vs G3	-12.6	***	<0.001
G2 vs G4	3.52	ns	0.206
G3 vs G4	16.1	***	<0.001

ns: No significativo; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

Anexo 20. Matriz de Consistencia

TÍTULO: Efecto de la digestión enzimática y medios de cultivo en la viabilidad, rendimiento y proliferación de fibroblastos obtenidos por biopsia de oreja de *Vicugna pacos* “alpaca”.

PROBLEMAS	OBJETIVO	HIPÓTESIS	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>1. PROBLEMA PRINCIPAL ¿Cómo afecta las condiciones de digestión enzimática (colagenasa 3mg/ml y colagenasa 3mg/ml - hialuronidasa 1mg/ml) y medio de cultivo (DMEM y TCM-199 suplementados) en la viabilidad, rendimiento y proliferación celular de tejido fibroso de alpaca?</p>	<p>1. OBJETIVO GENERAL Establecer el efecto de las condiciones enzimáticas y medio de cultivo en la viabilidad, rendimiento y proliferación celular de tejido fibroso de alpaca.</p> <p>2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS - Obtener fibroblastos por digestión enzimática de biopsia de oreja de alpaca con colagenasa y hialuronidasa; y describir su morfología. - Evaluar la proliferación de los fibroblastos en dos medios de cultivo TCM-199 y DMEM suplementados; y describir su morfología. - Comparar la viabilidad y rendimiento de la digestión enzimática y la proliferación de fibroblastos en condiciones de cultivo primario.</p>	<p>1. HIPÓTESIS El efecto de la colagenasa 3mg/ml será mejor en el rendimiento celular y viabilidad, respecto a la combinación colagenasa 3mg/ml - Hialuronidasa 1mg/ml; mientras que el efecto del medio de cultivo DMEM suplementado será mejor en la proliferación celular y viabilidad, respecto al TCM-199 suplementado.</p>	<p>1. VARIABLES X X1. Enzimas de digestión <u>Indicadores</u> - Colagenasa - Hialuronidasa - Colagenasa X2. Medio de cultivo <u>Indicadores</u> - TCM-199 suplementado - DMEM suplementado</p> <p>2. VARIABLES Y - Rendimiento (células/ml) - Viabilidad (%) - Proliferación (células/ml)</p>	<p>1. TIPO DE INVESTIGACIÓN Básica</p> <p>2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN Básica</p> <p>3. MÉTODO Experimental</p> <p>4. POBLACIÓN Alpacas de la Estación Experimental Agraria Canaan-INIA-Ayacucho</p> <p>5. MUESTRA Fibroblastos de 12 biopsias de 6 mm provenientes de orejas de alpaca</p> <p>6. TIPO DE MUESTREO No Probabilístico</p> <p>7. TECNICAS - Digestión enzimática - Cultivo celular</p>




ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. Jhon Wacnerson PRADO YUPANQUI.
RESOLUCIÓN DECANAL N° 506-2025-UNSCH-FCB-D

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde del día martes treinta de diciembre del año dos mil veinticinco; se reunieron los miembros del Jurado Evaluador en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, participando como presidente encargado el Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ, con Memorando N° 330-2025-UNSCH-FCB, de fecha 29 de diciembre de 2025, Dr. Arturo RODRIGUEZ ZAMORA (Miembro-jurado), el Dr. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI (Miembro-Jurado), Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA (Miembro-Asesor) y actuando como secretario docente encargado la Blga. Betsy Rocío AGUILAR ATME, con memorando N° 327-2025-UNSCH-FCB de fecha 29 de diciembre de dos mil veinticinco; para presenciar la sustentación de tesis titulada: Efecto de la digestión enzimática y medios de cultivo en la viabilidad, rendimiento y proliferación de fibroblastos obtenidos por biopsia de oreja de *Vicugna pacos* "alpaca", presentado por el **Bach. Jhon Wacnerson PRADO YUPANQUI**; el presidente luego de verificar la documentación presentada, indicó al secretario docente dar lectura a la documentación generada que refrenda el presente acto académico, luego de ello dispuso el inicio del acto de sustentación, indicando al sustentante que dispone de cuarenta y cinco minutos para exponer su trabajo de investigación tal como establece en el Reglamento de Grados y Títulos de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Culminada la exposición, el presidente invitó a cada uno de los Miembros del Jurado a participar con sus observaciones, sugerencias y preguntas al sustentante. Culminada esta etapa, el presidente invitó al sustentante y al público asistente a abandonar momentáneamente el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga para que los miembros del jurado evaluador puedan realizar las deliberaciones y calificaciones correspondientes; cuyos resultados son los que se consignan a continuación:

Miembros del Jurado Evaluador	Exposición	Respuesta/preguntas	Promedio
Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ	18	18	18
Dr. Arturo RODRIGUEZ ZAMORA	20	20	20
Dr. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI	18	18	18
PROMEDIO			19

El sustentante alcanzó el promedio de diecinueve (19) aprobatorio. Acto seguido, el presidente invito el ingreso de la sustentante y el público, al Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga dando a conocer los resultados e indicando que de este modo se da por finalizado el presente acto académico, siendo las seis de la tarde; firmando al pie del presente en señal de conformidad.


Dr. Víctor Luis CÁRDENAS LÓPEZ
Presidente (e)


Dr. Arturo RODRIGUEZ ZAMORA
Miembro-Jurado


Dr. Raúl Antonio MAMANI AYCACHI
Miembro-Jurado


Dr. Fidel Rodolfo MUJICA LENGUA
Miembro-Asesor


Blga. Betsy Rocío AGUILAR ATME
Secretario Docente (e)



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

DECANATURA-ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

N°20-2026-FCB-D

Yo, FIDEL RODOLFO MUJICA LENGUA, Director de la Escuela Profesional de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; autoridad encargada de verificar la tesis titulada: **Efecto de la digestión enzimática y medios de cultivo en la viabilidad, rendimiento y proliferación de fibroblastos obtenidos por biopsia de oreja de *Vicugna pacos* "alpaca"**, por JHON WACNERSON PRADO YUPANQUI; he constatado por medio del uso de la herramienta TURNITIN, procesado CON DEPÓSITO, una similitud de 7%, grado de coincidencia menor a lo que determina la ausencia de plagio definido por el Reglamento de Originalidad de Trabajos de Investigación de la UNSCH, aprobado con Resolución del Consejo Universitario N° 039-2021-UNSCH-CU.

En consecuencia, la tesis cumple con las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Se acompaña el INFORME FINAL DE TURNITIN correspondiente.

Ayacucho, 16 de mayo del 2026.


UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Escuela Profesional de Biología
Dr. Fidel R. Mujica Lengua
DIRECTOR

Efecto de la digestión enzimática y medios de cultivo en la viabilidad, rendimiento y proliferación de fibroblastos obtenidos por biopsia de oreja de Vicugna pacos “alpaca”

por Jhon Wacnerson PRADO YUPANQUI

Fecha de entrega: 13-may-2026 09:40a. m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2960304362

Nombre del archivo: PRADO_YUPANQUI-Jhon_Wacnerson-pregrado-2026_TURNITIN.docx (7.3M)

Total de palabras: 8231

Total de caracteres: 46423

Efecto de la digestión enzimática y medios de cultivo en la viabilidad, rendimiento y proliferación de fibroblastos obtenidos por biopsia de oreja de Vicugna pacos "alpaca"

INFORME DE ORIGINALIDAD



FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga Trabajo del estudiante	2%
2	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	www.uandes.cl Fuente de Internet	1%
4	repositorio.unsch.edu.pe Fuente de Internet	1%
5	docplayer.es Fuente de Internet	1%
6	accessmedicina.mhmedical.com Fuente de Internet	1%
7	buleria.unileon.es Fuente de Internet	<1%

Excluir citas Activo Excluir coincidencias < 30 words
Excluir bibliografía Activo