



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP
“Dr. Antonio Guilherme de Souza”



BIANCA LEME

**PROPOSTA DE CULTIVO DE FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS A PARTIR
DE PAVILHÕES AURICULARES DE CAMUNDONGOS BALB/C**

BAURU
2022

BIANCA LEME

**PROPOSTA DE CULTIVO DE FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS A PARTIR
DE PAVILHÕES AURICULARES DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Monografia apresentada ao programa de Especialização Multiprofissional em Assistência Dermatológica, Centro Formador de Recursos Humanos para o SUS/SP “Dr. Antônio Guilherme de Souza”, unidade didática Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Dra. Maria Renata Sales Nogueira e coorientação da Dra. Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa.

BAURU

2022

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE BIBLIOTECA DO
INSTITUTO “LAURO DE SOUZA LIMA”**

L542p Leme, Bianca

Proposta de cultivo de fibroblastos primários a partir de pavilhões auriculares de camundongos Balb/c. / Bianca Leme, Bauru, 2022.

18f.; il.

Monografia apresentada ao programa de Especialização Multiprofissional em Assistência Dermatológica do Centro Formador de Recursos Humanos para o SUS/SP “Dr. Antônio Guilherme de Souza”, unidade didática Instituto Lauro de Souza Lima, sob orientação da Dra. Maria Renata Sales Nogueira e da Dra. Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa.

1. Fibroblastos. 2. Técnicas de Cultivo Celular. 3. Viabilidade Celular. I. Nogueira, Maria Renata Sales. II. Barbosa, Adriana Sierra Assencio. III. Título.

QU

CRB8/8247

BIANCA LEME**PROPOSTA DE CULTIVO DE FIBROBLASTOS PRIMÁRIOS A PARTIR DE
PAVILHÕES AURICULARES DE CAMUNDONGOS BALB/C**

Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização apresentado ao Instituto Lauro de Souza Lima, Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP- “Dr. Antônio Guilherme de Souza” como requisito parcial para obtenção do título de Especialista Multiprofissional em Assistência Dermatológica, área de concentração de biologia celular sob orientação da Dra. Maria Renata Sales Nogueira e coorientação da Dra. Adriana Sierra Assencio Almeida Barbosa.



Orientador



Coorientador



Avaliador

Bauru, 11/03/2022

(Data da defesa)

RESUMO

A pele representa mais de 15% do peso corpóreo e por ser importante via de interação com o meio ambiente, está sujeita a diferentes estímulos e agressões. Após uma lesão, inúmeros fatores ativam coletivamente a resposta inflamatória, a fim de destruir agentes agressores e orquestrar o reparo tecidual. Entre as principais células que compõem a pele estão os fibroblastos dérmicos, e a adoção de modelos experimentais que espelhem o comportamento biológico dessas células é de fundamental importância para a medicina regenerativa. Fibroblastos primários são exemplos de células facilmente cultiváveis, que apresentam uma gama de vantagens em comparação com outros tipos. O presente estudo se propôs testar modelos prévios de cultivo de fibroblastos primários a partir de pavilhões auriculares de camundongos da linhagem BALB/c, a fim de serem utilizados em futuros estudos de compatibilidade de biomateriais voltados ao reparo tecidual, entre outras aplicações. Nossos resultados demonstraram o cultivo de fibroblastos dérmicos primários de morfologia microscópica típica, com contornos fusiformes ou estrelados, prolongamentos citoplasmáticos evidentes e núcleo arredondado. A viabilidade e crescimento celular, avaliados após 2-4-6-8-10-12 dias, demonstrou pico de crescimento entre 6 e 8 dias, decaindo a partir de 10 dias. Observou-se ainda, uma correlação positiva entre os grupos experimentais e o período de tempo decorrido. Na comparação intragrupos, observou-se diferenças estatisticamente significantes entre grupos experimentais e controle negativo. Nossos resultados nos permitiram concluir que, fibroblastos dérmicos primários podem ser cultivados de modo simples, rápido e com baixo custo, a partir de pavilhões auriculares de camundongos BALB/c, sendo um modelo viável a ser empregado em estudos de com biomateriais reparadores.

Palavras-chave: Fibroblastos. Técnicas de Cultivo Celular. Viabilidade Celular.

ABSTRACT

The skin represents more than 15% of body weight and, as it is an important way of interacting with the environment, it is subject to different stimuli and aggressions. After an injury, numerous factors collectively activate the inflammatory response in order to destroy aggressive agents and orchestrate tissue repair. Among the main cells that make up the skin are dermal fibroblasts, and the adoption of experimental models that mirror the biological behavior of these cells is of fundamental importance for regenerative medicine. Primary fibroblasts are examples of easily cultured cells, which have a range of advantages compared to other types. The present study aimed to test previous models of primary fibroblasts culture from the ears of mice of the BALB/c lineage, in order to be used in future studies of compatibility of biomaterials aimed at tissue repair, among other applications. Our results demonstrated the cultivation of primary dermal fibroblasts with typical microscopic morphology, with fusiform or stellate contours, evident cytoplasmic processes and a rounded nucleus. Cell viability and growth, evaluated after 2-4-6-8-10-12 days, showed a growth peak between 6 and 8 days, decreasing after 10 days. There was also a positive correlation between the experimental groups and the period of time elapsed. In the intragroup comparison, statistically significant differences were observed between experimental groups and negative control. Our results allowed us to conclude that primary dermal fibroblasts can be cultured simply, quickly and at low cost, from the ears of BALB/c mice, being a viable model to be used in studies of repairing biomaterials.

Keywords: *Fibroblasts. Cell Culture Techniques. Cell viability.*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	8
2 MATERIAL E MÉTODOS	11
2.1 Animais Experimentais e Isolamento de Tecidos	11
2.2 Dissociação de Tecidos.....	12
2.3 Cultura Primária de Fibroblastos.....	12
2.4 Ensaio de Viabilidade.....	13
2.5 Caracterização	13
3 RESULTADOS.....	14
4 DISCUSSÃO.....	16
5 CONCLUSÃO.....	17
REFERÊNCIAS.....	17

1 INTRODUÇÃO

A pele representa mais de 15% do peso corpóreo e compõe-se de três camadas de tecidos: a epiderme, derme e hipoderme. E nela ocorrem muitos processos complexos e dinâmicos, como funções de barreira e imunológicas, produção de melanina, síntese de vitamina D, sensações, regulação térmica, proteção contra traumatismos e composição estética¹. Por ser uma área de interação com o meio ambiente, a pele está sujeita a diferentes estímulos e agressões².

Após uma lesão, inúmeros fatores ativam coletivamente a resposta inflamatória, propagada pela liberação local de fatores quimiotáticos e pelo recrutamento de leucócitos que devem destruir agentes agressores, limpar debris e orquestrar o reparo tecidual. O grau e a duração dessa resposta são variáveis e influenciam o desfecho, que pode vir com consequências negativas, como uma resposta fibrótica e perda de função tecidual³. De fato, a epiderme e a derme nos mamíferos adultos geralmente não têm capacidade regenerativa completa, e obter *insights* mais profundos sobre o desenvolvimento in vitro de fibroblastos dérmicos pode contribuir com terapias direcionadas ao reparo tecidual, sem formação de cicatrizes⁴.

Entre as principais células que compõem a pele estão os fibroblastos dérmicos, e a adoção de modelos experimentais que espelhem o comportamento biológico dessas células é de fundamental importância para a medicina regenerativa.^{4;5} Fibroblastos são células planas, fusiformes, com múltiplos processos estrelados e extenso retículo endoplasmático rugoso. Um fibroblasto médio mede 30 - 100 µm e tem uma vida útil de 57 ± 3 dias. A duração média do ciclo celular dos fibroblastos humanos varia de 16 a 48 horas, dependendo das condições de cultura⁶.

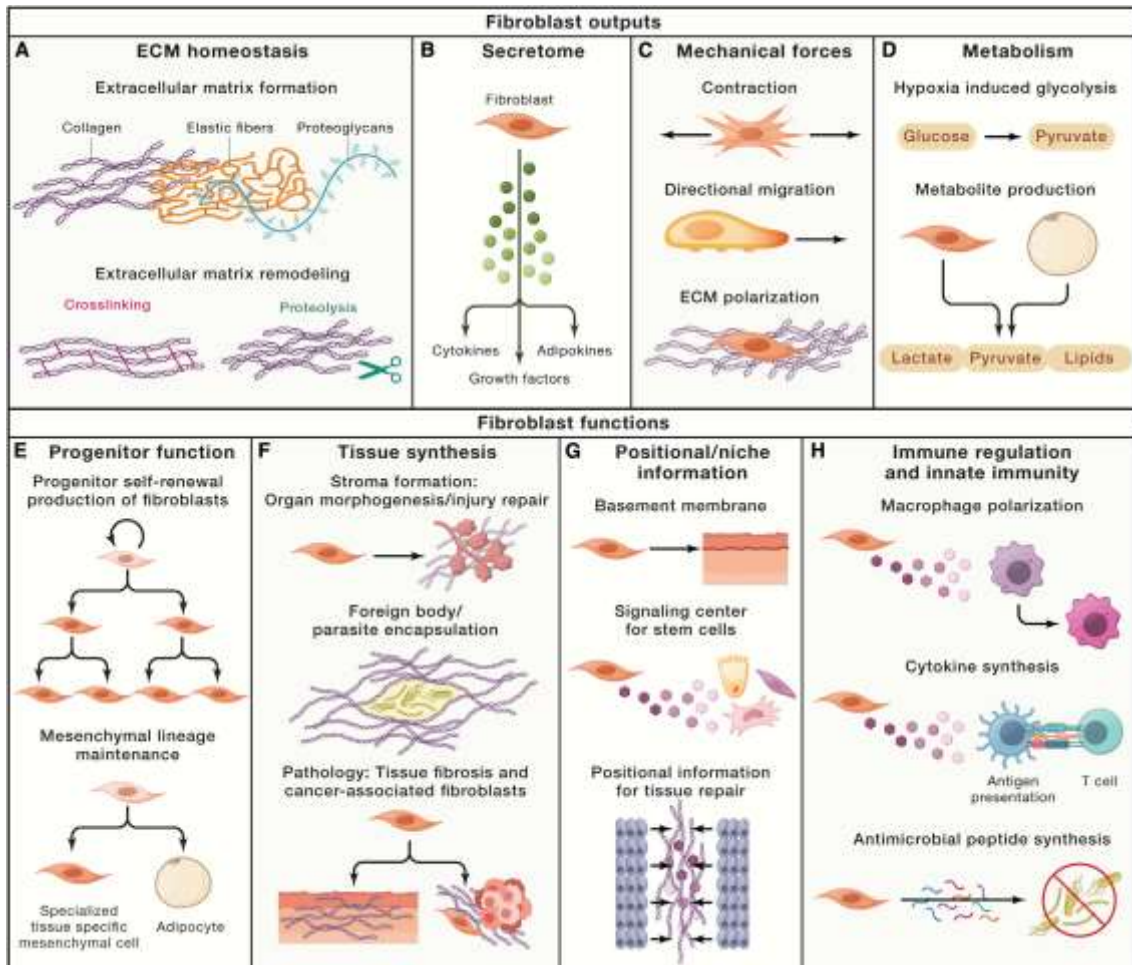


Figura 1. Fibroblastos e suas funções. Secreção e remodelação da matriz extracelular (A), secreção de fatores parácrinos (B), geração de força mecânica (C), regulação do metabolismo tecidual (D), função progenitora (E), síntese tecidual (F), sinalização para células-tronco (G), regulação imune (H). **Fonte:** Plikus et al., 2021

Devido a variabilidade de fibroblastos, há uma infinidade de proteínas marcadoras para esta células e entre as mais reconhecidas estão, a vimentina, a proteína de superfície do fibroblasto humano (hFSP), receptor 2 do domínio discoidina (DDR2) e alfa actina do músculo liso (α SMA)⁷. Em resposta ao dano tecidual, os fibroblastos adotam um fenótipo transitório de miofibroblastos, que se caracterizam pela secreção marcante de matriz extracelular e citocinas, além da expressão de microfilamentos de α SMA⁵. Alterações na síntese de matriz extracelular são eventos

que podem marcar o início de um processo de deposição excessiva, culminando na formação de cicatriz aberrante⁶.

Historicamente, os fibroblastos foram descritos em 1858, pelo patologista alemão Rudolf Virchow, que os chamou de *Spindelzellen des Bindegewebes* – células em forma de fuso do tecido conjuntivo. O termo utilizado atualmente, "fibroblasto", foi proposto por Ernst Ziegler para descrever células que produzem novo tecido conjuntivo após a cicatrização⁵. A partir do desenvolvimento de técnicas *in vitro*, em 1900, permitiu-se o cultivo de fibroblastos primários derivados de explantes embrionários de aves. Mais de 50 anos após os primeiros estudos *in vitro*, foi estabelecida uma das primeiras linhagens de fibroblastos, a 3T3, derivada de embriões de camundongos (Todaro e Green, 1963; Todaro et al., 1964), avançando a compreensão sobre a fisiopatologia do tecido conjuntivo, bem como a identificação de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e o fenômeno de transdiferenciação⁵.

A adoção de modelos experimentais que espelhem processos moleculares e celulares são constantemente demandados na ciência, e células primárias derivadas dos tecidos de interesse são a base biológica de muitos desses modelos. e servem como fonte de réplicas biológicas mais próximas em comparação com linhagens celulares padrão⁶. Fibroblastos primários são ótimos exemplos de células cultiváveis, presentes em vários tecidos, que apresentam uma gama de vantagens em comparação com outros tipos celulares. Uma vez que carregam genes de controle do ciclo celular intactos (não mutados), os fibroblastos primários servem como um modelo ideal para estudos de reparo do DNA e mecanismos de controle do ciclo celular. Fibroblastos primários retêm ainda, alterações pró-inflamatórias relacionadas à idade, tornando-os candidatos perfeitos para o estudo do “envelhecimento por inflamação”⁷.

Adicionalmente, a utilização de fibroblastos primários tem estado no centro das atenções de pesquisas com foco nas interações dessas células com o microambiente tumoral. O entendimento efetivo das propriedades fisiopatológicas dos fibroblastos

depende do isolamento bem padronizado de fibroblastos adultos primários viáveis⁶. Embora existam vários protocolos para obtenção e expansão de fibroblastos primários (Au-Khan, Au-Gasser, 2016; Seluanov et al., 2010; Edelman, Redente, 2018), sempre há necessidade de modelos adicionais que maximizem a utilização desses recursos⁷.

O presente estudo se propôs testar modelos prévios de cultivo de fibroblastos primários a partir de pavilhões auriculares de camundongos da linhagem BALB/c, a fim de serem utilizados em futuros estudos de compatibilidade de biomateriais voltados ao reparo tecidual, entre outras aplicações.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os métodos descritos a seguir foram executados com base nos estudos prévios de Bravo, Kim, Benayoun (2021) e Khan, Gasser (2016).

2.1 Animais Experimentais e Isolamento de Tecidos

Os ensaios foram conduzidos em cinco camundongos da linhagem BALB/c, machos, com 60 dias de vida, provenientes do Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima/SES, Bauru/SP. O manuseio dos animais se deu conforme as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Lauro de Souza Lima, a partir de Princípios Éticos na Experimentação Animal, elaborados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Para coleta de tecidos, animais foram eutanasiados por sobredose de cetamina 200 mg/kg (Syntec) e xilazina 30 mg/kg (Syntec), via intraperitoneal. Os animais foram então, higienizados com etanol 70%, as orelhas foram envolvidas com gaze estéril e embebidas em solução Iodopovidona 10%, por 15 minutos. Cada animal fixado em placa de dissecção, tricotomizado e as orelhas removidas com tesoura cirúrgica, após terem sido higienizadas novamente com etanol 70%.

Os espécimes formam mantidos em placa de Petri estéril, contendo meio de coleta composto por salina tamponada com fosfato (PBS) suplementada com penicilina/estreptomicina 2% e anfotericina 1%, a 4 °C, até a finalização do procedimento. Os espécimes passaram por lavagem seriada em meio de coleta, divididos em fragmentos menores e transferidos para placa de poliestireno de 6 poços, contendo 5 ml/poço de meio de dissociação composto por meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com 2 mg/ml de colagenase tipo II e penicilina/estreptomicina 1%. A referida placa com as amostras foi mantida por 6 horas em incubadora de CO₂ (5%) com 95% de umidade, à 37 °C.

2.2 Dissociação de Tecidos

Finalizado o período de digestão enzimática, os fragmentos foram transferidos para tubo Falcon de 50 ml e centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi dispensado e do precipitado foi devidamente homogeneizado com pipeta de vidro, até a total dissociação do material. A suspensão celular foi ainda, homogeneizada por meio de seringas com três diferentes calibres de agulha (40x1,20; 25x0,70 e 13x0,45 mm). A suspensão celular foi filtrada em membrana de 40µm e transferida para novo tubo Falcon. Após lavagem por centrifugação a 1500 rpm, por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento, resuspenso em meio de proliferação (DMEM-Hg contendo SFB 10%, L-glutamina 4 mM e penicilina/estreptomicina 1%).

2.3 Cultura Primária de Fibroblastos

Previamente à semeadura das células, foram coletados 10 µl se suspensão para contagem e teste de exclusão de viabilidade por azul de Tripán. A densidade celular obtida foi de 6,5 x 10⁶ células viáveis. Inicialmente, as células foram divididas em dois grupos de replicatas experimentais, A1 e A2, em placas de poliestireno de 96 poços (0,33 cm²/poço), com concentração celular ajustada para 1 x 10⁴ células/poço. A cultura primária prosseguiu, em incubadora de CO₂ (5%) com 95% de umidade, à 37 °C, com troca de 50% de meio de proliferação após 24 horas e 100% de troca a cada 48 horas subsequentes.

2.4 Ensaio de Viabilidade

Após 2-4-6-8-10-12 dias, procedeu-se o ensaio de viabilidade celular com brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Inicialmente, o volume foi ajustado para 100 µl em cada poço, adicionado 10 µl/poço da solução 12 mM MTT (5 mg/ml de PBS estéril) e incubada em ambiente de CO₂ (5%) com 95% de umidade, à 37 °C, por 10 minutos. O volume foi ajustado para 25 µl/poço e adicionado 50 µl/poço de dimetilsulfóxido (DMSO), por mais 10 minutos. Logo em seguida, realizamos a leitura em absorbância a 540 nm. Além dos grupos A1 e A2, foi estabelecido um grupo controle contendo apenas meio de proliferação.

2.5 Caracterização

Foi utilizada técnica de microscopia de contraste de fase e imunofluorescência a fim de caracterizar os fibroblastos primários, morfológica e fenotipicamente. Para imunofluorescência, os grupos experimentais foram distribuídos em preparados seis poços de placa de 24 poços (1,93 cm²), adicionando-se uma lamínula (13 mm) de vidro circular/poço. Em seguida cada poço recebeu 100 µl de laminina de membrana basal de sarcoma murino (Sigma-Aldrich). A placa foi mantida em incubadora de CO₂ (5%) com 95% de umidade, à 37 °C, por 2 horas. Ao término desse período, a laminina foi descartada, os poços foram lavados com PBS e secos a temperatura ambiente (TA). As células dissociadas dos pavilhões auriculares murinos foram ajustadas na densidade de 5 x 10⁴ células/poço e mantidas em incubadora por 48 horas.

A técnica de imunofluorescência se iniciou pela fixação das células em paraformaldeído a 4%, pH 7,4 (PFA. Thermo Fisher Scientific), durante 10 minutos. A solução foi então removida e as células foram lavadas 3 vezes em PBS. Em seguida as células foram incubadas por 10 minutos em solução PBS/glicina 0,1 mM (Sigma-Aldrich) e lavadas novamente PBS. Foi realizada permeabilização de membrana celular em PBS/Triton-X 100 a 0,1%, durante 15 minutos, (TA). Após permeabilizadas,

as células foram lavadas em PBS e bloqueadas com solução PBS/albumina sérica bovina 3% (BSA. Sigma-Aldrich) por 60 minutos, (TA).

Para caracterização imunofenotípica, foi utilizado anticorpo monoclonal *alpha-smooth muscle actin* (α SMA. Clone 1^a4. 1:100. Invitrogen) diluído em BSA 0,1% e incubado por 3 horas, (TA). Após incubação, a solução foi removida e as células foram lavadas três vezes em PBS. Foi adicionado o anticorpo secundário AlexaFluor® 488, 1:400 diluído em 500 μ l BSA à 0,1%, (TA), no escuro, por 45 minutos. Após incubação, os poços foram lavados três vezes com 500 μ l de PBS. As lamínulas foram transferidas para a lâmina padrão de microscopia, colocadas sob uma 20 μ l de Vectashield® com DAPI (Sigma-Aldrich). As lamínulas foram vedadas com esmalte comum para unhas e permaneceram à 4°C, protegidas da luz até o momento da análise microscópica.

3 RESULTADOS

As células semeadas a partir da digestão enzimática de tecidos, apresentaram morfologia microscópica típica, com contornos fusiformes ou estrelados, prolongamentos citoplasmáticos evidentes e núcleo arredondado (Figura 2). A viabilidade e crescimento celular, avaliados após 2-4-6-8-10-12 dias, demonstrou pico de crescimento entre 6 e 8 dias, decaindo a partir de 10 dias.

Observou-se ainda, pelo método MTT, correlação positiva entre os grupos experimentais, principalmente A2, e o período de tempo decorrido (Spearman $r=0,89$; $p=0,01$). Na comparação intragrupos, observou-se diferenças estatisticamente significantes entre grupos experimentais e controle negativo (teste de comparações múltiplas de Dunn (controle vs. A1, $p= 0,005$; controle vs. A2, $p= 0,004$). A comparação quanto à viabilidade celular, entre os dois grupos experimentais não retornou diferenças significantes (Figura 3).

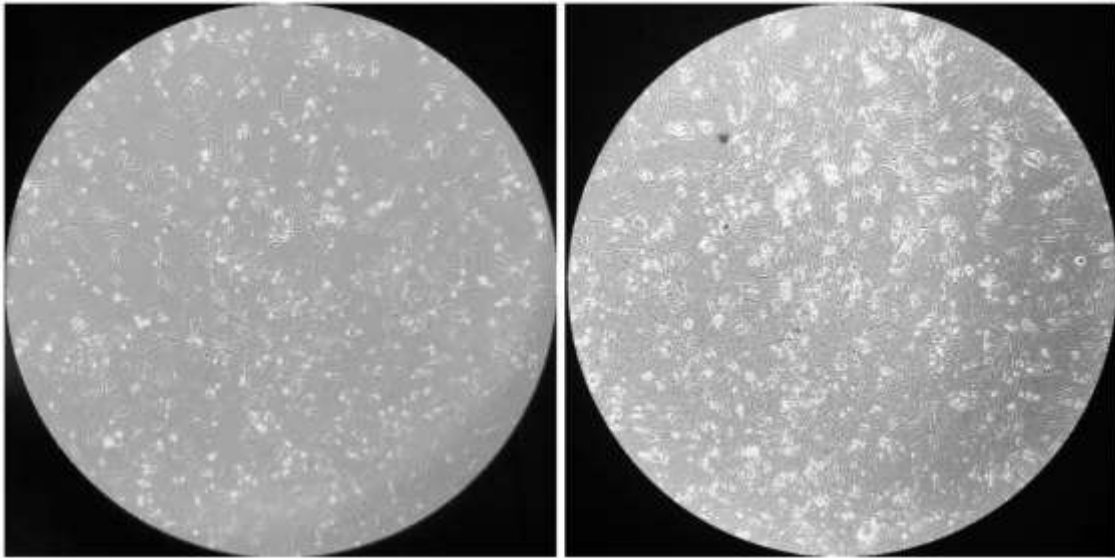


Figura 2. Fibroblastos de pavilhão auricular de camundongos BALB/c. Cultura primária de células após 4 (A) e 6 dias (B) de se semeadura, demonstrando morfologia típica. Contraste de fase. Objetiva 40X. **Fonte:** Elaborado pelas autoras

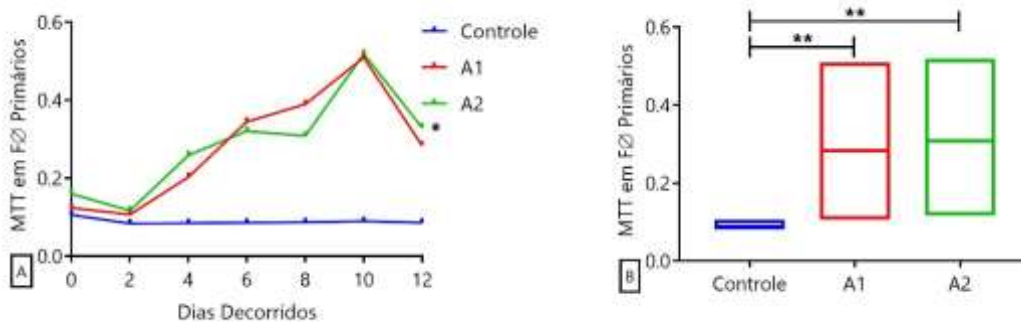


Figura 3. Fibroblastos de pavilhão auricular de camundongos BALB/c. Avaliação por ensaio MTT. Em (A), correlação de viabilidade entre controle negativo (meio de proliferação) e grupos experimentais (A1, A2), via teste de Spearman (para A2, $r=0,89$ e $p=0,01$). Em (B), comparação entre grupos, via teste de Kruskal-Wallis ($p= 0,0001$) com teste de comparações múltiplas de Dunn (para controle vs. A1, $p= 0,005$; para controle vs. A2, $p= 0,004$). **Fonte:** Elaborado pelas autoras

4 DISCUSSÃO

O reparo tecidual eficaz é fundamental para a sobrevivência de todos os organismos vivos³, e o entendimento da complexa interação entre diferentes tipos de células e vias de sinalização durante o desenvolvimento, reparação e homeostase, é essencial para a construção de soluções mais eficientes quando se trata de cura de feridas⁴. Nesse estudo, testamos modelos prévios de cultivo de fibroblastos primários a partir de pavilhões auriculares de camundongos da linhagem BALB/c⁸.

Os fibroblastos são células planas, fusiformes, com múltiplos processos estrelados e extenso retículo endoplasmático rugoso. Um fibroblasto médio mede entre 30 e 100 μm e tem uma vida útil de 57 ± 3 dias⁶. Nossos achados morfológicos são compatíveis com a descrição clássica para esse tipo celular. A imunodeteção de αSMA foi observada nos espécimes avaliados, confirmando seu fenótipo de linhagem fibroblástica. Reiteramos nesse estudo a afirmação de que o estabelecimento de modelos *in vitro* apropriados para fibroblastos abre caminho em direção a aplicação dessas células em substitutos de pele por bioengenharia. Além, disso, sabe-se que a adição de componentes dérmicos aos substitutos de pele tem resultado em enxertos mais estáveis⁹.

O modelo aqui testado gerou resultados estatisticamente significantes quanto à viabilidade dos fibroblastos primários, assim como a observação de características morfológicas e fenotípicas comparáveis a estudos prévios com protocolos semelhantes. Vale lembrar que, nesse modelo há necessidade de se reestabelecer o cultivo de fibroblastos primários com certa frequência, devido à eventual senescência dessas células, o que não ocorre em linhagens celulares estabelecidas e imortalizadas, com a 3T3 por exemplo. Ainda assim, os fibroblastos primários dérmicos são facilmente cultivados, sem a necessidade de purificação prévia, reafirmando a eficiência desse protocolo⁸.

5 CONCLUSÃO

Nossos resultados nos permitiram concluir que, sob as condições experimentais ensaiadas, fibroblastos dérmicos primários podem ser cultivados de modo simples, rápido e com baixo custo, a partir de pavilhões auriculares de camundongos BALB/c, sendo um modelo viável a ser empregado em estudos de com biomateriais reparadores e sobre o papel dos fibroblastos no desenvolvimento de tumores.

REFERÊNCIAS

1. Rivitti EA. Manual de dermatologia clínica de Sampaio e Rivitti. São Paulo: Artes Médicas; 2014
2. Isaac C, Ladeira PRS, Rego FMP, Aldunate JCB, Ferreira MC. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. São Paulo: Revista de Medicina; 2010
3. Eming SA, Wynn TA, Martin P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*. 2017 Jun 9;356(6342):1026-1030. doi: 10.1126/science.aam7928. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28596335.
4. Thulabandu V, Chen D, Atit RP. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2018 Mar;7(2):10.1002/wdev.307. doi: 10.1002/wdev.307. Epub 2017 Dec 15. PMID: 29244903; PMCID: PMC5814349
5. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, Driskell RR, Rosenthal N, Biernaskie J, Horsley V. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. 2021 Jul 22;184(15):3852-3872. doi: 10.1016/j.cell.2021.06.024. PMID: 34297930; PMCID: PMC8566693
6. Künzel SR, Schaeffer C, Sekeres K, Mehnert CS, Schacht Wall SM, Neue M, Kämmerer S, El-Armouche A. Ultrasonic-augmented Primary Adult Fibroblast Isolation. *J Vis Exp*. 2019 Jul 29;(149). doi: 10.3791/59858. PMID: 31403625.
7. Bravo JI, Kim M, Benayoun BA. Protocol for isolation of adult mouse ear pinnae-derived primary fibroblasts. *STAR Protoc*. 2021 Mar 23;2(2):100406. doi: 10.1016/j.xpro.2021.100406. PMID: 33855308; PMCID: PMC8024749.
8. Khan M, Gasser S. Generating Primary Fibroblast Cultures from Mouse Ear and Tail Tissues. *J Vis Exp*. 2016 Jan 10;(107):53565. doi: 10.3791/53565. PMID: 26779653; PMCID: PMC4781275.
9. Kisiel MA, Klar AS. Isolation and Culture of Human Dermal Fibroblasts. *Methods Mol Biol*. 2019; 1993:71-78. doi: 10.1007/978-1-4939-9473-1_6. PMID: 31148079.