



UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**DIFERENCIACIÓN CARDIOMIOGÉNICA *IN VITRO* DE
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS
DEL CORDÓN UMBILICAL HUMANO.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller **Selvitella Luna, Silvia Emilia**, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor: Dra Elizabeth Merentes

CARACAS, VENEZUELA


OCTUBRE 2016

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO TITULADO

“DIFERENCIACIÓN CARDIOMIOGÉNICA *in vitro* DE CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES AISLADAS DEL CORDÓN UMBILICAL HUMANO”

Presentado por la Br. Silvia Emilia Selvitella Luna, ante la ilustre Universidad
Central de Venezuela para optar al título de Licenciado de Biología.

Defendido públicamente el día 24 de Octubre del 2016 y aprobado por los
miembros del jurado designado por el Consejo de Escuela de Biología, quienes
consideran que dicho trabajo cumplió con los requisitos exigidos por los
reglamentos respectivos.



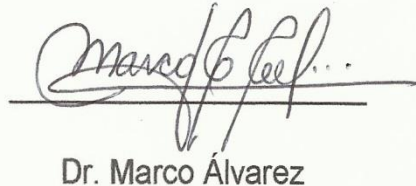
Dra. Elizabeth Merentes

TUTORA



Dra. María Lorena Márquez

JURADO



Dr. Marco Álvarez

JURADO

Agradecimientos

Principalmente quiero agradecer a mis padres y familia quienes siempre me apoyaron, impulsaron y creyeron en mí en todo momento.

A mi tutora la profesora Elizabeth Merentes, quien siempre tuvo la mayor disposición para contestar todas mis preguntas, como también a guiarme e instruirme en este maravilloso mundo de la embriología y el cultivo celular.

A mis jurados, la profesora María Lorena Márquez quien también estuvo dispuesta a ayudarme y aclarar mis dudas en todo momento, y al profesor Marcos Álvarez quien enriqueció con su conocimiento este trabajo.

A mi primo, el medico Pedro Hurtado quien en todo momento nos ayudó tanto a mí y a mis compañeros del laboratorio, a conseguir las placentas y cordones umbilicales para realizar la parte experimental de nuestros trabajos.

A Robert Gonzalez quien siempre me dio palabras de aliento y me reconfortó en los momentos que sentí que no podía lograrlo, además de escucharme practicar las presentaciones aunque no entendía mucho de lo que estaba hablando.

A la profesora Cristina Sanoja que desde mis primeros semestres me guío y me impulso a cada paso de esta carrera.

Por último, a mis compañeros Adela Indriago, Ilad Vivas, Carlos Cáceres, Jeniree Sagasti, Marlyn Mosqueda, Ruth Méndez (Especialmente a los ecólogos que me sacaron a pasear a campo de vez en cuando) y a todos los que me acompañaron entre risas, llantos y trasnochos a lo largo de esta carrera, siendo todos fundamentales para poder estar hoy donde estoy.

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) son células multipotentes con la capacidad de diferenciarse a linajes del mesoderma embrionario, tal como el linaje cardíaco. Aunque se aislaron por primera vez de la médula ósea (MO), se ha demostrado que el cordón umbilical (CUH) posee poblaciones de CMM en sus regiones, convirtiéndolo en una fuente alternativa para obtenerlas, que a diferencia de la MO es un material de desecho luego del parto y no requiere de procesos quirúrgicos para su obtención.

Tomando en cuenta su capacidad de diferenciación hacia el linaje cardíaco y la presencia de estas en el CUH, en este trabajo se indujeron las CMM del CUH a un etapa temprana de diferenciación cardíaca utilizando dos estrategias inductoras, con el interés de contribuir con protocolos para obtener cardiomiocitos o células progenitoras cardíacas que puedan utilizarse en tratamientos celulares de enfermedades cardíacas en un futuro.

Para cumplir con este objetivo, se aislaron las CMM mediante la técnica de explantes y disgregación enzimática de las diferentes regiones del CUH, las cuales se caracterizaron con coloraciones de rutina e inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-vimentina y luego se indujeron a un proceso de diferenciación hacia el linaje cardiomiogénico utilizando medios condicionados y co-cultivos con células cardíacas provenientes de corazones de fetos de ratón por 15 días. La diferenciación cardiomiogénica se evaluó mediante coloraciones de rutina, con la tinción hematoxilina fosfotungsticada (PTAH), y por la presencia de la proteína desmina, como también, particularmente en las CMM inducidas con sistemas de co-cultivo, mediante cortes histológicos de los agregados formados y electroforesis de proteínas.

Palabras claves: Cardiomiocitos, Células madre mesenquimales, co-cultivos, diferenciación cardíaca, medios condicionados.

I. INDICE DE CONTENIDO

I. INDICE DE CONTENIDO.....	i
II. INDICE DE FIGURAS.....	v
II.ABREVIACIONES.....	vii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1. Células Madre.....	1
2. Células Madre Mesenquimales.....	2
3. Cordón umbilical humano como fuente de células madre mesenquimales.....	3
4. Uso potencial de CMM en terapias celulares.....	5
5. Corazón.....	7
6. Los parámetros que regulan el microambiente celular como base para el planteamiento de técnicas de diferenciación.....	9
2.ANTECEDENTES.....	13
3.JUSTIFICACIÓN.....	19
4.OBJETIVOS.....	20
1. Objetivo general.....	20
2. Objetivos específicos.....	20
5.MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
1. Material Biológico.....	21
2. Obtención y transporte del material biológico.....	21
3. Cultivos celulares.....	22
3.1 Obtención y establecimiento del cultivo primario de las células madre mesenquimales del cordón umbilical humano.....	22
3.1.1 Obtención de las células madre mesenquimales por la técnica de explantes.....	22
3.1.2 Aislamiento de células madre mesenquimales por disgregación enzimática seriada con Dispasa, Tripsina: EDTA y Colagenasa II.....	23
3.2 Subcultivos.....	24
3.3 Establecimiento del cultivo primario de cardiomiocitos a partir de corazones de fetos de ratón de 17- 19 días de gestación.....	24
4. Inducción cardiomiogénica.....	25
4.1 Obtención y aplicación del medio condicionado.....	25
4.2 Establecimiento de los sistemas de co-cultivos.....	26
5. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica.....	27
5.1 Caracterización de las células madre mesenquimales.....	27

5.2	Cardiomiocitos y células inducidas mediante el uso de medios condicionados y sistemas de co-cultivos.	27
5.3	Estudio histológicos de los agregados formados en los sistemas de co-cultivo.....	28
5.4	Análisis electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	29
6.	RESULTADOS	30
1.	Establecimiento de los cultivos de células madres mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano.....	30
2.	Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de los cultivos de las células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano.....	32
3.	Establecimiento de los cultivos de cardiomiocitos a partir de explantes de corazón de fetos de ratón.....	35
4.	Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de los cardiomiocitos aislados de explantes de corazón de fetos de ratón.	36
5.	Evaluación de la diferenciación cardiomiogénica	39
5.1	Inducción cardiomiogénica mediante el uso de Medios Condicionados obtenidos de cultivos de cardiomiocitos de ratón.....	39
5.1.1	Evolución de los cultivos inducidos.....	39
5.1.2	Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica.....	42
5.2	Inducción cardiomiogénica mediante el establecimiento de co-cultivos con las células madre mesenquimales y los cardiomiocitos.	45
5.2.1	Evolución de los co-cultivos establecidos.....	45
5.2.2	Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica.....	47
5.2.3	Histología de los agregados celulares.....	48
5.2.4	Comparación de composición proteica de las células inducidas con las CMM y células cardiacas.	50
7.	DISCUSIÓN	52
1.	Aislamiento y establecimiento de los cultivos celulares de las poblaciones de CMM presentes en las diferentes regiones del CUH mediante la técnica de explantes y de disgregación enzimática.....	52
2.	Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las CMM aisladas del CUH.	55
3.	Aislamiento y establecimiento de los cultivos primarios de los cardiomiocitos a partir de corazones de fetos de ratón.....	57
4.	Caracterización fisiológica, morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de los cardiomiocitos aislados.....	57
5.	Evaluación morfológica de la diferenciación cardiomiogénica de CMM usando medios condicionados de los cultivos de explantes de fetos de ratón.	60
6.	Evaluación morfológica de la inducción cardiomiogénica mediante el establecimiento de co-cultivos de CMM y células de corazón de fetos de ratón.	63

6.1. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de la inducción cardiomiogénica.....	65
6.2. Histología de los agregados formados por las células inducidas.....	66
6.3. Comparación de perfiles proteicos de las células inducidas con las CMM y corazón.	67
8.CONCLUSIONES.....	69
9.BIBLIOGRAFÍA.....	70
10.ANEXOS.....	78

II. INDICE DE FIGURAS

1.	Tipos de células madre según su potencialidad y etapas de desarrollo del embrión.....	2
2.	Células madre mesenquimales y su potencialidad.....	3
3.	Desarrollo Embrionario del Cordón Umbilical Humano.....	4
4.	Estructura del Cordón Umbilical Humano con sus partes Señaladas.....	7
5.	Corazón.....	9
6.	Técnicas de cultivo celular.....	12
7.	Poblaciones celulares aisladas mediante la técnica de los explantes observadas en el microscopio de contraste de fases.....	30
8.	Poblaciones celulares aisladas mediante el denudado del epitelio de revestimiento del CUH luego del tratamiento con la enzima Dispasa observadas en el microscopio de contraste de fases.....	31
9.	Poblaciones celulares obtenidas a través de la disgregación enzimática de la Gelatina de Wharton con Tripsina-EDTA y Colagenasa II observadas en el microscopio de contraste de fases.....	32
10.	Caracterización de las poblaciones celulares de células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano.....	34
11.	Cultivos primarios de cardiomiocitos aislados por explantes de los corazones de fetos de ratón observados en el microscopio de contraste de fases.....	36
12.	Caracterización de las poblaciones celulares aisladas de los corazones de fetos de 17 a 19 días de gestación.....	38
13.	Evaluación de la inducción cardiomiogénica de los cultivos celulares expuestos a los medios	

condicionados de corazones de fetos de ratón a través del microscopio de contraste de fases.....	41
14. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de las CMM inducidas a linaje cardiaco mediante el uso de medios condicionados.....	44
15. Evaluación de la inducción cardiomiogénica por establecimiento de los sistemas de co-cultivos establecidos entre CMM y cardiomiocitos de fetos de ratón a través del microscopio de contraste de fases.....	46
16. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de las CMM inducidas a linaje cardiomiogénico mediante el establecimiento de co-cultivos.....	48
17. Corte histológico de los agregados celulares formados en los sistemas de co-cultivos coloreados con PTAH.....	49
18. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida de proteínas de corazón de ratón (COR), células inducidas de los co-cultivos (CC), células madre mesenquimales (CMM) y los marcadores de peso molecular (MPM) con coloración de plata	51

II. ABREVIACIONES

bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos	H/E	Hematoxilina- Eosina
BMP	Proteína Morfogenética de Hueso	HGF	Factor de crecimiento hepático
BMP4	Proteína morfogenética de hueso 4	IBE	Instituto de Biología Experimental
CFU-F	Unidades formadoras de colonias de fibroblastos	IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
CM	Células madre	IGFBP-1	Factor de crecimiento de enlazamiento de proteínas estilo insulina 1
CME	Células madres embrionarias	IGFBP-2	Factor de crecimiento de enlazamiento de proteínas estilo insulina 2
CMM	Células madres mesenquimales	IPC	Células madre pluripotentes inducidas
cMyBP-C	Proteína cardiaca de unión de miosina C	ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
CUH	Cordón umbilical humano	KDa	Kilo Daltons
DAB	Diaminobencidina	MEC	Matriz Extracelular
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco	MEF2	Factor potenciador de miocitos
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético	MHCI	Moléculas del complejo de histocompatibilidad I
EGF	Factor de crecimiento epidérmico	MHCII	Moléculas del complejo de histocompatibilidad II
ERK	Factor de Quinasas Reguladoras de Señal Extracelular	NK	Natural Killer
FGF	Factor de crecimiento de Fibroblasto	NT-3	Factor neurotrofina 3
HBV	Hepatitis B	PBS	Solución buffer fosfato
HCV	Hepatitis C	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PKC	Enzima proteína quinasa C
PTAH	Hematoxilina Ácida Fosfotungstica
rpm	Revoluciones por Minuto
SFB	Suero Fetal de Bovino
Shh	Sonic hedgehog
STAT3	Activador de transcripción 3
TGF β	Factor transformador de crecimiento beta
V	Voltios
VIH	Virus de inmunodeficiencia adquirida

1. INTRODUCCIÓN

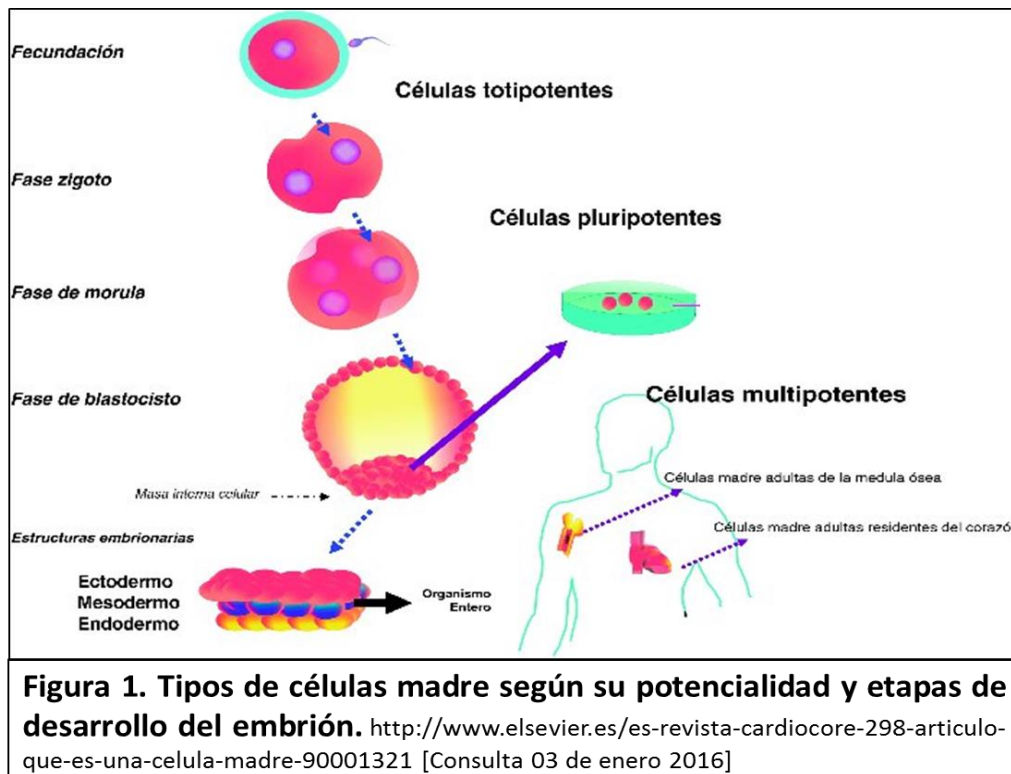
1. Células Madre

Las células madre (CM) son las primeras células indiferenciadas detectables en un linaje con la capacidad de diferenciarse, para generar los diferentes tipos celulares y de mantener la autorrenovación de su población mediante la división celular (Freshney, 2010).

Las CM se pueden clasificar según dos criterios (Figura 1): El primer criterio es según su potencialidad (capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares), organizando de menor a mayor potencialidad encontramos primero a las **CM unipotentes**, las cuales poseen la capacidad de generar solo una vía de diferenciación. Luego encontramos a las **CM bipotentes**, las cuales poseen la capacidad de generar dos vías de diferenciación, siguiendo con las **CM multipotentes**, que son aquellas que poseen la capacidad de generar más de dos tipos celulares de la misma capa embrionaria y con las **CM pluripotentes**, las cuales poseen la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo de célula derivada de las tres capas embrionarias (Ectodermo, mesodermo, endodermo), pero sin capacidad de generar un individuo completo. Por último, encontramos a las **CM totipotentes**, las cuales poseen la capacidad de diferenciarse a todos los linajes y formar un individuo completo (Freshney, 2010; Rojas y Meruane, 2012).

El segundo criterio que se utiliza, es clasificarlas según su origen, hallando tres categorías dentro de este criterio, las **CM Embrionarias**, las cuales provienen de embriones, tales como la masa interna del blastocisto, generalmente con capacidad pluripotente y que se pueden mantener *in vitro* indefinidamente; las **CM Adultas**, las cuales provienen de tejidos adultos y generalmente con capacidad multipotente y con menor potencialidad; y las **CM pluripotentes inducidas (IPC)**, las cuales provienen de ambos tejidos (tanto adulto como embrionario) ya que pueden ser el resultado de una técnica de reprogramación celular inducida por manipulación genética, donde se

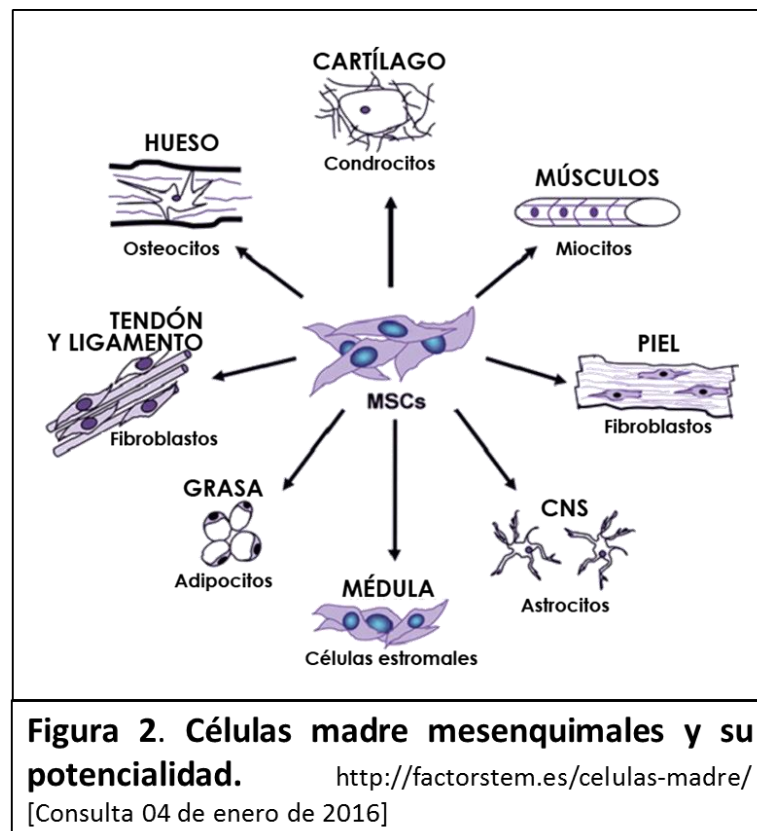
realiza un trasplante nuclear de una célula somática a un ovocito y posteriormente se toman las células de la masa celular interna del blastocisto para obtener las CM pluripotentes, o por técnicas de regulación epigenética de la expresión de los genes de células adultas (Freshney, 2010; Scott, 2006).



2. Células Madre Mesenquimales

Las **células madre mesenquimales (CMM)** son aquellas células presentes en tejidos adultos, las cuales están involucradas en el reemplazo y reparación del tejido en el que se encuentran (Ding y col., 2015). Generalmente tienen capacidad multipotente, lo cual les permite poder diferenciarse a diversos linajes celulares de origen mesodérmico, estos destinos finales incluyen estructuralmente los tejidos conectivos, musculares y óseos, así como también los vasculares tales como el endotelio de vasos sanguíneos y músculo liso (Freshney, 2010) (Figura 2). La forma más sencilla de reconocer estas células es por su morfología fibroblastoide característica. Este tipo de

células se pueden aislar de diferentes tipos de tejidos (Arévalo y col, 2007), incluyendo un tejido neonatal como el cordón umbilical humano (Freshney, 2010).



3. Cordón umbilical humano como fuente de células madre mesenquimales

Recientemente se ha demostrado el **cordón umbilical humano (CUH)**, es una fuente rica en **CMM** y células hematopoyéticas, éste es una estructura característica del grupo taxonómico de los mamíferos, específicamente de los mamíferos placentarios, que se forma en el desarrollo embrionario temprano de éstos, conformando así la conexión física y funcional del embrión con la placenta, y esta última a su vez es el puente de relación entre el embrión y la madre (Hickman y col., 2002). Una vez que se da la segmentación posterior a la fecundación, las células externas del embrión en formación generaran el trofoblasto o trofoectodermo (Fig. 3A), el cual va a producir el corión, que es la parte embrionaria de la placenta. El trofoblasto se divide dando origen a dos capas celulares, una en la cual la división celular se da ante la ausencia de citocinesis formando así

el sincitiotrofoblasto y otra la cual queda constituida por las células originales del trofoblasto denominada citotrofoblasto (Fig. 3B). Una vez que se forma el sincitiotrofoblasto, éste se une al endometrio ingresando a este para remodelar los vasos sanguíneos maternos para que de este modo los vasos sanguíneos maternos bañen los vasos sanguíneos fetales (Figura 3.C). El útero entonces a su vez envía vasos sanguíneos hacia el área donde está el sincitiotrofoblasto hasta que hace contacto con el mismo. Simultáneamente el mesodermo extraembrionario se extiende hacia afuera y se une a las extensiones trofoblásticas (Fig. 3D y 3E) dando origen a los vasos sanguíneos que transportan nutrientes desde la madre hacia el embrión (Scott, 2006). El estrecho pedículo, recubierto por el amnios, que se forma de esta interacción generará entonces los vasos del cordón umbilical para que de este modo la madre provea al feto nutrientes y oxígeno, y desde feto se transporta los productos de desechos hacia la circulación materna (Rojas y Meruane, 2012).

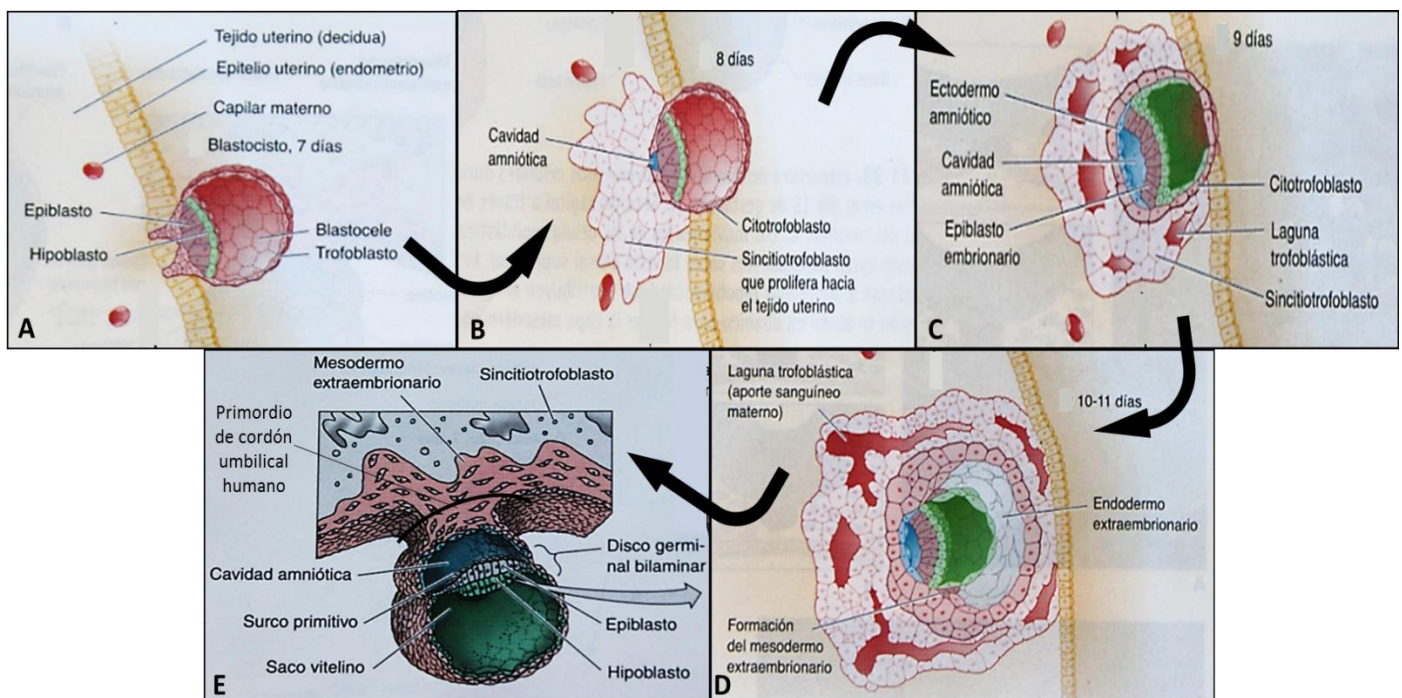


Figura 3. Desarrollo Embrionario del Cordón Umbilical Humano. A) 7 días. B) 8 Días. C) 9 días. D) 10-11 días. E) 15 días. Tomado y modificado de Scott, 2006.

Una vez formado en su totalidad, el cordón umbilical humano anatómicamente está conformado por dos arterias, que se encargan de llevar los desechos tóxicos y dióxido de carbono

liberado por el feto a la madre, y una vena, que se encarga de llevar el oxígeno, nutrientes y las hormonas al feto (Flores, 2010); estos tres vasos sanguíneos se enroscan unos sobre los otros generando el aspecto espiralado natural del CUH (Figura 4). En general estos vasos poseen una población de células endoteliales que recubre la luz (Gartner y Hiatt, 2002) y una población de células perivasculares integradas con CMM en la capa exterior de los vasos (Baksh y col, 2007). Todo el interior del cordón se encuentra envuelto por tejido conectivo mucoide, de origen mesenquimal, denominado Gelatina de Wharton (Cuhna, 2012), este tejido es una matriz rica en proteoglicanos e inmersas en él, encontramos poblaciones de CMM, su función consiste en ser la capa protectora de los vasos sanguíneos (Flores, 2010), y por último, recubriendo a todo el cordón umbilical, se encuentra el amnios, la membrana fetal más interna, que es avascular, resistente, firme y a la vez flexible, la cual se encuentra compuesta por una capa de células epiteliales, una lámina basal compuesta de colágenos, una capa de tejido conectivo laxo y una capa esponjosa de proteoglicanos y glicoproteínas.(Cabero y Saldivar, 2007).

El uso de cordón umbilical como una fuente para obtención de células madre mesenquimales, puede contribuir con futuras terapias celulares, anticancerígenas, y farmacológicas, así como crear bancos de células madre de cordón umbilical para el almacenamiento y mantenimiento de las mismas y de este modo ponerlas a disposición para estas terapias con el beneficio de seleccionar combinaciones antigénicas y promover la aceptación de los trasplantes celulares por el receptor (Ding y col., 2015).

4. Uso potencial de CMM en terapias celulares.

Actualmente se conoce que las CMM presentan una gran capacidad de biocompatibilidad al ser trasplantadas, esto se debe a sus características inmunológicas, las cuales incluyen una baja concentración de las moléculas del complejo de histocompatibilidad I (MHC I), así como también

ausencia de las moléculas MHC II y de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y/o CD40, todas estas moléculas son esenciales para activar las células T alógenas, y de esta forma se evita el rechazo del sistema inmunitario del huésped, ya que este no es activado. Otra característica a resaltar es que han demostrado que pueden suprimir la activación tanto de linfocitos de memoria como aquellos vírgenes, mediante la secreción de la prostaglandina E2 y la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), como también no solo logran actuar sobre los linfocitos T, si no también logran regular los linfocitos B, actuando sobre las fases G0/G1 del ciclo celular. En cuanto, a la respuesta inmune innata, las CMM presentan ligandos que activan las células con actividad citotóxica denominadas Natural Killer (NK), por ende estas pueden causar la lisis de las CMM, sin embargo, estas últimas presentan vías que afectan la proliferación, la actividad citotóxica, producción citoquímica de IL-2 y IL-5 (Encargadas de la proliferación de las NK), y de este modo logran una acción regulatoria sobre las NK. En relación con las otras células de inmunidad innata, las CMM también logran influir en las células dendríticas (Células Presentadoras de Antígenos profesionales), interfiriendo con los procesos de diferenciación y maduración (Jacobs y col., 2013). En base a todas estas características, entonces las CMM trasplantadas no producen rechazo allogénico, por lo cual las convierte en una de las opciones óptimas para su aplicación en terapia celular y tratamiento de enfermedades degenerativas (Ullah y col., 2015)

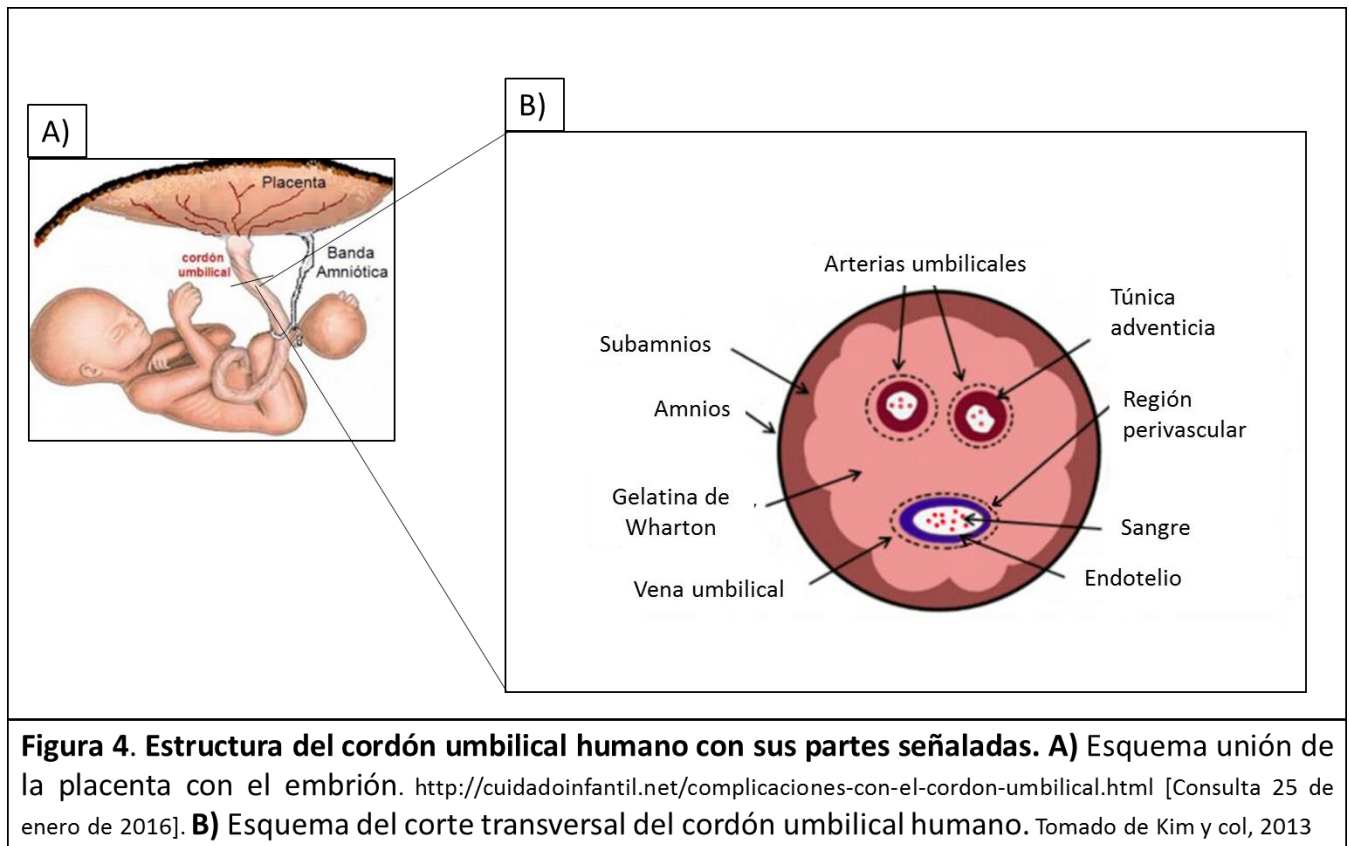


Figura 4. Estructura del cordón umbilical humano con sus partes señaladas. A) Esquema unión de la placenta con el embrión. <http://cuidadoinfantil.net/complicaciones-con-el-cordon-umbilical.html> [Consulta 25 de enero de 2016]. **B)** Esquema del corte transversal del cordón umbilical humano. Tomado de Kim y col, 2013

En este sentido, el cultivo de células madre mesenquimales ha abierto un nuevo mundo de posibilidades para realizar terapias celulares y terapias de tejidos, sin los problemas actuales ligados a los aloinjertos como escasez de donantes histocompatibles, necesidad de administrar drogas inmunosupresoras con sus efectos secundarios (http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/clonembrion.htm#_Toc3643836, consulta en línea 11/12/2015).

5. Corazón

El corazón es un órgano musculoso que se localiza en el tórax, el cual se compone de cuatro cámaras (tetracameral), y es el encargado de bombear la sangre oxigenada que llega directamente de los pulmones por la venas pulmonares entrando así al órgano por la aurícula izquierda pasando hacia el ventrículo izquierdo al resto del cuerpo por medio de la aorta (circulación sistémica); como también bombear la sangre proveniente de los tejidos donde se realiza el intercambio gaseoso que

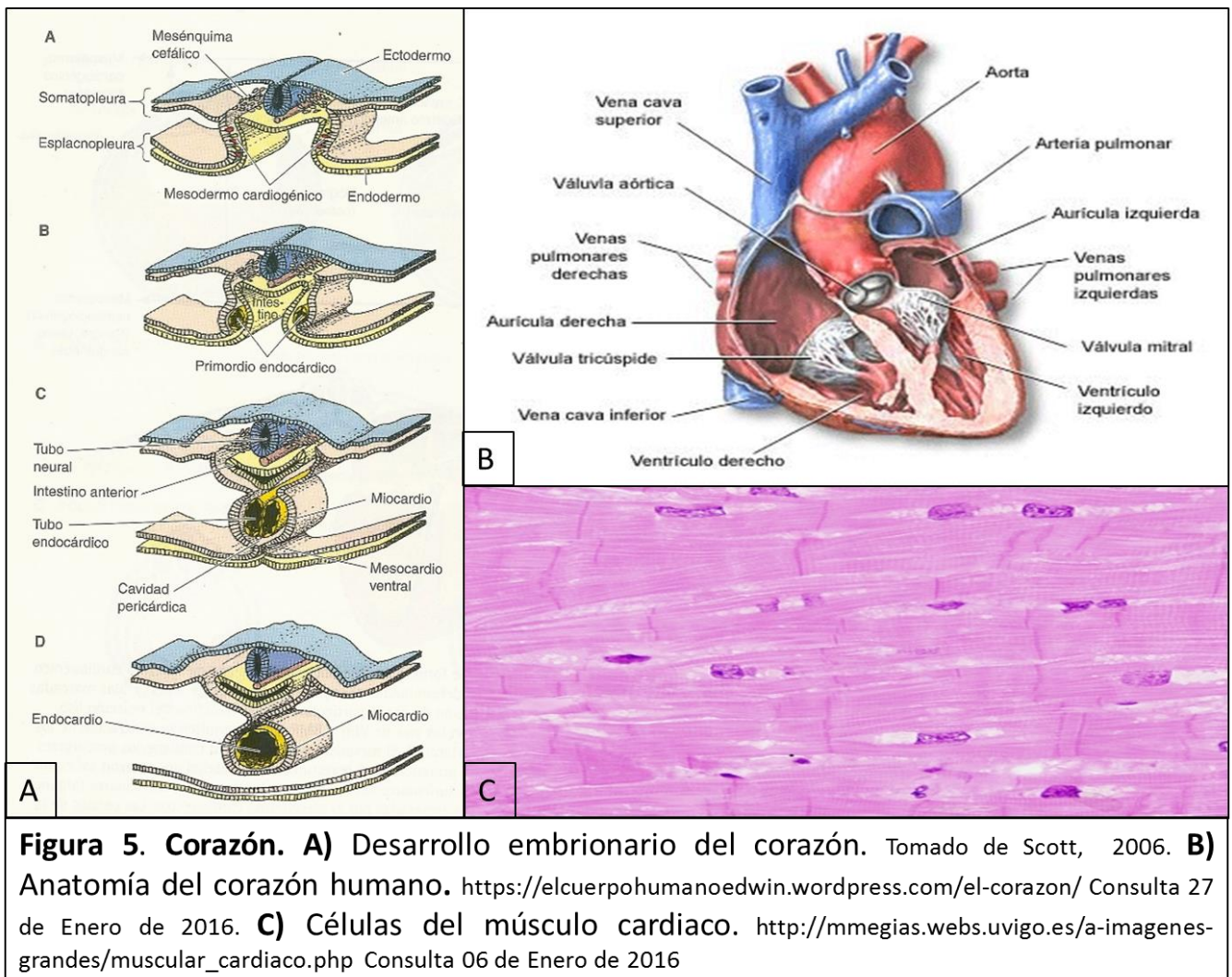
permite de este modo, la obtención de oxígeno de todas las células del cuerpo, hacia los pulmones dirigida al corazón mediante las venas cavas inferior y superior, entrando entonces al mismo por la aurícula derecha, pasando al ventrículo derecho y finalmente llegando a los pulmones a través de las arterias pulmonares (Fig. 5B) (Hickman y col., 2002).

Este órgano vital, conforma la primera unidad funcional en el embrión en desarrollo. En los vertebrados se origina del mesodermo cardiogénico que deriva de las láminas del mesodermo lateral donde la parte anterior va a ser la predecesora del mesodermo cardiogénico, que se relaciona con los tejidos adyacentes para ser especificada para el desarrollo cardiaco. Desde el mesodermo cardiogénico, donde se encuentran las células que formaran la musculatura auricular y ventricular, las células de las almohadillas de las válvulas, de las fibras de conducción de Purkinje y del revestimiento endotelial del corazón.

Las especificaciones celulares son inducidas por el endodermo por señalización de los factores BMP (Proteína Morfogenética de Hueso) y FGF (Factor de crecimiento de Fibroblasto) cuando las células cardiacas presuntivas se mueven a la parte anterior entre el ectodermo y el endodermo; una vez que alcanzan las paredes laterales del tubo digestivo anterior la migración se detiene. El intestino anterior se forma por el plegamiento hacia dentro del mesodermo esplácnico (mesodermo lateral), y en este movimiento se produce el acercamiento de los tubos cardiacos, dentro del tubo común que se forma posterior se encuentra dos endocardios pero luego estos se fusionan (Fig. 5A). Alrededor del endocardio encontraremos el mesodermo que generara el miocardio por medio de factor de transcripción Nkx2-5, que es el encargado de “instruir” al mesodermo para convertirse en tejido cardiaco activando las proteínas específicas del musculo cardiaco como actina cardiaca, factor natriurético auricular y las cadenas pesadas de α -miosina. El pericardio se forma cuando las células del mesodermo ventrales empiezan a expresar N-cadherina

sobre sus regiones apicales, separando de este modo el mesodermo dorsal y uniéndose el epicardio (Scott, 2006).

Dada la importancia que tiene el corazón, este es uno de los órganos de interés para aplicar terapias celulares con el fin de encontrar tratamientos efectivos para tratar varias de las enfermedades que lo afectan.



6. Los parámetros que regulan el microambiente celular como base para el planteamiento de técnicas de diferenciación.

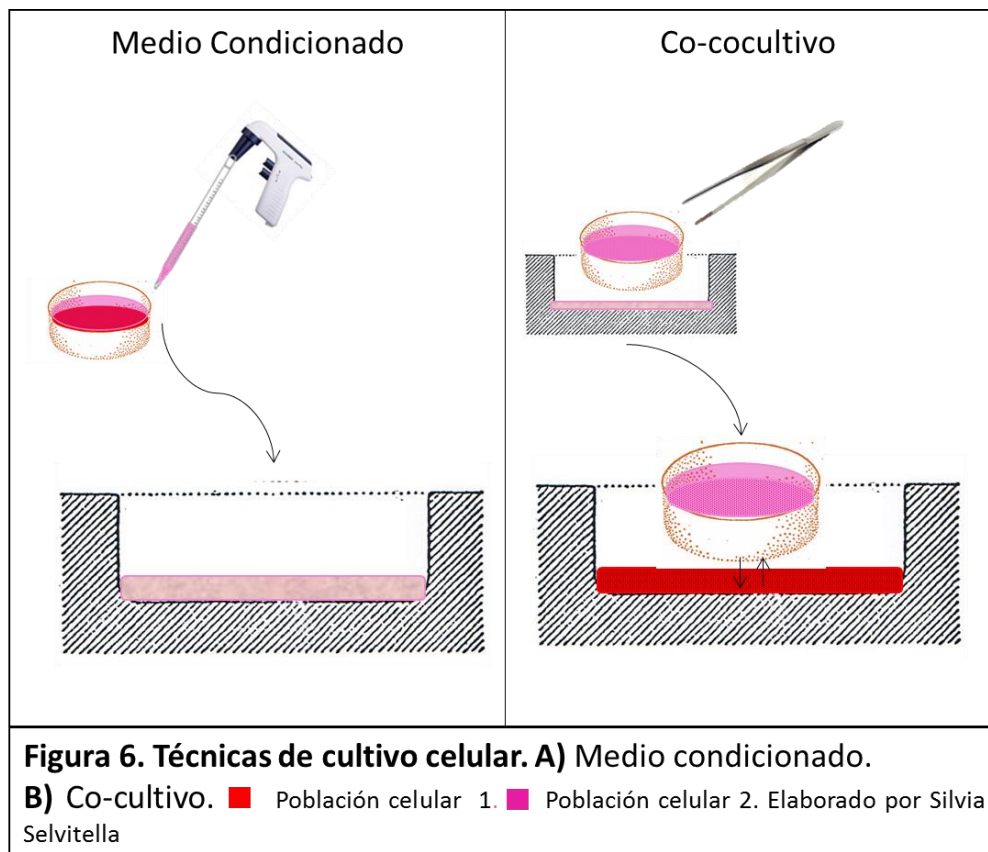
La diferenciación es el proceso mediante el cual se lleva a la expresión de propiedades fenotípicas características de la célula funcionalmente madura *in vivo*. Este proceso es el que se da

cuando una célula madre es dirigida hacia un linaje específico, dependiendo del nicho (*in vivo*) o del microambiente (*in vitro*) circundante en el que se encuentra. Como el nicho celular es el encargado de suministrar los factores que permiten el balance entre la proliferación y la diferenciación, este es altamente regulado en los tejidos *in vivo*, y en esta premisa es en la que se basa el proceso de diferenciación *in vitro*, al regular experimentalmente los parámetros que controlan el microambiente celular, tales como la interacción célula- célula, célula- matriz extracelular, tensión de oxígeno y factores sistémicos solubles fisiológicos y no fisiológicos, para dirigir la diferenciación hacia el linaje de interés (Freshney, 2010).

Eshghi y Schaffer en el 2008, plantean que es fundamental conocer como estos parámetros del microambiente afectan la determinación del destino final de las células madres, por lo tanto se deben diseñar modelos apropiados que controlan el destino y la función de éstas. Uno de los modelos que describen, es el uso de matrices extracelulares elaboradas a partir de biomateriales con capacidad de ligar factores, y de este modo aumentar la concentración de proteínas de interés que estimulan diferenciación, el cual se ha utilizado para la diferenciación neurogénica de células progenitoras neurales derivadas de células madre embrionarias, al cultivarlas en andamios de fibronectina previamente tratados con los factores neurotrofina 3 (NT-3), Sonic hedgehog(Shh) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Willerth y col., 2008). También exponen la importancia de la matriz extracelular (MEC) en el microambiente y como afectan a la diferenciación celular, tanto al ser substrato adhesivo, y afectar por ejemplo la capacidad de autorenovación de las células madre germinales de *Drosophila* al modificar su nicho celular (Tanentzapf y col., 2007 citado por Eshghi y Schaffer, 2008) además provee señales instructivas que determinan el destino celular, como en la eritropoyesis donde la unión del progenitor eritroide a la MEC de fibronectina es necesaria para la proliferación *in vitro* (Eshghi y col., 2007 citado por Eshghi y Schaffer, 2008).

Asimismo, parámetros tales como la interacción directa célula- célula y la tensión de oxígeno tiene efectos importantes en la diferenciación condrogénica, demostrado por Cao y col., en el 2015, quienes cultivan CMM en micropatrones que permiten determinan la cantidad de células que se siembran, y consiguen un aumento de la diferenciación condrogénica a medida que incrementa el número de células por consecuencia mayores interacciones célula- célula. Al mismo tiempo, consiguen que en condiciones de hipoxia (Baja tensión de oxígeno) aumenta la diferenciación condrogénica.

En la actualidad unas de las técnicas que se aplican para inducir la diferenciación de células madres son el uso de medios condicionados y co-cultivos (Figura 6). La primera técnica se refiere al uso del medio donde las células ya han sido cultivadas, aunque algunos componentes se encuentren parcialmente agotados, este se encuentra enriquecido en factores derivados de las células previamente cultivadas (<http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803095631131> consulta en línea 03/01/2016) que promueven la diferenciación hacia el linaje de interés; y la segunda, se refiere a un sistema de cultivo celular, en el cual dos o más poblaciones celulares diferentes crecen con cierto grado de contacto entre ellas (Goers y col., 2014), generando de este modo un microambiente *in vitro* específico para lograr la canalización de la diferenciación hacia un linaje específico que de alguna manera brinda características similares al tejido *in vivo*. Esto ha sido evidenciado en los resultados presentados por Stecklum y col, en el 2015, quien induce a una diferenciación endodérmica temprana de células madres de la sangre del cordón umbilical humano a través del contacto célula- célula mediante el establecimiento de co-cultivos con células hepáticas murinas de hígado de ratones 12 (AML12), así como por medio de factores solubles a partir del uso de medios condicionados obtenidos de la misma línea celular, estos autores encontraron que es más efectivo con el sistema de co-cultivos.



En base a lo que se ha planteado, se espera obtener la diferenciación de las células madre mesenquimales obtenidas desde el cordón umbilical humano hacia un linaje cardiomiogénico mediante el uso de medios condicionados y el establecimiento de sistemas de co-cultivo con cardiomiocitos. Estos modelos *in vitro* permiten analizar mecanismos efectivos para la diferenciación cardíaca. Aunque en los últimos años se han logrado avances en el tratamiento de enfermedades cardíacas, tales como la isquemia e infartos en el miocardio, con CMM trasplantadas directamente al corazón (Shen y colaboradores, 2015), estos tratamientos podrían ser más efectivos si se utilizan las CMM cuando han sido inducidas o completamente diferenciadas al linajes cardíaco, evitando así que las CMM se diferencien a otros linajes y de este modo se podría contribuir con futuras terapias celulares en medicina regenerativa de un órgano vital como lo es el corazón.

2. ANTECEDENTES

Las células madre adultas de mayor interés son las células madre mesenquimales, éstas pueden ser extraídas de diversas fuentes, tales como el estroma de la medula ósea, definida por primera vez por Friedstein y col. en 1974, quienes denominan a las CMM como unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F), ya que consistían en una población de células adherentes capaces de autorrenovarse y diferenciarse hacia linajes de origen mesodérmico.

Se ha analizado y discutido la naturaleza, biología y potencialidad de las células madre mesenquimales de la medula ósea y se ha planteado que esta población heterogénea tiene la potencialidad de diferenciarse a los linajes típicos, tales como óseo, condrogénico y adipogénico, tanto como hacia otros linajes tales como miogénico y neural (Bianco y col., 2001; Gronthos y col., 2003).

En la última década se han conseguido fuentes alternativas para la obtención de CMM distintas a la medula ósea. Entre éstas se encuentra la decídua de la placenta y el líquido amniótico, en la cual las CMM son de origen fetal y se encuentran en mayor cantidad en el segundo semestre de embarazo (Anker y col., 2004). Asimismo, también se han extraído CMM del tejido adiposo obtenido por procesos quirúrgicos, los cuales requieren de anestesia (Izadpanah y col., 2006), o por liposucción (Kern y col., 2006). Todos los procesos que se utilizan para la obtención de las fuentes anteriormente dichas para el aislamiento de las CMM involucran procedimientos invasivos y que pueden poner en riesgo la salud de los donantes, mientras que el cordón umbilical humano es una fuente alternativa rica en CMM que presenta la ventaja de ser un material de descarte luego del parto. Además, se ha observado que esta fuente no presenta características de senescencia hasta el 12avo pasaje, a diferencia de las otras fuentes como el tejido adiposo y la medula ósea que

mantuvieron sus características solo hasta el 8vo pasaje y 5to pasaje respectivamente (Merentes, 2009).

En este sentido, se han aislado CMM del cordón umbilical humano (CUH), a partir de la región subendotelial de los vasos (Romanov y col., 2003), de la gelatina de Wharton (Wang y col., 2004; Karahuseyinoglu y col., 2007), así como de las células perivasculares de las arterias y de la vena umbilical (Baksh y col., 2007).

Otros investigadores han obtenido un buen rendimiento cuando utilizan el CUH en su totalidad por disgregación mecánica (Quiao y col., 2008), mediante explantes (Calderón, 2007; Araos, 2009; Merentes, 2009), o por disgregación enzimática (Lu y col., 2006). Inclusive se ha logrado determinar la presencia de poblaciones de CMM en la sangre del CUH además de las células madre hematopoyéticas (Bieback y col., 2004; Kern y col., 2006).

En relación a la potencialidad de diferenciación de las CMM extraídas de los diferentes compartimientos que componen el CUH, se ha podido determinar que pueden diferenciarse hacia los linajes óseo, condrogénico y adiposo corroborándose por la presencia de la fosfatasa alcalina, por la presencia de colágeno tipo II y por la reacción de las vacuolas lipídicas con el colorante aceite rojo respectivamente. Además de cumplir con los marcadores fenotípicos clásicos de CMM (CD44⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻); y mostrar también la morfología fibroblástica característica encontrada (Bieback y col., 2004; Wang y col., 2004; Lu y col., 2006; Karahuseyinoglu y col., 2007 y Baksh, 2007). Se ha demostrado inclusive la capacidad de diferenciación hacia los linajes neurales (Karahuseyinoglu y col., 2007) así como también al linaje cardiomiogénico (Wang y col., 2004) y muscular mediante el uso de medios condicionados (Calderón, 2007) e hidrocortisona respectivamente (Merentes, 2009).

Por su parte, las CMM de la médula ósea tienen la potencialidad de diferenciación cardiomiogénica *in vivo* cuando son trasplantadas directamente al ventrículo izquierdo de ratones

“knock out”, evidenciándose que hay un movimiento migratorio de las CMM y posteriormente transcurridos sesenta días se consiguen marcadores cardiacos específicos (Troponina I, α actinina) que son expresados en las CMM que han sido transplantadas (Toma y col., 2002).

Igualmente Kawada y sus colaboradores (2004) comprueban que al aplicar las células extraídas de la médula ósea en tejidos cardiacos, a los cuales se le han inducido un infarto, hay un proceso de regeneración de cardiomiocitos principalmente por acción de las CMM y que raramente esto depende de células madre hematopoyéticas que ahí se encuentran.

Asimismo se han utilizado células madre embrionarias (CME) en la inducción cardiomiogénica, mediante el uso de un sistema de co-cultivos con células del endodermo visceral (END-2), ya que este presenta un papel importante en el desarrollo embrionario del musculo cardiaco. Demostrando que las células inducidas por esta técnica poseen la capacidad de restauración de la función cardiaca a través de un modelo “in vivo” de infarto miocárdico, inyectando las células que obtuvieron en la diferenciación celular a ratones, a los cuales se les indujo un infarto cardiaco y posteriormente se evaluó la sobrevivencia de estos. (Mummery y col., 2002; Mummery y col., 2003)

Se han logrado diferenciar células madre mesenquimales del tejido adiposo de conejo hacia tejido cardiaco utilizando el compuesto 5- azacitidina, el cual disminuye la expresión de proteínas asociadas al estado indiferenciado mientras que activa la diferenciación mediante la vía de señalización ERK, que promueve la activación del factor de transcripción transductor de señal y del activador de transcripción 3 (STAT3) que interactúan con la proteína MyoD, que regula la diferenciación miogénica teniendo también un efecto en el factor potenciador de miocitos (MEF2) (Qian y col., 2012), de esta manera se logra obtener cardiomiocitos que expresan marcadores

positivos característicos del fenotipo cardíaco tales como miosina cardíaca, α -actina y troponina I. (Rangappa y col., 2003)

Wang y col. (2004) también utilizan el tratamiento con el compuesto azacitidina, pero usando cultivos de CMM con medio condicionado de cardiomiocitos; logrando posteriormente resultados positivos para la diferenciación cardiomiogénica. En este mismo año, Xu y colaboradores (2004), realizan la diferenciación *in vitro* de CMM de la medula ósea al fenotipo cardíaco utilizando un medio suplementado con 5-azacitidina y añadiendo bFGF (factor de crecimiento básico de fibroblastos) por 24 horas, posteriormente usan solo medio suplementado solo con bFGF. Estos autores lograron observar en el cultivo un cambio de forma gradual al fenotipo cardíaco (Organización sarcomérica y contracciones espontáneas) y finalmente las células obtenidas se mostraron positivas para los marcadores cardíacos α -actina y desmina.

Se ha demostrado que uno de los mecanismos que promueve la diferenciación cardíaca de células progenitoras es a través de la vía de señalización Wnt, mediante las proteínas Wnt3A y Wnt11 que regulan la cardiomiogénesis. En este sentido, Koyanagi y col., en el 2005 utilizan medios condicionados con estas proteínas encontrando que la proteína Wnt11 es la que participa en la vía de señalización Wnt a través de la enzima proteína quinasa C (PKC), que fosforila ciertas proteínas para activarlas o desactivarlas, y de este modo promueve la diferenciación cardíaca.

Passier y colaboradores (2005) realizan co-cultivos de células madre embrionarias con células endoteliales en medio DMEM, variando la concentración de suero fetal de bovino (SFB) desde 0% a 20%, donde consiguen que existe un aumento de la diferenciación cardiomiogénica en cultivos libres de suero, es decir, observaron un aumento de la expresión de los genes cardíacos en aquellos cultivos sin suero en comparación con aquellos cultivos que tenían algún porcentaje de SFB.

Plotnikov y colaboradores (2007) realizaron co-cultivos de células madre mesenquimales, extraídas de médula ósea de fetos de rata, con cardiomiocitos obtenidos del corazón de embriones de rata de 15- 17 días de gestación, donde observaron la formación de estructuras intracelulares ultrafinas entre ambas poblaciones celulares, que denominaron nanotubos de canalización formados por uniones del tipo GAP.

Algunos investigadores han usado medios condicionados provenientes de válvulas del miocardio del corazón humano para inducir células madres mesenquimales de la médula ósea hacia la diferenciación morfológica temprana cardíaca. Además se han caracterizado estos medios y encontraron que contenía una gran cantidad de citoquinas (IL6, IL8, GRO, MCP-1) factores de crecimiento (Factor de crecimiento básico de fibroblastos (bGFG), Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento hepático (HGF), Factor de crecimiento de enlazamiento de proteínas tipo insulina 1 y 2 (IGFBP-1 y IGFBP-2) y Factor de crecimiento transformante beta (TGF β), además proteínas estructurales (Proteína cardíaca de unión de miosina C (cMyBP-C) y α actinina y proteínas metabólicas (Triosa fosfato isomerasa y malato deshidrogenasa) las cuales poseen un efecto determinante en la diferenciación cardíaca (Schittini y col., 2010)

Recientemente Zhang y col. (2012) utilizaron células madre pluripotentes inducidas (IPC) y células madre embrionarias en cultivos con matrigel, organizadas en una forma de sandwich (Matrigel-CM-Matrigel), con factores de crecimiento claves (Activina A, Proteína morfogenética de hueso 4 (BMP4) y bGFG); para obtener una población heterogénea de células contráctiles que presentan diferentes patrones de expresión de miofilamentos, actividad mitótica y propiedades electrofisiológicas, los autores relacionan esto con las poblaciones celulares ubicadas en las diferentes regiones que componen el corazón, que poseen características contráctiles diferentes. Igualmente, Hernández y col (2015) generaron cuerpos embrionarios a partir de IPC y los indujeron a

linaje cardiaco a través de estimulación eléctrica directa. Las colonias contráctiles obtenidas a los 14 días expresaban proteínas contráctiles tales como Troponina T, α -actina sarcomérica, y la cadena pesada miosina, además de presentar electrocardiogramas característicos del latido cardiaco con respuestas a estimulación adrenérgica y muscarínica.

Recientemente se ha podido demostrar que la heparina en medios libres de albumina, promueve la diferenciación cardiaca de las IPC, ya que esta afecta la vía de señalización Wnt y además estimula el FGF, los cuales están involucrados en el proceso de diferenciación cardiomiogénica (Lin y col., 2016)

3. JUSTIFICACIÓN

Las células madre mesenquimales tienen la capacidad de diferenciación hacia diversos linajes celulares, estas propiedades han abierto un campo de posibilidades de investigación con un potencial uso para realizar ensayos farmacológicos, utilizarlas como fuente de diversos tipos de células para la bioingeniería e inclusive el tratamiento de enfermedades debido a sus propiedades inmunomodulatorias cuando son trasplantadas para evitar el rechazo inmunológico. En vista de la importancia de las CMM y su potencialidad de diferenciación, se han buscado fuentes óptimas para el aislamiento de estas células, siendo uno de estas fuentes el CUH, el cual se puede obtener sin necesidad de procesos invasivos, a diferencia de otras fuentes de CMM.

Una de las enfermedades que presentan una alta mortalidad debido a que no existen tratamientos eficaces que puedan aplicarse cuando el miocardio pierde su funcionalidad o sufre muerte celular, son los infartos e isquemias agudas en el miocardio. De acuerdo con esto, se ha evaluado el uso de las CMM, principalmente de la medula ósea, en el tratamiento de estas enfermedades, encontrándose resultados positivos en muchos casos. Sin embargo, las células madre mesenquimales trasplantadas directamente al corazón no sobreviven mucho tiempo, por lo tanto los efectos positivos que se observan vienen dados por vía paracrina, ya que generan factores que aumentan el metabolismo de la glucosa y promueven la función cardiaca, pero no hay una recuperación de la zona directamente afectada.

En este sentido, con un protocolo de inducción a la diferenciación cardiomiogénica de CMM, se evaluó su potencialidad de diferenciación cardiaca mediante técnicas sencillas y no tan costosas, como lo son los medios condicionados y los sistemas de co-cultivo, con el fin de utilizar en un futuro estas metodologías para la obtención de cardiomiocitos inducidos que puedan servir para el tratamiento de las enfermedades que afectan al miocardio con una recuperación de tejido muscular.

4. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar la diferenciación cardiomiogénica de las células madre mesenquimales del cordón umbilical humano.

2. Objetivos específicos

- 1)** Aislar células madre mesenquimales del cordón umbilical humano y caracterizar morfológicamente la población de células madre mesenquimales aisladas
- 2)** Aislar cardiomiocitos de fetos de ratón y obtener medios condicionados a partir de los cultivos de cardiomiocitos.
- 3)** Ensayar métodos inductores de la diferenciación cardíaca “in vitro” de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano.
- 4)** Evaluar la diferenciación hacia linaje cardiomiogénico.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material Biológico

Para la obtención de los cordones umbilicales humanos se utilizaron placentas obtenidas de cesáreas electivas a mujeres sanas bajo consentimiento informado, con un embarazo normal y controlado, sin patologías placentarias y con pruebas serológicas negativas (Virus de inmunodeficiencia Adquirida – VIH, Hepatitis B- HBV, Hepatitis C- HCV y sífilis)

2. Obtención y transporte del material biológico

Una vez extraída la placenta con el segmento del cordón umbilical, esta se recolectó y almacenó en un envase plástico previamente esterilizado e inmediatamente se transportó al Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología Experimental (IBE) en un cava con hielo a una temperatura aproximada de 4°C.

Posteriormente en una campana de flujo laminar horizontal se cortó el cordón umbilical de la placenta y a su vez se cortó en varias secciones, a las cuales se les realizaron varios lavados con solución buffer fosfato (PBS) hasta lograr eliminar la mayor cantidad de sangre posible. Una vez limpias las secciones, se tomó la mitad de ellas y se colocaron en un envase con medio F12 (GIBCO) suplementado con 2% de una mezcla de antibióticos y antimicóticos (Penicilina 200 UND/mL, Estreptomina 100µg/mL, Anfotericina B 5µg/mL) para mantener la viabilidad del tejido y evitar su contaminación. Mientras que el resto de la secciones se colocaron en una mezcla de la enzima 1,2 U/mL Dispasa II (GIBCO) en base de medio HAM- F12 (GIBCO) a 4°C. El tejido se procesó en un tiempo no mayor a 48 horas ya que las poblaciones celulares pierden la viabilidad una vez que transcurre este tiempo.

3. Cultivos celulares

3.1 Obtención y establecimiento del cultivo primario de las células madre mesenquimales del cordón umbilical humano

Se utilizaron dos estrategias para el establecimiento del cultivo primario de CMM, por la técnica de explantes y por disgregación enzimática con una combinación de enzimas.

3.1.1 Obtención de las células madre mesenquimales por la técnica de explantes

Las secciones del cordón umbilical se lavaron dos veces con PBS, posteriormente, se cortaron con ayuda de una tijera a través de la vena para de esta forma exponer el interior del cordón umbilical, de cual se extrajeron las arterias y la gelatina de Wharton con ayuda de tijeras y pinzas. Una vez obtenidas las arterias y la gelatina, se llevó a cabo una disgregación mecánica hasta obtener trozos de aproximadamente 2mm, los cuales se colocaron equidistantes en placas de Petri previamente identificadas, donde luego de su adhesión a la placa, se agregó una mezcla de medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM-GIBCO) y medio F12 (GIBCO) en una proporción 3:1, suplementado con 15% de Suero Fetal de Bovino (SFB-GIBCO), con 1% de una mezcla de antibióticos y antimicótico (100 U/mL Penicilina, 50µg/mL estreptomina y 2µg/mL anfotericina) y 2mM Glutamina, al cual denominamos **mDMEM-F12** y posteriormente se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% CO₂. Pasadas 24 horas, se realizó un lavado con PBS y se sustituyó el medio para de esta forma eliminar los restos celulares. Luego se realizaron cambios de medios periódicamente.

3.1.2 Aislamiento de células madre mesenquimales por disgregación enzimática seriada con Dispasa, Tripsina: EDTA y Colagenasa II.

Para aislar las CMM del CUH se utilizó una combinación de enzimas. Primero se aplicará la Dispasa II que actúa a nivel de la membrana basal del epitelio de recubrimiento del CUH, pudiendo separar las células epiteliales y las células mesenquimales provenientes del subamnios. Seguidamente se usó la tripsina: EDTA y la enzima colagenasa II pudiendo separar las CMM de la Gelatina de Wharton.

A continuación describimos en detalle la metodología: las secciones se incubaron durante 18 horas a 4°C sin agitación en la mezcla de la enzima Dispasa II anteriormente especificada. Una vez transcurrido este tiempo, las secciones del tejido se transfirieron a una placa de Petri donde se cortaron asépticamente a través de la vena umbilical bajo la campana de flujo laminar vertical. Luego con ayuda de un rastrillo se realizó un raspado a los trozos de cordón umbilical mediante el cual se obtuvieron células epiteliales y CMM, las cuales se resuspendieron en PBS y se centrifugaron en frío a 3500 rpm. El taco celular obtenido se resuspendió en medio mDMEM-F12, se sembró en placas previamente cubiertas con gelatina y posteriormente se incubó a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% CO₂.

Las fracciones restantes del raspado del cordón umbilical humano, se les extrajo una porción de la Gelatina de Wharton, las cuales se disgregaron mecánicamente con ayuda de tijeras y posteriormente se colocaron en una mezcla de 0,05% Tripsina (GIBCO): 0.02% EDTA (SIGMA) en una proporción 1:4 por 30 minutos con agitación continua. Transcurrido los 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y se prosiguió a agregar a los segmentos de Gelatina de Wharton del CUH la enzima Colagenasa tipo II (GIBCO) (Actividad Enzimática: 268 UND/mg) preparada a una concentración de 1mg/mL en medio F12 suplementada con 5% de SFB con agitación continúa por aproximadamente una hora, luego se eliminó el sobrenadante y se

prosiguió a agregar nuevamente la enzima Colagenasa tipo II preparada en medio F12 suplementada con 5% de SFB a los trozos restantes, sometiéndose de esta forma a su acción nuevamente por 30 minutos más con agitación continua. Luego se extrajo el sobrenadante y se centrifugó en frío a 3500 rpm.

El taco celular obtenido se resuspendió en medio mDMEM-F12, se evaluó la viabilidad celular con el uso del colorante de exclusión azul de tripano, como también se realizó un conteo celular utilizando hemocitómetro. Posteriormente las células se sembraron e incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda al 5% CO₂.

Se realizaron cambios de medio a los cultivos establecidos de forma periódica y en el caso de observar restos celulares, se realizaron lavados con PBS previos a colocar el medio fresco.

3.2 Subcultivos

Cuando las placas o frascos alcanzaron la confluencia, se realizaron los subcultivos. Para esto, se realizó la tripsinización, utilizando una mezcla de 0,125% tripsina (GIBCO) - 0,02% EDTA (SIGMA).

La suspensión celular obtenida se centrifugó por 5 minutos a 2500 rpm y se sembraron en placas o frascos según la cantidad de células. El subcultivo celular se incubó con medio nutritivo mDMEM-F12 a 37°C y en una atmósfera húmeda al 5% de CO₂.

3.3 Establecimiento del cultivo primario de cardiomiocitos a partir de corazones de fetos de ratón de 17- 19 días de gestación.

Se extrajeron los fetos de una hembra de ratón de entre 16-19 días de gestación, la cual se sacrificó mediante dislocación cervical para evitar el uso de químicos o sustancias que

pueden afectar las células de interés. Una vez extraídos los fetos, estos se separaron de la placenta y extrajeron los corazones con ayuda de tijeras y pinzas finas, los cuales se mantuvieron en una solución de PBS con glucosa. Los corazones dependiendo del tamaño se utilizaron directamente como explantes o se realizó una disgregación mecánica previa a la colocación en placas de 35mm. Una vez transcurridos 5 minutos para permitir que ocurra el proceso de adhesión se agregó a estos explantes medio DMEM (GIBCO) con F12 (GIBCO) (3:1) suplementado con 5% de SFB, 1% de la mezcla de antibióticos y antimicóticos (100 U/mL Penicilina, 50µg/mL estreptomina y 2µg/mL anfotericina), 2mM Glutamina, el cual denominamos **cdMEM-F12**. Este medio se cambió de forma periódica para lograr mantener la viabilidad de las células.

4. Inducción cardiomiogénica

Una vez obtenidas las poblaciones tanto de CMM del CUH como de los cardiomiocitos de corazones de fetos de ratón se prosiguió a establecer los ensayos para inducir la diferenciación hacia linaje cardíaco, que incluyen el uso de medios condicionados y el establecimiento de sistemas de co-cultivos (Fig. 5).

4.1 Obtención y aplicación del medio condicionado

El medio condicionado se obtuvo de los cultivos primarios confluentes de los cardiomiocitos de fetos de ratón, el cual se filtró a través de filtros para jeringas cuya porosidad es 0.2 micras, para eliminar restos celulares. Una vez filtrado el medio condicionado se mantuvo a -20 °C hasta su posterior uso.

Al momento de su uso, el medio condicionado se mezcló con medio fresco cDMEM-F12 en una proporción 1:1 y se agregó a las células madre mesenquimales aisladas de CUH. El control negativo se realizó con CMM mantenidas en medio nutritivo. El medio condicionado se cambió de forma periódica según los requerimientos de las células.

4.2 Establecimiento de los sistemas de co-cultivos

Una de las formas de realizar un co-cultivo es a través del uso de insertos, estos consisten en un soporte plástico con una membrana de tamaño de poro variable que puede ser policarbonato, poliéster o politetrafluoroetileno que puede o no estar cubierto de colágeno, los cuales separan un tipo celular de otro pero permiten el paso de sustancias y factores de una población celular a la otras, reproduciendo de mejor forma los compartimientos celulares de los tejidos in vivo (Corning, 2013).

En este sentido, se cultivaron las células cardíacas obtenidas en placas de 35mm, y simultáneamente se cultivaron CMM en los insertos de co-cultivo (NUNC), de una porosidad de 3 μm . Posteriormente se transfirieron los insertos con las CMM a las placas que contenían los cardiomiocitos de ratón.

Para el control negativo se estableció un sistema de co-cultivo de CMM con CMM. A los sistemas de co-cultivos se le realizó cambio de medio periódicamente.

5. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica

5.1 Caracterización de las células madre mesenquimales.

La caracterización morfológica se realizó mediante la coloración histológica de rutina May- Grünwald-Giemsa y Hematoxilina- eosina a las placas y/o frascos donde se mantuvieron en cultivo las CMM. Estas coloraciones poseen un componente basófilo y eosínfilo, por cual tienen afinidad por el núcleo y el citoplasma respectivamente (Gartnert y Hiatt, 2002; <http://www.histalim.com/accueil/activities/our-services/histology/may-grunwald-giemsa> [Consulta en línea 08/10/2016]), delimitando mejor tanto la morfología celular como la nuclear.

Las células se caracterizaron inmunocitoquímicamente, permitiendo de este modo determinar la expresión de ciertas proteínas consideradas como marcadores moleculares específicos para un fenotipo celular, utilizando como marcador molecular el anticuerpo monoclonal contra la proteína vimentina. Esta proteína es específica para células mesenquimales, presentado un papel muy importante en el anclaje de las organelas y la morfología celular. El revelado del marcaje se realizó utilizando el kit universal LSAB2, HRP (Santa Cruz), cuyo principio se basa en la interacción de estreptavidina- biotina. La reacción final se reveló con una solución de Diaminobencidina (DAB) al 0,05 %.

Los registros fotográficos se tomaron en el microscopio de contraste invertido de fase (Olympus IX50) y el uso de cámaras a través del ocular del microscopio.

5.2 Cardiomiocitos y células inducidas mediante el uso de medios condicionados y sistemas de co-cultivos.

Los cardiomiocitos obtenidos se caracterizaron morfológicamente con tinciones de rutinas May- Grünwald- Giemsa y Hematoxilina-eosina, además histoquímicamente a través de la coloración hematoxilina ácida fosfotúngstica (PTAH) que es utilizada para observar las

estriaciones musculares (<https://www.urmc.rochester.edu/urmc-labs/pathology/stainsmanual/index.html?MICROWAVEMALLORYSPHOSPHOTUNGSTICACIDHEMATOXYLINMETHODPTAH> [Consulta 03/10/2016]), ya que esta reacciona con los componentes musculares y de colágeno a través de un mordiente de tungsteno que es provisto por el ácido fosfontungstico, el cual une la hematinas que se encuentran en la hematoxilina, coloreando de azul estos componentes (https://www.labce.com/spg531616_phosphotungstic_acid_hematoxylin_ptah_staining___c.aspx [Consulta en línea: 09/10/2016]). La caracterización inmunocitoquímica se llevó a cabo mediante la reacción ante el anticuerpo Desmina, la cual posteriormente se reveló con el kit universal LSAB2, HRP (Santa Cruz) (ver sección Caracterización de las Células Madre Mesenquimales)

Los registros fotográficos se tomaron a través del microscopio de contraste invertido de fase (Olympus IX50) a los diferentes tiempos del cultivo.

5.3 Estudio histológicos de los agregados formados en los sistemas de co-cultivo.

Los agregados celulares obtenidos se fijaron en formol al 10% y fueron posteriormente deshidratados en una batería creciente de etanol. Luego fueron incluidos en parafina y cortados en secciones de 3µm de espesor en un micrótopo. Para su observación al microscopio se colorearon con PTAH.

5.4 Análisis electroforético en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Con el fin de realizar una comparación de la composición proteica de las CMM inducidas con respecto a las CMM aisladas del CUH y proteínas obtenidas de cardiomiocitos, se realizó una corrida electroforética en geles de poliacrilamida al 10% (Laemmli, 1970).

Primero se obtuvieron muestras de CMM, CMM inducidas y de cardiomiocitos provenientes de los cultivos establecidos y del corazón de rata. Estas muestras se lavaron con 3 cambios de PBS, y se lisaron con ayuda de un homogeneizador, con el cual se realizaron doscientos pases. Posteriormente se centrifugó y se evaluaron las proteínas presentes en el sobrenadante obtenido mediante una corrida electroforética a voltaje constante (200V).

Para la identificación de las proteínas, los geles obtenidos se colorearon mediante una coloración de plata (Merril y col., 1982) con el fin de observar la distribución de las bandas y se les tomaron registros fotográficos para su análisis. Para ello, se realizó una curva de calibración (Anexo 1) entre la distancia recorrida por los marcadores de peso molecular y el peso molecular de los mismo (25 KDa, 50KDa, 75KDa, 150 KDa y 250 KDa), con el fin de encontrar el peso molecular de las bandas de los perfiles proteicos de las CMM, las células inducidas y de las proteínas cardiacas. El peso molecular encontrado para cada banda se presenta en el anexo 2.

6. RESULTADOS

1. Establecimiento de los cultivos de células madres mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano.

Se procesaron un total de 7 muestras de cordones umbilicales humanos, de los cuales, se lograron aislar poblaciones celulares de 5 de ellos, mediante las diversas técnicas aplicadas. Por medio de la técnica de los explantes se lograron aislar células madres mesenquimales de una de las muestras de CUH, específicamente de los explantes establecidos de las arterias del cordón umbilical, lo cual se puede apreciar en la figura 7, donde a los 3 días de cultivo (Fig. 7A), los explantes se habían adherido en su totalidad y se mantenían viables, ya estaban presentes unas células con morfología fusiforme aisladas que migraban del explante (Fig. 7B). A los 10 días de cultivo de los explantes, ya se logra apreciar un halo de irradiación compuesto de células fusiformes bien definidas, las cuales presentan un núcleo central definido y se organizan paralelamente en la monocapa. Una vez alcanzados los 21 días, estas mantienen sus características, sin embargo no llegan a alcanzar la confluencia (Fig. 7D), por lo que no se realizaron subcultivos.

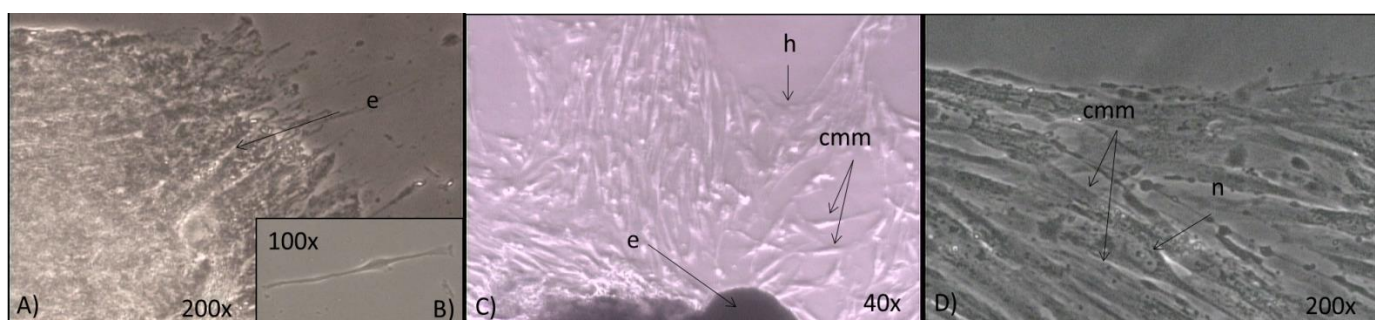


Figura 7. Poblaciones celulares aisladas mediante la técnica de los explantes observadas en el microscopio de contraste de fases. A) Explante (e) a los 3 días de cultivo. **B)** Detalle de célula madre mesenquimal. 3 días de cultivo. **C)** Irradiación de la CMM desde el explante (e) formando un halo de crecimiento (h) a los 10 días de cultivo. **D)** Detalle de las CMM (cmm) a los 21 días de cultivo donde podemos observar los nucleos (n).

Otra técnica que se utilizó, fue el denudado del epitelio de recubrimiento del CUH con la enzima Dispasa (Fig. 8), de la cual se obtuvo una población heterogénea de células de 5 muestras de CUH, donde se aprecian al menos dos morfologías diferentes, una de ellas corresponde a la morfología ahusada alargada (Fig. 8C), característica de las CMM, y la otra corresponde a una morfología poligonal típica de las células epiteliales; en ambos casos se aprecia un núcleo central bien definido (Fig. 8A, 8B). Mediante esta técnica se logró alcanzar la confluencia aproximadamente a las dos semanas de cultivo, lo cual se aprecia en la figura 8D, donde se aprecia el arreglo paralelo de las CMM una vez que se forma la monocapa sin presentar espacio entre las células que la conforman. Una vez que se alcanzó la confluencia se realizaron aproximadamente de 5 a 6 subcultivos, y en todos los casos las células mantuvieron sus características morfológicas sin rasgos de senescencia.

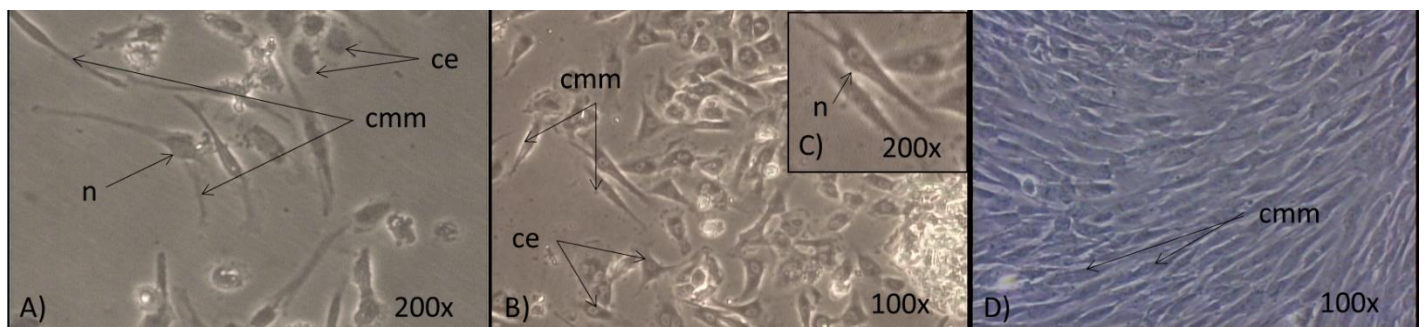


Figura 8. Poblaciones celulares aisladas mediante el denudado del epitelio de revestimiento del CUH con la enzima Dispasa observadas en el microscopio de contraste de fases. A) CMM (cmm) y células epiteliales (ce) a los 2 días de cultivo. **B)** Población heterogénea aislada de CUH a los 10 días de cultivo compuesta por dos tipos de células. **C)** Detalle de las CMM aisladas mediante esta técnica a los 10 días en la cuales podemos apreciar sus núcleos (n). **D)** Monocapa confluyente alcanzada a los 14 días de cultivo.

Mediante el uso de la técnica de disgregación enzimática de la Gelatina de Wharton a través del uso de las enzimas Tripsina-EDTA y de la colagenasa II (Fig. 9), también se lograron aislar poblaciones celulares de CMM a partir de 5 cordones umbilicales. Ésta población presentó dos morfotipos celulares (Fig.9A y 9C), uno de ellos presenta un amplio volumen de citoplasma con algunas extensiones citoplasmáticas delgadas (Fig. 9B) y el otro morfotipo corresponde a las

células fusiformes clásicas. La confluencia para este caso, se alcanzó cerca de los 12 días, formando la monocapa típica con un arreglo paralelo de las CMM y en donde ya no se aprecia el morfotipo de citoplasma ancho. Igualmente se realizaron luego de alcanzar la confluencia un promedio de 5 a 6 pasajes, en los cuales las células mantuvieron su fenotipo celular.

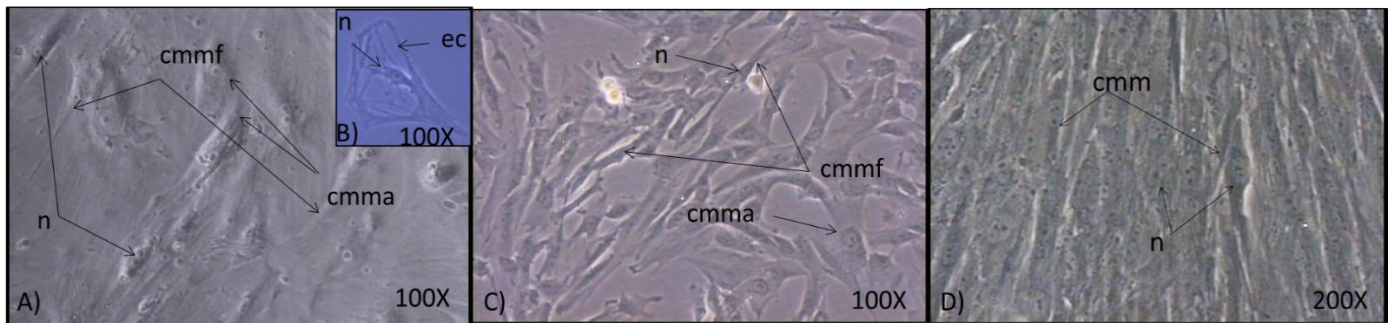


Figura 9. Poblaciones celulares obtenidas a través de la disgregación enzimática de la Gelatina de Wharton con Tripsina- EDTA y Colagenasa II vistas en el microscopio de contraste de fases. A) Presencia de los dos morfotipos de CMM aisladas de la Gelatina de Wharton a los 3 días de cultivo, una con morfología fusiforme (cmmf) y una con citoplasma ancho (cmma) en las cuales podemos apreciar, además de su forma, el núcleo (n). **B)** Detalle de CMM de citoplasma ancho (cmma), que presenta extensiones citoplasmática delgadas (ec) a las 18 horas de cultivo. **C)** La población de células compuesta por los dos morfotipos aisladas por la disgregación enzimática a los 7 días de cultivo. **D)** Organización de las CMM una vez alcanzada la confluencia a los 12 días, donde aprecia la morfología de estas como también su núcleo (n).

Además, de presentar estas características morfológicas de las CMM, también encontramos que todas las poblaciones aisladas fueron adherentes en cultivo durante los cultivos primarios como los posteriores subcultivos.

2. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de los cultivos de las células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano.

Se realizó una caracterización morfológica mediante el uso de las coloraciones de rutina May- Grünwald- Giemsa (Fig. 10A, 10B) y Hematoxilina- Eosina (H/E) (Fig. 10C y 10D), con las cuales podemos observar la morfología fusiforme característica de las CMM, además de la presencia de un núcleo central ovalado, en el cual se pueden apreciar uno o dos nucleolos bien

definidos con una coloración basófila oscura, también se aprecia la organización paralela de estas células fusiformes una vez conformada la monocapa.

Además de la caracterización morfológica, se realizó un inmunomarcaje contra la proteína vimentina (Fig. 10E), mediante el cual se pueden apreciar unas células positivas al marcate, las cuales presentan con una coloración citoplasmática entre marrón y ambar. Sin embargo, se debe resaltar que no todas las células marcadas poseen la misma intensidad de expresión, observándose un mayor marcate en el morfotipo fusiforme y un marcate más difuso en las que presentan un citoplasma ancho.

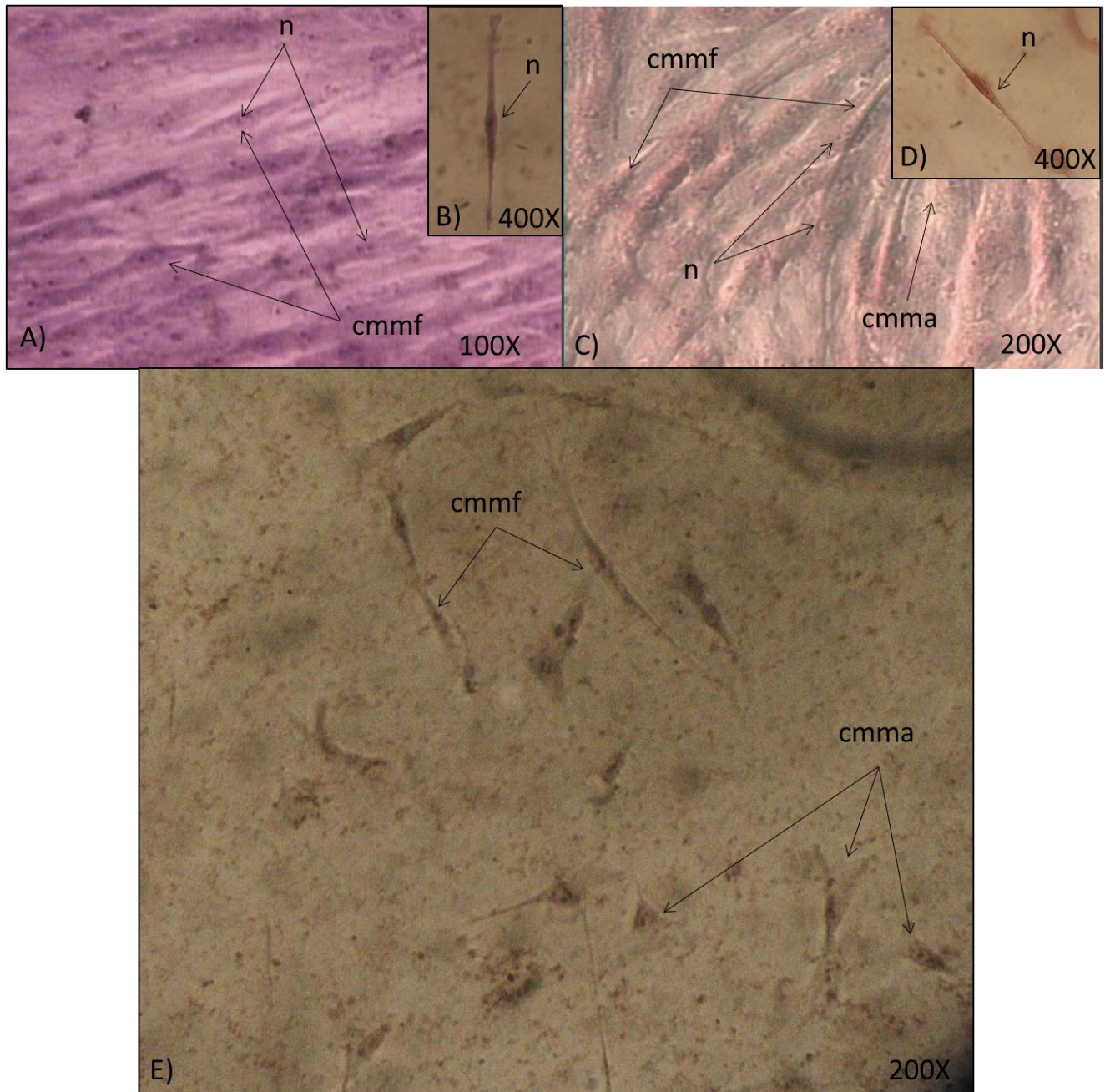


Figura 10. Caracterización de las poblaciones celulares de células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano. Coloración May- Grünwald- Giemsa: **A)** Monocapa de CMM, donde se aprecia el morfotipo fusiforme (cmmf) coloreada con **B)** Célula Madre Mesenquimal fusiforme aislada, donde se logra apreciar el núcleo (n). Coloración H/E: **C)** Monocapa de CMM, donde se logran observar tanto el morfotipo fusiforme (cmmf) como el de citoplasma ancho (cmma). **D)** Célula Madre Mesenquimal aislada. **E)** CMM positivas para inmunomarcaje contra vimentina, morfotipo fusiforme (cmmf) con mayor expresión que las de citoplasma ancho (cmma).

3. Establecimiento de los cultivos de cardiomiocitos a partir de explantes de corazón de fetos de ratón.

Los cardiomiocitos se aislaron de los corazones de fetos de ratón de entre 17- 19 días de gestación. Las poblaciones celulares obtenidas a partir de explantes de los corazones se presentan en las figuras 11A, 11B y 11C en las cuales se pueden apreciar los cardiomiocitos correspondientes con una morfología entre cilíndrica y estrelladas y un núcleo central redondo con uno o dos nucléolos bien definidos (Fig. 11A, 11B). También se aprecian unas células de morfología poligonal correspondientes a unas células similares al tipo endotelial (Fig. 11C). Sin embargo, irradiando de algunos explantes se observan unas células que presentan una morfología alargada y un núcleo más ovalado (Fig. 11E), las cuales empezaron a migrar de los explantes organizándose en láminas delgadas unas muy cercanas a las otras, en las cuales no se logran definir los límites celulares y posteriormente formaron interacciones entre los explantes más cercanos a los 15 días en cultivo (Fig. 11D)

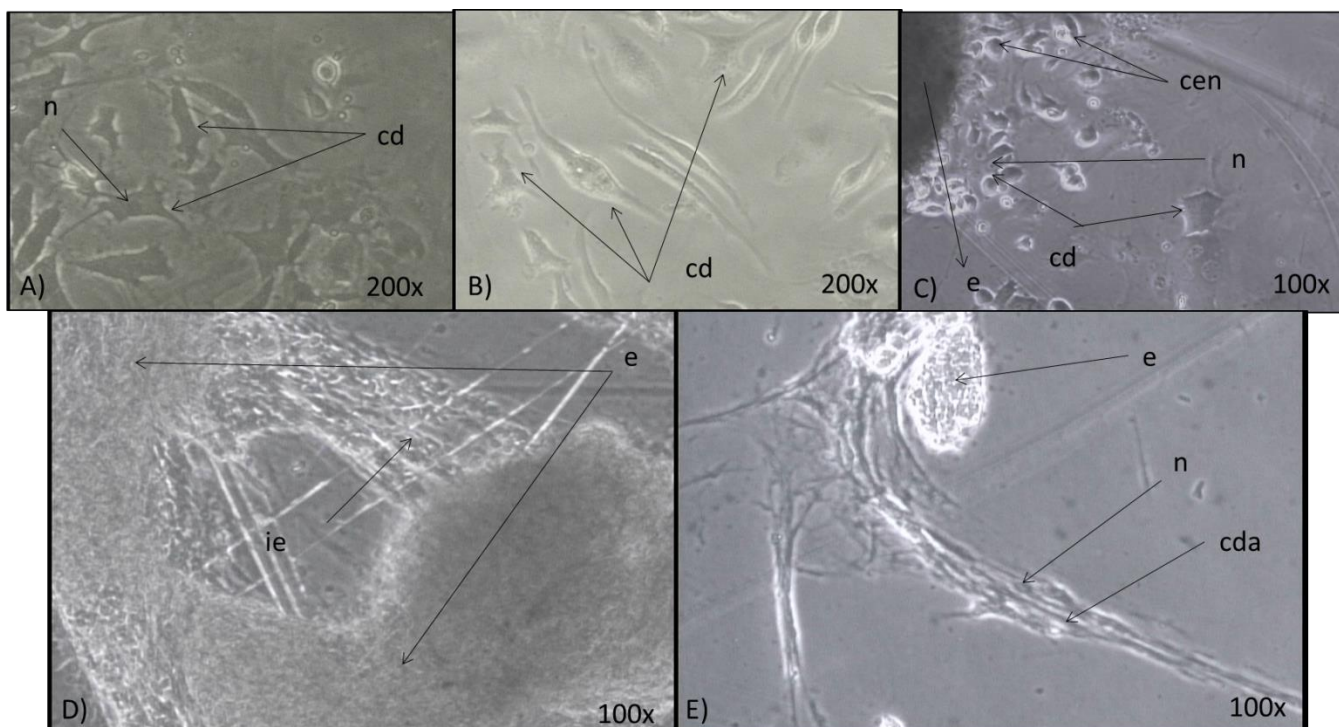


Figura 11. Cultivos primarios de cardiomiocitos aislados por explantes de los corazones de fetos de ratón observados en el microscopio de contraste de fases. A) y B) Poblaciones de cardiomiocitos (cd) con una morfología estrellada y un núcleo(n) central a los 10 días de cultivo. C) Población heterogénea de células aisladas de los explantes (e) de corazón a los 12 días de cultivo, representada por cardiomiocitos (cd) y células similar a endoteliales (cen). D) Interacciones (ie) entre los explantes (e) formados por células cardiacas alargadas (cda) a los 15 días de cultivo. E) Migración células cardiacas alargadas (cda), donde se aprecia su morfología y su núcleo (n) a los 15 días de cultivo.

4. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de los cardiomiocitos aislados de explantes de corazón de fetos de ratón.

La caracterización morfológica se realizó mediante las coloraciones de rutina May-Grünwald- Giemsa (Fig. 12A, 12B), y Hematoxilina- Eosina (Fig. 12C, 12D); donde se pueden apreciar las dos poblaciones de cardiomiocitos aisladas, una con una morfología alargada que migraron de los explantes y que establecieron conexiones entre los explantes (cx) (Fig. 12A), y la otra con una morfología estrellada. Con la coloración Hematoxilina-Eosina se pudo apreciar la heterogeneidad de la población celular aislada, ya que se logró observar que está compuesta de dos tipos celulares, tanto de cardiomiocitos con una morfología más cilíndrica y de extremos

bifurcados y alargados, con un núcleo central y la presencia de una región más clara cercana al núcleo denominada región perinuclear, como también de una población de células poligonales, similares a células endoteliales con un núcleo central basófilo. Además se puede observar la interacción célula-célula semejante al disco intercalar en muchos casos (Fig. 12C, 12D).

En cuanto a la caracterización histoquímica específica para músculo, ésta se realizó mediante la reacción de la coloración Hematoxilina ácida fosfotungstica (PTAH), con la cual se puede apreciar la morfología característica de los cardiomiocitos como también se puede observar la presencia de estriaciones en el citoplasma (Fig. 12E, 12F, 12G). Por último, se realizó una caracterización inmunocitoquímica contra el anticuerpo desmina, donde se obtuvo una reacción positiva (Fig. 12H, 12J), además se pueden distinguir los núcleos y en algunas células estriaciones citoplasmáticas (Fig. 12I); cabe destacar, que hay una variación de expresión entre las células que componen la población, ya que unas presentan mayor expresión que otras.

Es importante destacar que en los tres primeros días de cultivo, en algunos explantes se logró observar contracciones involuntarias rítmicas.

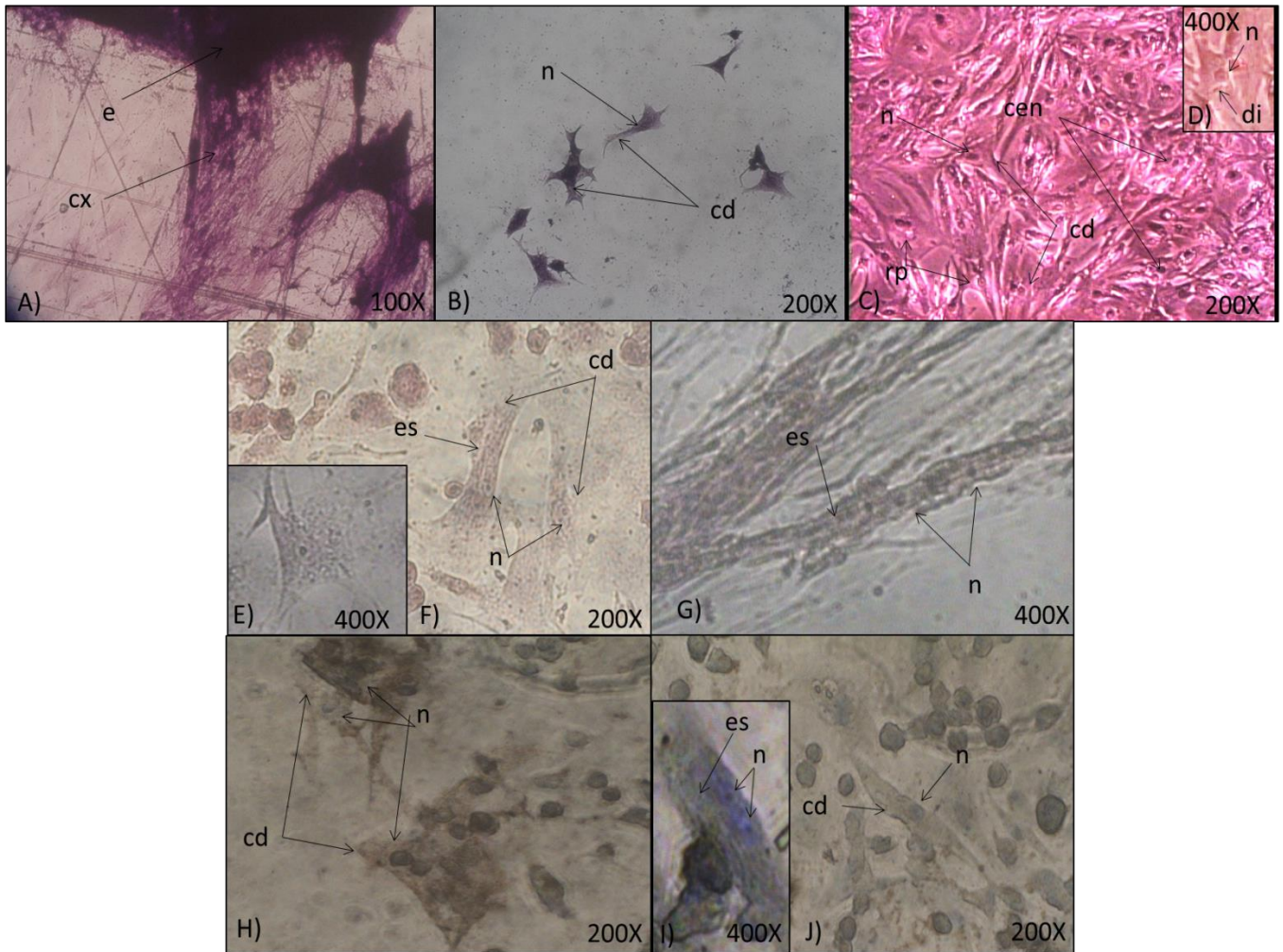


Figura 12. Caracterización de las poblaciones celulares aisladas de los corazones de fetos de 17 a 19 días de gestación. May- Grünwald- Giemsa: **A)** Explante (e) y su conexión (cx) con otro explante mediante las poblaciones de fibras cardiacas. **B)** Cardiomiocitos (cd) aislados con una morfología estrellada. Coloración H/E: **C)** La población celular aislada compuesta por células similares a endoteliales (cen) con una morfología poligonal y cardiomiocitos (cd) con una forma más cilíndrica, núcleo (n) central y una región perinuclear (rp) más clara. **D)** Detalle de un cardiomiocito, donde se pueden observar interacciones semejantes a los discos intercalares (di). Coloración PTAH: **E) y F)** Cardiomiocitos positivos, donde se pueden observar estriaciones (es) en su citoplasma. **G)** Fibras cardiacas positivas, pudiendo apreciarse núcleos (n) y estriaciones (es). Inmunomarcaje contra desmina: **H), I) y J)** Cardiomiocitos positivos al marcaje, en los cuales se aprecian las estriaciones (es).

5. Evaluación de la diferenciación cardiomiogénica.

5.1 Inducción cardiomiogénica mediante el uso de Medios Condicionados obtenidos de cultivos de cardiomiocitos de ratón.

5.1.1 Evolución de los cultivos inducidos.

Una vez que se obtuvieron cultivos semiconfluentes de CMM aisladas del CUH, se agregaron los medios condicionados por 23 días de cultivo, observándose cambios morfológicos ya a los 3 días de cultivos, donde algunas de las células bajo inducción comienza a cambiar el citoplasma hacia una forma más cilíndrica, su núcleo se coloca en posición más central y se observa más redondeado, además de que se empiezan a observar interacciones célula- célula apreciables (Fig. 13A). Al mismo tiempo, se empezaron a formar unos agregados celulares con una morfología redondeada distintiva (Fig. 13B). También se pudo apreciar algunas células binucleadas con núcleos centrales redondeados (Fig. 13C).

Posteriormente a los 7 días de cultivo, se aprecian cambios más evidentes en las células bajo tratamiento con los medios condicionados, pudiendo observarse un aumento del volumen citoplasmático en la mayoría de las células presentes, así como también la formación de extensiones de citoplasmáticas a través de las cuales interactúan las células (Fig. 13D) formando además en algunas zonas interacciones similares a discos intercalares (Fig. 13F). Paralelamente, los agregados celulares formados previamente incrementan de tamaño en una conformación redondeada (Fig. 13E).

A los 14 días de inducción, observamos como las células han cambiado por completo su morfología a una forma cilíndrica (Fig. 13G), además se pueden apreciar interacciones celulares transversales similares a discos intercalares (Fig. 13H) y algunas células bifurcadas que presentan forma de “Y” por consecuencia de sus extensiones citoplasmáticas (Fig. 13I).

Estos cambios morfológicos e interacciones celulares se mantienen hasta los 23 días de inducción del cultivo (Fig. 13J, 13K, 13L), mientras que en los controles negativos las células mantuvieron su forma fusiforme durante todo el tiempo de cultivo.

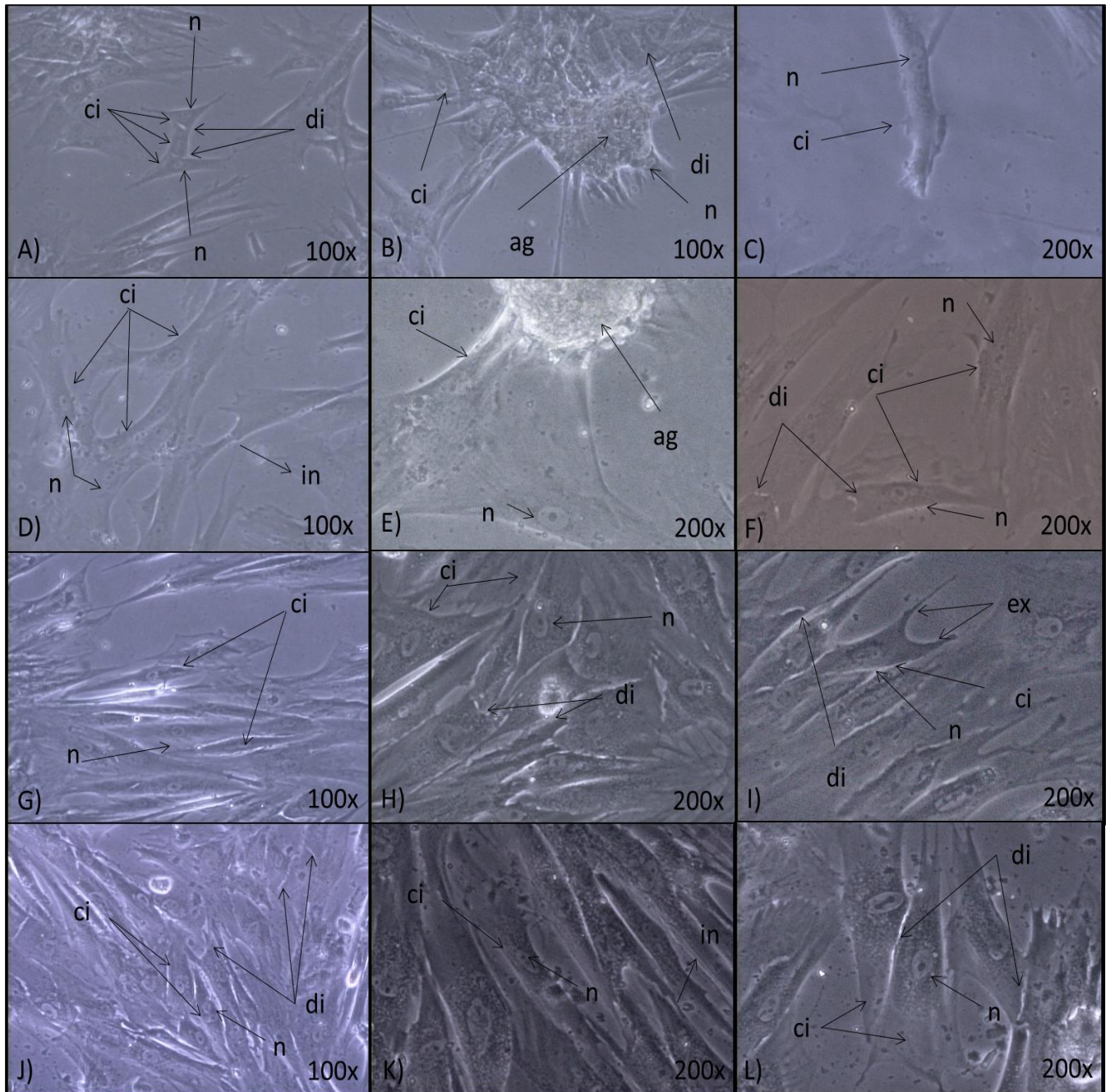


Figura 13. Evaluación de la inducción cardiomiogénica de los cultivos celulares expuestos a los medios condicionados de corazones de fetos de ratón a través del microscopio de contraste de fases. A) CMM inducidas (ci) por medios condicionados por 3 días, mostrando cambios morfológicos, núcleos (n) centrales redondeados e interacciones célula – célula apreciables semejantes a los discos intercalares (di). **B)** Formación de un agregado (ag) de células inducidas (ci) a los 3 días de cultivo. **C)** Célula inducida (ci) aislada a los 3 días de cultivo con una morfología cilíndrica. **D) y F)** Células inducidas por uso de medios condicionados a los 7 días de cultivo, las cuales forman interacciones (in) visibles entre ellas. **E)** Agregado formado y células inducidas a su alrededor a los 7 días de cultivo. **G), H) e I)** CMM inducidas por medios condicionados a los 14 días de cultivo, algunas con extensiones citoplasmáticas (ex) bifurcadas que le dan una forma de “Y”. **J), K) y L)** Células inducidas mostrando un aumento de tamaño y cambios morfológicos considerables a los 23 días de cultivo en medios condicionados.

5.1.2 Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica.

Para poder evaluar el proceso de inducción cardiomiogénica, se realizaron coloraciones de rutina, al igual que coloraciones histoquímicas e inmunocitoquímicas (Fig. 14). En primer lugar pudimos observar los cambios morfológicos de las células inducidas por el uso de medios condicionados de cardiomiocitos, con ayuda de las coloraciones de rutina May- Grünwald-Giemsa (Fig. 14A, 14B, 14C, 14D y 14E) y Hematoxilina-eosina (Fig.14F). En comparación con las células madres mesenquimales (Fig. 10), se puede observar cambios en la morfología general de las células inducidas, ya que éstas presentan una forma cilíndrica (Fig. 14A, 14C, 14D y 14E) y en algunos casos estrelladas (Fig. 14B) a diferencia de la forma fusiforme clásica de las CMM, como también se aprecian núcleos redondeados y centrales prominentes (Fig. 14E y 14F). Es de destacar que las interacciones bien delimitadas entre estas células presentan una forma escalonada cuando están en la monocapa, mientras que cuando las células están aisladas presentan unas extensiones citoplasmáticas, las cuales generan la morfología estrellada o en forma de “Y” (Fig. 14B, 14C, 14D). Al mismo tiempo, en algunos casos se pueden observar la presencia de una zona perinuclear más clara. (Fig.14E).

Al realizar la coloración histoquímica PTAH (Fig. 14G, 14H, 14I) pudimos observar claramente los dos tipos de morfología señalados anteriormente en las cuales se aprecian los núcleos centrales y redondeados, así como la presencia de las interacciones celulares (Fig. 14G y 14H). Es importante destacar que con esta coloración, se puede observar la presencia de una red interna de filamentos en el citoplasma de las células inducidas (Fig. 14H), y a mayor aumento, se pueden observar en las extensiones o en los bordes citoplasmáticos unas estriaciones transversales (Fig. 14I). También, se encontró que no todas las células reaccionaron con la misma intensidad a la coloración, pudiendo observar células con una coloración muy clara

apenas apreciable, hasta coloraciones oscuras donde se observan los nucléolos dentro del núcleo como también las estructuras citoplasmáticas.

Cuando se realizó la reacción inmunocitoquímica contra la proteína desmina, encontramos que hay un bajo un marcaje, sin embargo, se logran diferenciar los núcleos centrales redondeados, la morfología cilíndrica con los extremos bifurcados, las interacciones escalonadas similares a discos intercalares en algunos casos, así como la también la red interna de filamentos en el citoplasma (Fig. 14J).

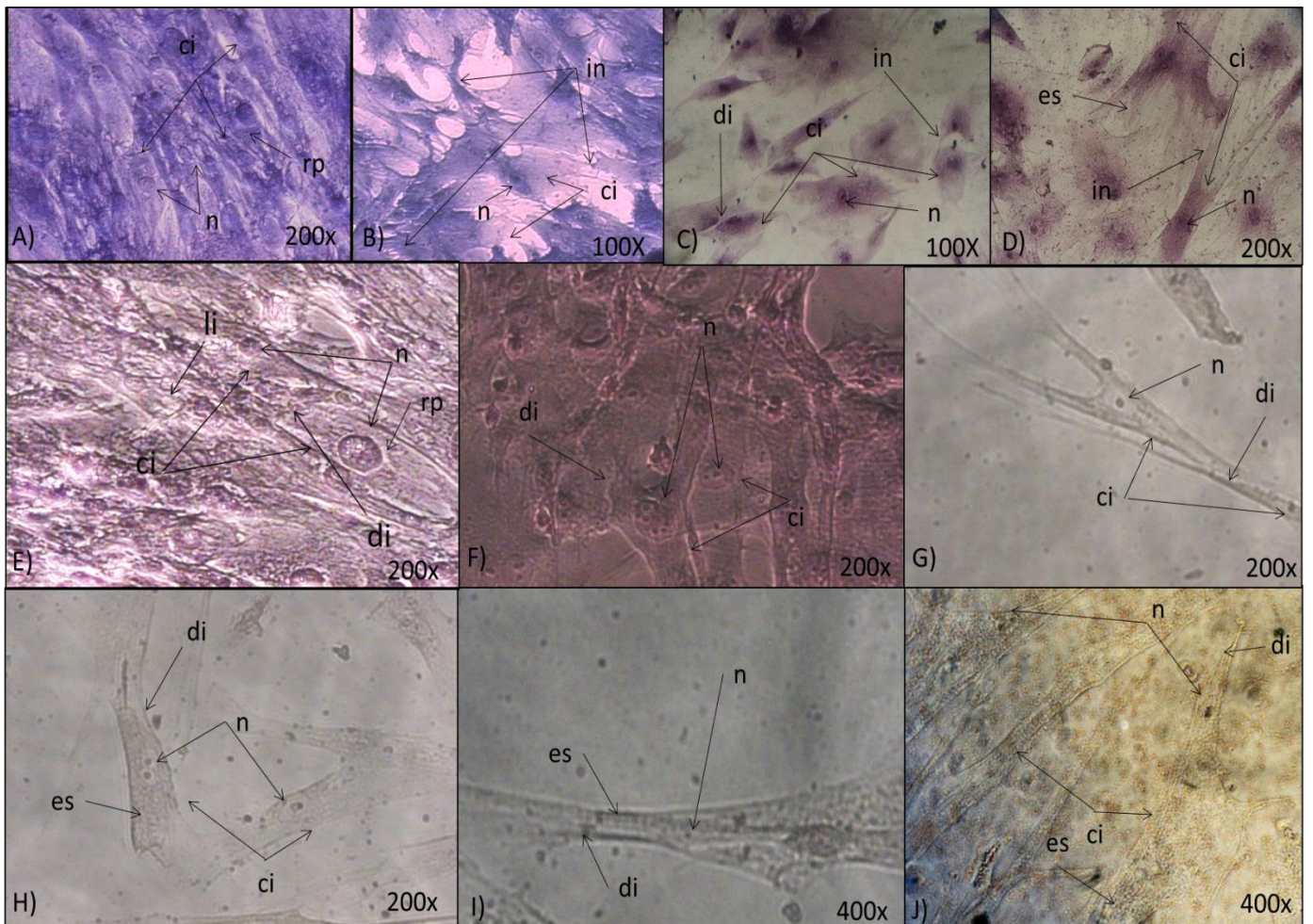


Figura 14. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de las CMM inducidas a linaje cardíaco mediante el uso de medios condicionados. Coloración May-Grünwald- Giemsa: **A)** Monocapa de células inducidas (ci) que presentan una morfología cilíndrica, un núcleo oscuro (n) y una zona perinuclear (rg) clara. **B)** Células inducidas (ci) con una morfología estrellada las cuales a través de sus extensiones citoplasmáticas forman interacciones (in). **C)** Interacciones (in) entre cardiomiocitos y un disco intercalar (in) semejante a los del tejido muscular cardíaco. **D)** Células inducidas (ci) con morfología cilíndrica y extremo bifurcado, las cuales en algunos casos presentan estriaciones (es). **E)** Células inducidas (ci) en las cuales logramos apreciar la región perinuclear (rg) más clara, como también los límites celulares (li). **F)** Células inducidas con la coloración H/E con estructuras ramificadas en forma semejante a una “Y” y entre ellas una interacción marcada semejante a un disco intercalar (di). Coloración PTAH: **G)** Interacción (di) entre dos células inducidas positivas para la coloración. **H)** Nivel de coloración diferencial entre varias células inducidas (ci), en la más oscura se aprecian estriaciones (es) en el citoplasma y dos núcleos, además de una interacción (in) marcada. **I)** Detalle de las estriaciones(es) citoplasmáticas e interacción (di) célula-célula. **J)** Leve reacción positiva de las células inducidas (ci) ante el marcaje con anticuerpos anti-desmina.

5.2 Inducción cardiomiogénica mediante el establecimiento de co-cultivos con las células madre mesenquimales y los cardiomiocitos.

5.2.1 Evolución de los co-cultivos establecidos.

Se evaluó la inducción a través del sistema de co-cultivos de las células madres mesenquimales y los cardiomiocitos hasta 21 días de cultivo.

Las células aisladas adheridas al inserto muestran ya a los 3 días de cultivo algunos cambios morfológicos a nivel del citoplasma y del núcleo (Fig. 14A, 14B y 14C). Además se puede apreciar las interacciones célula- célula (Fig. 14B). Posteriormente tanto a los 7 días de cultivo (Fig. 14D, 14E, 14F) como a los 14 días de cultivo (Fig. 14G, 14H, 14I) en algunas zonas del inserto se pueden observar la formación de agregados tridimensionales esféricos (Fig. 14D) y unos más planos (Fig. 14G), mientras que las células aisladas tiene una morfología cilíndrica que establecen uniones intercelulares transversales semejantes a discos intercalares (Fig. 14F). A medida que transcurrió el tiempo de cultivo muchos agregados incrementaron en tamaño y se desprendieron del inserto.

A los 21 días de cultivo (Fig. 14J, 14K, 14L) se mantienen los cambios morfológicos en general con la morfología cilíndrica con extensiones citoplasmáticas bifurcadas generando la morfología en forma de “Y”, también se puede visualizar algunas células binucleadas (Fig. 14L). A diferencias de los co-cultivos establecidos entre CMM y CMM (Control Negativo), los cuales mantuvieron su morfología fusiforme en todo momento.

Es importante resaltar, la presencia de unas estructuras circulares las cuales corresponde a los poros (p) de los insertos.

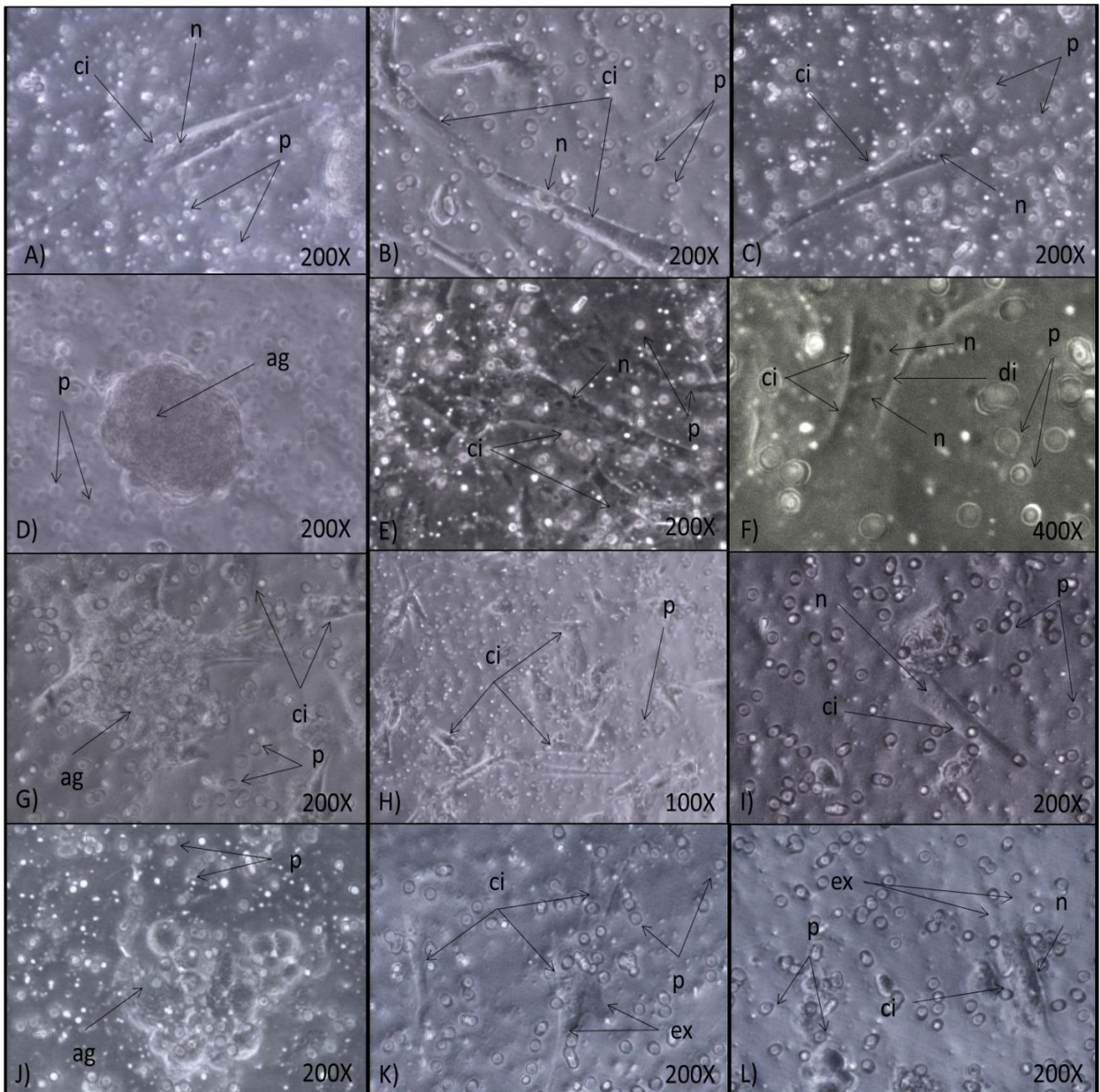


Figura 15. Evaluación de la inducción cardiomiogénica por establecimiento de los sistemas de co-cultivos entre CMM y cardiomiocitos de fetos de ratón a través de microscopio de contraste de fases. A) B) y C) CMM inducidas (ci) en co-cultivos con cardiomiocitos de ratón a los 3 días a las cuales se les puede apreciar cambios morfológicos y en algunos casos sus núcleos (n) bien definidos, además de los poros (p) del inserto. D) Agregado celular (ag) formado a los 7 días de cultivo. E) Células inducidas a los 7 días de cultivo. F) Detalle de un par de células inducida a los 7 días de cultivo, entre las cuales se aprecia una interacción transversal semejante a los discos intercalares(di). Agregado formado y células inducidas a su alrededor a los 7 días de cultivo. G) Formación de un nuevo agregado celular a los 14 días de cultivo H) e I) CMM inducidas en co-cultivo a los 14 días. J) Agregado celular formado a los 21 días de cultivo. K) y L) Células inducidas a los 21 días de cultivo con extensiones citoplasmáticas (ex) en forma de “Y”, y algunas células binucleadas con forma cilíndrica.

5.2.2 Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica.

Para evaluar las células inducidas mediante el establecimiento de co-cultivo, se aplicó la coloración May- Grünwald- Giemsa (Fig. 16), la cual nos permitió apreciar la morfología de las células inducidas, encontrando que estas presentan una forma cilíndrica alargada, diferente a la morfología fusiforme inicial (Fig. 10) antes de establecer los co-cultivos, también se logró observar los núcleos en una posición central y con una morfología redondeada y las interacciones célula- célula bien delimitadas (Fig 16B, 16C).

Otra técnica aplicada para evaluar las células inducidas fue la tinción histoquímica PTAH, la cual resulto positiva para estas células, en las cuales se logró apreciar la morfología cilíndrica ensanchada, con núcleos centrales redondeados y sus nucléolos, en algunos casos se aprecian estriaciones con una coloración más oscura en los bordes celulares (Fig. 16E). Se lograron observar las interacciones en forma de escalera (Fig. 16D) y además la red de estructura filamentosa en el citoplasma (Fig. 16F).

Por último para la caracterización de las células inducidas, se realizó un inmunomarcaje mediante anticuerpo anti-desmina, el cual resulto positivo, marcando el citoplasma de un color ámbar oscuro, mostrando la morfología celular semejante a un rectángulo donde se puede apreciar el núcleo redondeado (Fig. 16C)

Cabe destacar que solo se encontraron células aisladas y a muy baja densidad celular, ya que la mayoría de la población inicial sembrada en el inserto una vez establecido el co-cultivo, migraron y se unieron hasta formar agregados (Fig. 16G), los cuales posteriormente se desprendían.

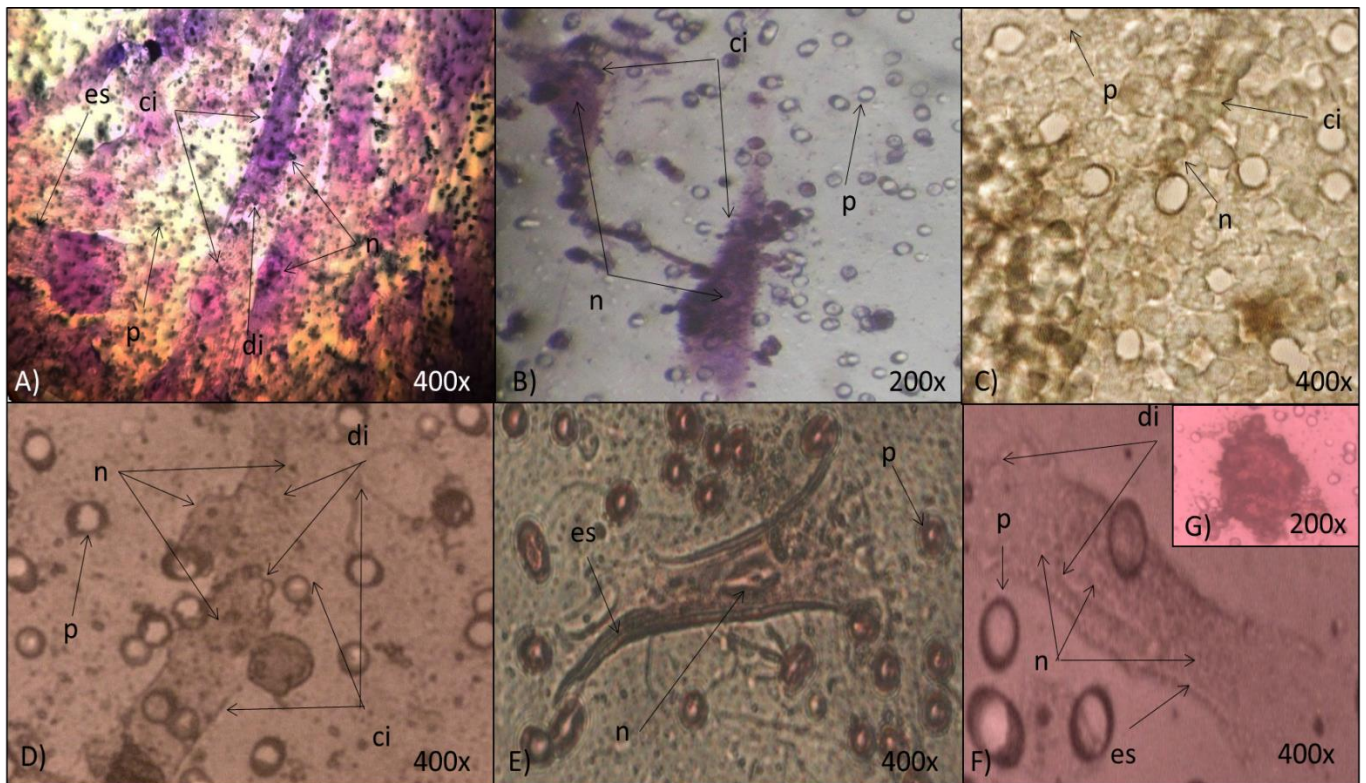


Figura 16. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de las CMM inducidas a linaje cardiomiogénico mediante el establecimiento de co-cultivos. Coloración May- Grünwald- Giemsa: **A) y B)** Células inducidas (ci) con morfología cilíndrica, las cuales presentan un núcleo(n) central circular y estriaciones (es) en su citoplasma, además se pueden observar las interacciones (di) entre ellas y los poros (p) del inserto. **C)** Célula inducidas (ci) con marcaje positivo para el anticuerpo desmina. Coloración PTAH: **D) y F)** Interacción (di) entre las célula inducidas (ci) con una disposición escalonada. **E)** Detalle de una célula inducida (ci) aislada, donde se puede apreciar en los bordes del citoplasma la presencia de unas estriaciones (es). **G)** Agregado (ag) formado por células inducidas.

5.2.3 Histología de los agregados celulares.

Los agregados formados en los cultivos se evaluaron mediante cortes histológicos y posterior coloración con la tinción PTAH (Fig. 17). El corte del agregado presenta una forma regular redondeada (Fig. 17C), donde se logró apreciar, células inducidas tanto en corte transversal, las cuales se reconocieron por la presencia de su núcleo redondeado, como en corte longitudinal, las cuales presentan una forma cilíndrica y núcleos redondeados centrales (Fig. 17D, 17E). Al observar con mayor detalle las células cortadas longitudinalmente, se pudo observar la interacción celular escalonada semejante a discos intercalares (Fig. 17. E).

Simultáneamente con fines comparativos se realizó la misma tinción a cortes histológicos de corazón de ratón, observando en éstos, los cardiomiocitos organizados unos sobre otros componiendo laminas cilíndricas que a su vez se ordenan paralelamente entre ellas. En algunas ocasiones, se pueden observar los límites entre los cardiomiocitos, como unas líneas en composición escalonada (Fig. 17B) como también, bandas transversales que componen las estriaciones (Fig. 17A)

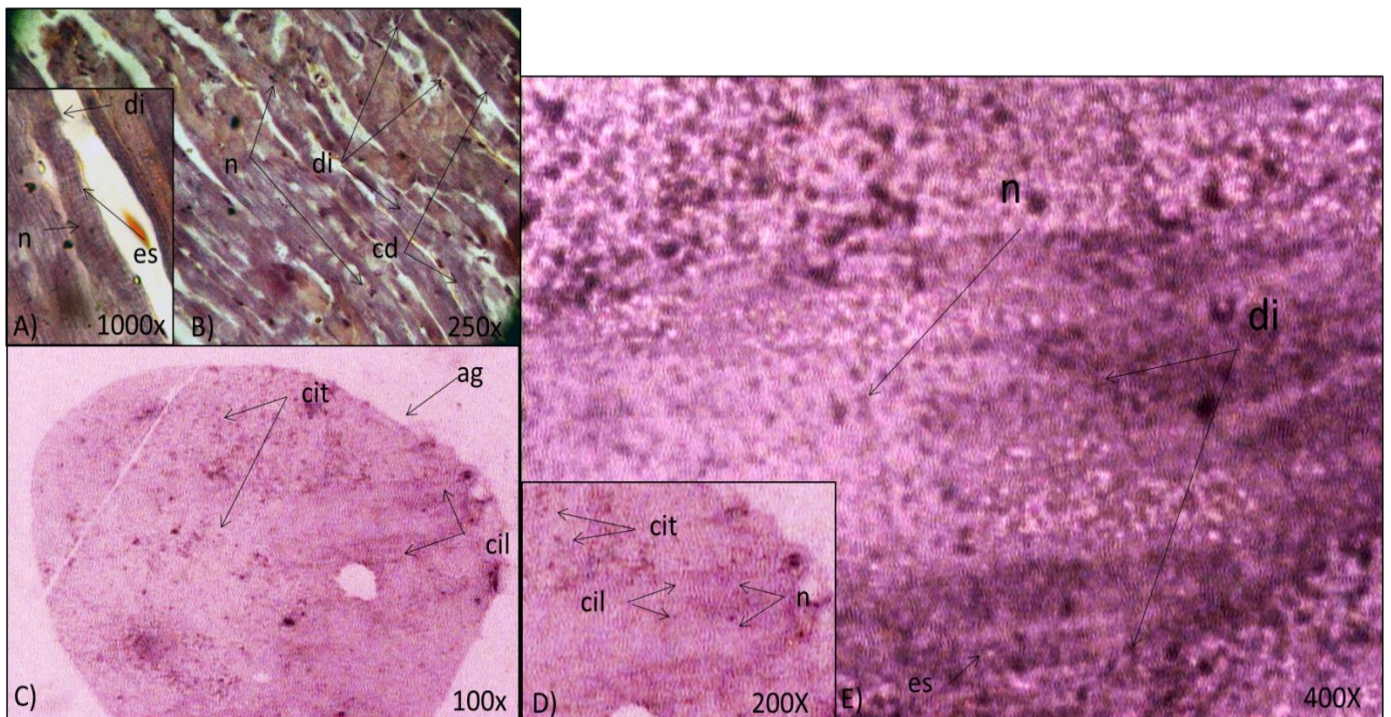


Figura 17. Corte histológico de los agregados celulares formados en los sistemas de co-cultivos coloreados con PTAH. A) y B) Control positivo de un corte de corazón de ratón donde podemos observar el arreglo paralelos de los cardiomiocitos (cd), los discos intercalares (di) y las estriaciones (es) transversales características del arreglo sarcomérico muscular. **C)** Corte del agregado (ag) donde se observan células inducidas en corte transversal (cit) Y células inducidas en corte longitudinal (cil). **D)** Detalle de las células inducidas cortadas transversalmente (cit) donde se aprecia su núcleo (n) y de las células inducidas en corte longitudinal (cil) donde se aprecia además de su núcleo, estriaciones en su citoplasma. **E)** Detalle a mayor aumento de las células cortadas longitudinalmente donde se observa la interacción (di) célula- célula escalonada.

5.2.4 Comparación de composición proteica de las células inducidas con las CMM y células cardiacas.

Además de la caracterización de la caracterización morfológica de las células inducidas, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida para determinar el perfil de bandas de las proteínas solubles tanto de las células inducidas como de células cardiacas y de CMM (Fig. 18), en la cual se pudo observar que las células inducidas mediante los co-cultivos presentan una perfil proteico intermedio entre las CMM y las células de corazón, ya que se encontraron 2 bandas similares entre ellas y las CMM (Bandas verdes), una que presenta aproximadamente un peso molecular de 92 KDa (Banda 1) y otra de aproximadamente 50 KDa (Banda 2); y una banda de similitud con las proteínas cardiacas de un peso molecular entre 40 y 44 KDa (Banda 3), como también 2 bandas que presentaban los perfiles proteicos de las 3 tipos de células, que corresponde a proteínas de bajo peso molecular entre 23 – 29 Kda (Banda 4) y aproximadamente 1 Kda (Banda 5).

En el caso de las bandas correspondientes a las células inducidas por medios condicionados y cardiomiocitos, no se lograron observar, debido a que la cantidad de proteínas fue muy baja, por lo tanto se debe considerar para realizar este tipo de caracterización tener una población celular en el orden 3 a 4 millones de células.

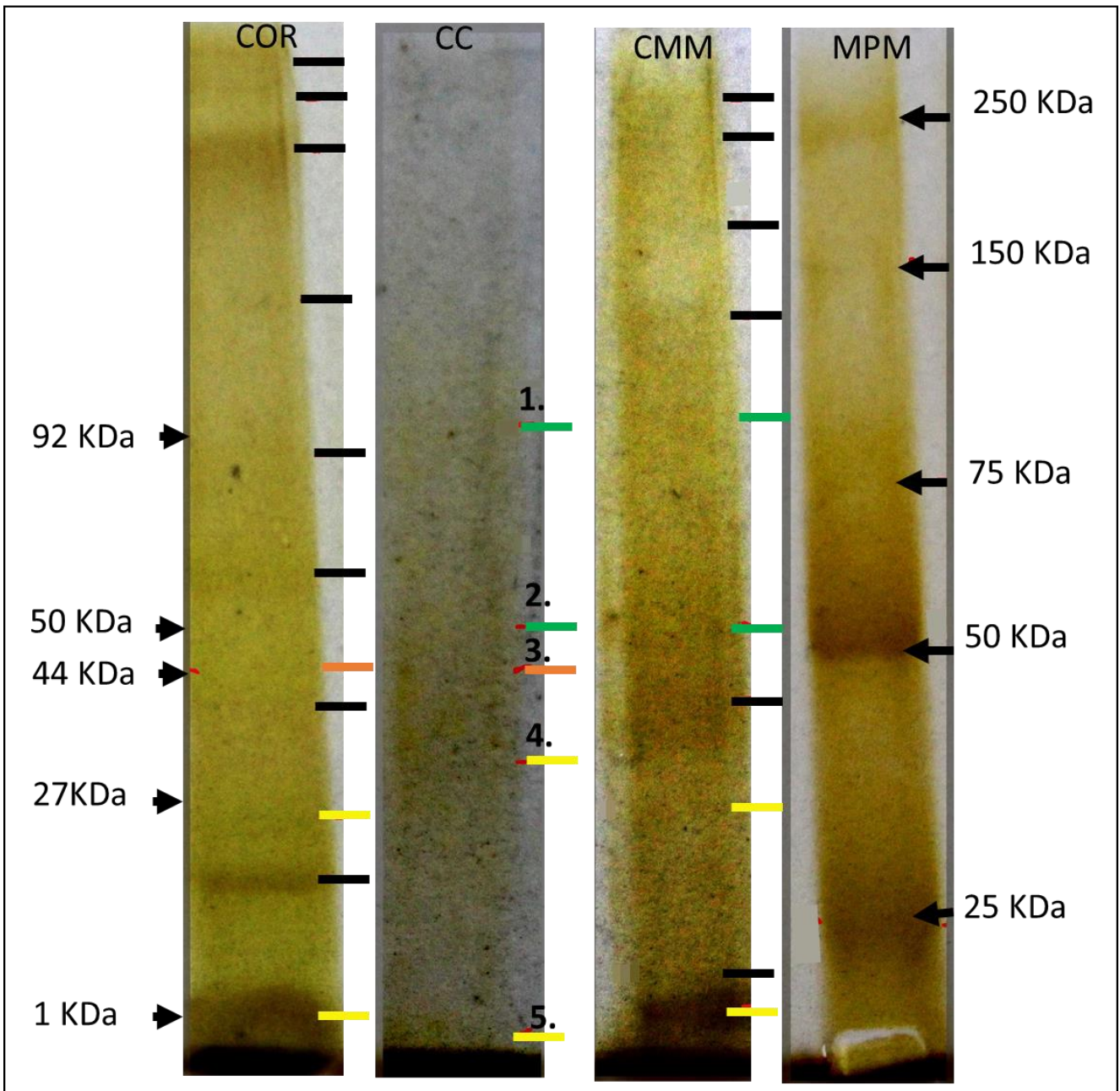


Figura 18. Corrida electroforética en gel de poliacrilamida de proteínas de corazón de ratón (COR), células inducidas de los co-cultivos (CC), células madre mesenquimales (CMM) y los marcadores de peso molecular (MPM) con coloración de plata donde las **barras verdes** corresponden a las bandas similares entre las CMM y las células inducidas por sistemas de co-cultivos, la **barra naranja** las bandas similares entre las células de corazón y las células inducidas, y las **barras amarillas** corresponden a las bandas compartidas por las CMM, corazón y las células inducidas.

7. DISCUSIÓN

En los últimos años las células madres mesenquimales, se han tornado un objeto de estudio activo y constante, ya que en ellas se ha encontrado características particulares, tales como su potencialidad de diferenciación y su baja inmunogenicidad. Estas propiedades prometedoras abren un campo para el tratamiento de diversas enfermedades, así como su uso en ensayos farmacológicos.

En este sentido, en este trabajo, se propone el CUH como una de las fuentes para la obtención de CMM evaluándose su capacidad de diferenciación al linaje cardiomiogénico mediante el uso de medios condicionados y del establecimiento de co-cultivo con células cardíacas de fetos de ratón, los cuales son protocolos sencillos y efectivos para inducir las CMM aisladas de CUH hacia linaje cardíaco.

1. Aislamiento y establecimiento de los cultivos celulares de las poblaciones de CMM presentes en las diferentes regiones del CUH mediante la técnica de explantes y de disgregación enzimática.

El aislamiento y posterior establecimiento de los cultivos celulares de poblaciones de CMM de las regiones del CUH se logró realizar mediante las diversas técnicas aplicadas, ya que en la mayoría de los casos, se pudieron apreciar poblaciones celulares desde los 2 y 3 primeros días de cultivo, con capacidad de adherencia y principalmente una morfológica fusiforme alargada, con la presencia de un núcleo central ovalado (Fig. 6, 7, 8). Esta morfología descrita, coinciden con los reportes hechos por diversos autores, al establecer cultivos celulares de CMM de diferentes fuentes, tales como de la médula ósea (Bianco y col., 2001; Kern y col., 2006; Lu y col., 2006; Izapadna y col., 2006; Backsh y col., 2007; Merentes, 2009; Shi y col., 2016;), sangre de cordón umbilical (Bieback y col., 2004; Gang y col., 2004, Kern y col., 2006), tejido adiposo

(Rangappa y col., 2003; Kern y col., 2006; Izapadna y col., 2006; Merentes, 2009) y placenta (Anker y col., 2004), como también de las diferentes regiones del CUH tales como de la Gelatina de Wharton (Wang y col., 2004; Karahuseyinoglu y col., 2007; Calderón, 2007; Chao y col., 2008; Merentes, 2009; Araos, 2009; Kim y col., 2013), de la región subendotelial de los vasos sanguíneos (Romanov y col., 2003; Calderón, 2007; Merentes, 2009; Araos, 2009) o de todo el CUH (Lu y col., 2006; Qiao y col., 2008).

Con respecto a las técnicas utilizadas en este trabajo, cada una de ellas tenía como objetivo aislar las CMM de los diferentes compartimientos del CUH en las cual se encuentran. Así pues se utilizó la técnica de los explantes para obtener las CMM de la zona subendotelial de las arterias, ya que en este caso, como explican Calderón en 2007 y Merentes en el 2009, en esta zona existen remanentes del tejido conectivo que poseen poblaciones de CMM asociadas, los que conlleva a la migración y proliferación de la CMM residentes de la región subendotelial una vez sembrados los explantes. En el caso de la denudación, se utilizó la enzima dispasa para separar el epitelio de revestimiento (Amnios) del tejido conectivo cercano, es decir, de la región denominada subamnios, con el fin de obtener dos poblaciones celulares asociadas a estas regiones; células epiteliales y células mesequimales. En el caso de las células epiteliales se logran apreciar en los primeros días de cultivo, pero estas células necesitan de unas condiciones particulares de cultivo tales como que el sustrato de cultivo este cubierto con una matriz extracelular (natural o artificial) como también que el medio base este suplementado con ciertos factores de crecimiento específicos, tales como el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Rodríguez, 2010), por lo cual estas células no se mantienen en los cultivos luego de los cambios de medios y posteriores subcultivos, obteniendo de esta forma una población de CMM homogénea. Asimismo, con el uso de la disgregación enzimática seriada con las enzimas Tripsina y Colagenasa II aplicada a la Gelatina de Wharton, se logró aislar las CMM asociadas a este

tejido conectivo, estas enzimas actúan cortando los enlaces peptídicos de las moléculas de adhesión que mantienen las interacciones célula-célula, en el caso de la tripsina, y de las moléculas de adhesión que conforman las interacciones célula-Matriz extracelular, en el caso de Colagenasa II, liberando de este modo las células.

Cabe destacar que la obtención de células mediante la disgregación enzimática con las enzimas Dispasa, Tripsina y Colagenasa II fue más efectiva, ya que se lograron aislar CMM en un 75% de las muestras de CUH procesadas, mientras que mediante la técnica de explantes, solo se logró obtener CMM en el 12,5% de las muestras procesadas, a diferencia de lo expuesto por Araos en el 2009, quien obtiene poblaciones de CMM mediante la técnica de explantes de la mayoría de las muestras procesadas; este hecho puede estar relacionado entonces con problemas de adhesión de los explantes al sustrato. También podemos resaltar, que las características de la proliferación celular son más rápidas en los cultivos establecidos por la disgregación enzimática que por la técnica de explantes, ya que la confluencia de los cultivos se alcanza alrededor de las 2 semanas de cultivo mediante la disgregación enzimática mientras que en este mismo tiempo no se logró alcanzar la confluencia con los explantes. Esto último puede estar ocurriendo debido a que en el caso de los explantes se requiere de un proceso de migración primero y posteriormente se observa la proliferación, por lo cual la confluencia se alcanza en tiempos mayores, a diferencia de cuando se usó disgregación enzimática donde las células ya están aisladas, y una vez logran adherirse al sustrato empieza la proliferación celular de las mismas lo que conlleva a que estos cultivos tarden menor tiempo en alcanzar la confluencia.

Considerando entonces las características de proliferación de las poblaciones de CMM aisladas por las técnicas de disgregación enzimática, también logramos encontrar semejanzas entre los resultados obtenidos con respecto a lo reportado en relación a los días necesarios para

alcanzar la confluencia, donde la mayoría de los autores indican que se alcanza entre 2 a 3 semanas de cultivo, tomando en cuenta estas características, además de la morfología, apoyan la premisa de que las poblaciones de células aisladas del CUH se corresponden con células madres mesenquimales (Romanov y col., 2003; Izapadna y col., 2006; Lu y col., 2006; Baksh y col., 2007).

Otra característica que se toma en cuenta es la capacidad de adherencia en cultivo, la cual presentaron las CMM aisladas del CUH desde el establecimiento de cultivo hasta sus posteriores subcultivos, cumpliendo de esta forma con uno de los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT por sus siglas en inglés) que definen las CMM (Dominici y col., 2006).

2. Caracterización morfológica e inmunocitoquímica de las CMM aisladas del CUH.

Mediante la caracterización morfológica con las coloraciones de rutina, tanto con la May- Grünwald -Giemsa como con la Hematoxilina-eosina, se logró evidenciar la morfología de las poblaciones celulares presentes en el cultivo. En este sentido, se logró corroborar la presencia de dos morfotipos de CMM que componen las poblaciones celulares, uno que corresponde a CMM fusiformes y otro que corresponde a las amplio volumen citoplasmático con la presencia de estructuras filamentosas. Estos dos morfotipos encontrados los describen Karahuseyinoglu y col. en el 2007, cuando aíslan CMM del CUH mediante disgregación enzimática con la enzima Colagenasa; donde explican que tras un marcaje inmunológico con anticuerpos anti-vimentina y anti-pancitoqueratina encuentran que ambas poblaciones resultan positivas para el marcaje con anti-vimentina, sin embargo las de morfología fusiforme presentaban una mayor afinidad con respecto a las de citoplasma ancho, las cuales resultaban positivas para el marcaje contra el anticuerpo anti-pancitoqueratina a diferencia de las

fusiformes. Igualmente a lo descrito por Karahuseyinoglu y col., Araos en 2009 detecta la presencia de estos dos morfotipos y la afinidad diferencial de los mismos por el anticuerpo anti-vimentina, lo cual también es evidenciado en este trabajo, donde se observó que tanto las células fusiformes como las de amplio volumen citoplasmático reaccionaban positivamente frente al anticuerpo anti-vimentina, pero aquellas de morfologías fusiformes resultaron más afines que las de citoplasma ancho.

La vimentina es una de las proteínas más expresadas en células de origen mesenquimal y pertenece a los filamentos intermedios del tipo III (Franke y col., 1978; Eriksson y col., 2009), al obtener resultados de marcaje positivo con los anticuerpo anti-vimentina nos confirma el origen mesenquimal de las células aisladas del CUH, en especial para aquellas de morfología fusiforme que presentaron una mayor afinidad por el anticuerpo, ya que para aquellas de citoplasma ancho que presentar una afinidad menor y que son reportadas positivas para marcadores endoteliales/epiteliales como la pancitoquerina (Karahuseyinoglu y col., 2007), se encuentran relacionados a un origen endotelial o epitelial, ya que esto concuerda con el fenotipo descrito por Franke y col. en 1978 al evaluar la composición de filamentos intermedios en células de diferentes orígenes embrionarios.

En nuestro laboratorio se determinó mediante las sondas fluorescentes Hoechst y Naranja de acridina que las CMM de amplio citoplasma presentes en los cultivos de membrana amniótica humana, tienen una gran concentración de lisosomas en la región perinuclear usando sondas fluorescentes mediante el colorante (Lopez, 2014), lo cual podría relacionarse con la capacidad de autofagia por parte de las CMM, las cuales tienen un mecanismo de reciclaje intracelular y cumple un papel importante en la eliminación de proteínas y vacuolas que se acumulan durante la autorenovación, proliferación y diferenciación de las CMM (Phadwal y col., 2013).

3. Aislamiento y establecimiento de los cultivos primarios de los cardiomiocitos a partir de corazones de fetos de ratón.

Las poblaciones aisladas de los corazones de fetos de las dos primeras progenies presentaron una composición heterogénea, donde una de las poblaciones observadas, presenta una forma cilíndrica y/ o estrellada con un núcleo central corresponde a los cardiomiocitos, los cuales llegan a esta forma final (estrellada) según Schwarzfeld y Jacobson en 1981, a través varios cambios morfológicos, tales como dos procesos de aplanamientos y extensión de citoplasma una vez que migran del explante; o a la forma cilíndrica (Schlüter y Piper, 2005; Johnson y col., 2014; Li y col., 2014). La otra población observada, presenta una forma poligonal y núcleo central, esta descripción se corresponde con las reportadas por Gartner y Hiatt en 2002 para las células endoteliales, las cuales pueden haberse aislados de los vasos sanguíneos que se encuentran el corazón, ya que el corazón es un órgano altamente irrigado (Gartner y Hiatt, 2002).

En algunos explantes de corazones de fetos de ratón se observó que las células cardíacas aisladas no presentan la morfología estrelladas ni cilíndrica reportadas por los otros autores, sino que presenta un arreglo laminar (unas sobre otras) similar al de las fibras musculares cardíacas (Gartner y Hiatt, 2002).

4. Caracterización fisiológica, morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de los cardiomiocitos aislados.

Una de las características más resaltante del músculo cardíaco es la capacidad de contraerse involuntariamente y con una ritmicidad inherente (Gartner y Hiatt, 2002), este comportamiento fisiológico particular de los cardiomiocitos, se observó en los explantes

establecidos en el cultivo, lo que nos da a entender que el tejido utilizado para el aislamiento de los cardiomiocitos se correspondía con músculo cardiaco. La capacidad de contracción involuntaria de los explantes aislados del corazón de ratón también es descrita por Salameh y Dhein en 2005 y den Haan y col., en el 2014, como parte de la caracterización del tejido aislado.

La caracterización citológica con las coloraciones de rutina, nos permitió ver una mejor definición de las formas celulares, corroborando así la morfología apreciada bajo la evaluación periódica del cultivo *in vitro*, donde se describe una forma entre cilíndrica y estrellada, de las cuales, la cilíndrica corresponde con la forma natural del cardiomiocito, mientras que la forma estrellada corresponde con la formación de pseudopodias que se extienden desde los límites de la célula en aquellas que están bajo un proceso de adherencia como también de migración en busca de establecer conexiones con las otras células (Mitcheson y col., 1998). Con respecto a la conformación de las láminas paralelas de cardiomiocitos formadas entre los explantes, se encontró un comportamiento similar al descrito por den Haan y col., en el 2014, quien explica que luego de colorear con hematoxilina-eosina los cardiomiocitos aislados mediante la técnica de explantes de ratas neonatas, muestran una estructura histológica más desorganizada que la observada en tejido aislado fresco, pero sin embargo mantiene su orientación longitudinal, lo cual se corresponde con lo observado en nuestros resultados (Fig. 12A y 12G).

La caracterización histoquímica, se corresponde por la reacción positiva de los cardiomiocitos con la tinción Hematoxilina Ácida Fosfotungstica (PTAH), la cual reacciona con los componentes de colágeno coloreándolos de azul. Aunque en nuestro caso no se logró observar el color azul característico, ya que este tipo de coloración es reportado para tejidos y no para monocapas en cultivo, las cuales presentan una densidad celular menor, por lo cual la coloración puede variar, no obstante pudimos observar una reacción positiva del colorante, ya que se pudo apreciar la morfología celular clásica de los cardiomiocitos anteriormente descrita,

su núcleo central redondeado característico, así como también la formación de una red interna de estructuras filamentosas, que pueden relacionarse con la presencia de miofilamentos en el caso de los cardiomiocitos cilíndricos y estrellados, similar a los descrito por Coetzee y Gevers en 1978, al colorear cultivos primarios de corazones de hámsters con PTAH; y la presencia de estriaciones compuestas de bandas transversales citoplasmáticas en los cardiomiocitos que conforman las láminas longitudinales, que concuerda con la descripción de la organización sarcomérica característica de musculo estriado (Gartner y Hiatt, 2002), observado de forma semejante por Bishop y col. en 1971 en los estudios morfológicos de cultivo de células musculares con PTAH.

En cuanto a la caracterización inmunocitoquímica, se encontraron células positivas para el anticuerpo anti-desmina. Como se mencionó previamente, la desmina es una proteína de los filamentos intermedios que componen el citoesqueleto de células musculares (Franke y col., 1978), ésta se encuentra asociada a la periferia de los discos Z en los sarcómeros y su función es la de unir los discos Z cercanos entre sí (Granger y Lazarides, 1979). Tanto con las tinciones histoquímicas como la inmunocitoquímica nos permitieron identificar los cardiomiocitos aislados y demostrar que la población celular que se mantuvo en cultivo, estuvo compuesta principalmente por cardiomiocitos, ya que además de éstas, pudimos observar células con una morfología poligonal, las cuales no fueron positivas para el anticuerpo anti-desmina, pudiendo sugerir que son células del tipo endotelial, debido a que el tejido cardiaco es muy vascularizado, y al aislar las células cardiacas también se pueden aislar estas. Sin embargo, para afirmar que estas células de morfología poligonal son células endoteliales se requieren usar marcadores específicos que nos permitan identificarlas con mayor especificidad.

Todo esto nos corrobora que la población celular obtenida en los cultivos de los explantes de corazón, está formada por una población de células heterogénea.

5. Evaluación morfológica de la diferenciación cardiomiogénica de CMM usando medios condicionados de los cultivos de explantes de fetos de ratón.

La diferenciación es el proceso mediante el cual se lleva a la expresión de las propiedades fenotípicas características de una célula madura en el tejido *in vivo*, a través de la transición irreversible de una célula madre a un linaje particular, por lo cual la célula solo puede expresar un repertorio limitado de propiedades (Freshney, 2010). Una de las formas más fáciles y directa de poder evaluar el proceso de diferenciación en muchos casos es mediante la observación de la morfología de las células, y de esta forma pudimos observar a medida que iban transcurriendo los días en cultivos de CMM en presencia de medios condicionados, que éstas iban modificando su morfología fusiforme clásica presente en los cultivos de CMM con el medio base, a nivel tanto citoplasmático como nuclear, donde a los 3 días de cultivo, algunas de las células que componían la población celular empezaron a cambiar su morfología fusiforme clásica dirigiéndose hacia una morfología cilíndrica y aplanada, con su núcleo circular ubicado en posición central y en algunos casos se encontraban binucleadas. Posteriormente, en la primera semana, se observó claramente el establecimiento de conexiones entre las células mediante extensiones citoplasmáticas, ya para la segunda semana se observaron células con una forma de “Y” debido a la formación de unas ramificaciones en los extremos de las células. Por último a los a los 23 días, todas la células presentes en el cultivo muestran una morfología característica de los cardiomiocitos (Descrita en la sección anterior).

Estos cambios morfológicos también son reportados por Antonitsis y col. en el 2007, quienes observaron que luego de la primera semana de cultivo tras un tratamiento con el

compuesto azacitidina en cultivos de CMM de médula ósea, las células extienden procesos citoplasmáticos hacia las células adyacentes, las cuales presentan varios núcleos y algunas de las células presentan morfología en forma de barra, una vez alcanzada la tercera semana de cultivo éstas incrementan en tamaño y a la vez generan ramificaciones. Posteriormente se forman estructuras semejantes a miotubos los cuales conectan con las células adyacentes a las cuatro semanas de cultivo. Más recientemente, Waheed y col. en el 2010 cuando aplican extractos obtenidos a partir de músculo de corazones embrionarios de rata en CMM de médula ósea, igualmente obtienen los mismos resultados tras la primera semana de tratamiento, donde las CMM que presentaban una forma fibroblástica, empiezan a alargarse, a establecer conexiones, y formar estructuras semejantes a miotubos en la segunda semana de tratamiento, ya para la tercera semana presentan ramificaciones con las que establecen interfaces con las células cercanas; todos estos resultados concuerdan con lo observado en este trabajo, por lo cual se puede sugerir que hay un proceso de diferenciación temprano hacia el linaje cardiomiogénico al aplicar tratamiento con los medios condicionados obtenidos de cardiomiocitos de fetos de ratón.

Además es importante destacar, que se pudo observar desde los tres días de inducción la formación de una línea transversal refringente con una composición recta o escalonada, entre algunas de las células inducidas, muy semejante uniones terminales muy especializadas características de la población celular cardíaca, denominadas discos intercalares (Gartner y Hiatt, 2002).

Cuando se aplicaron las coloraciones de rutina tales como May- Grünwald - Giemsa y Hematoxilina-eosina, se pudo confirmar y observar con mayor nitidez la morfología de las células inducidas, las cuales presentan el citoplasma más ensanchado y en forma cilíndrica, la presencia de ramificación mediante las cuales establecen conexiones intercelulares como

también la presencia de uno o dos núcleos centrales redondeados. Estas características morfológicas de las células inducidas, tales como la presencia de interacciones transversales entre los extremos celulares de algunas de las celulares semejantes a los discos intercalares, como la región alrededor de núcleo más clara, denominada sarcoplasma perinuclear (Eroschenko, 1995), han sido señalados por otros autores al inducir las CMM al linaje cardiomiogénico (Antonitsis y col., 2007; Waheed y col., 2010).

Con respecto a los cultivos coloreados con la PTAH, se logró apreciar en el interior del citoplasma de las células inducidas en los cultivos una red de estructuras filamentosas que conforman una especie de malla, esta malla interna es similar a la observada en los cardiomiocitos coloreados con la PTAH, lo que nos puede indicar que tras los 23 días de cultivo, si hubo un proceso de diferenciación hacia un linaje muscular, ya que esta red filamentosa interna observada en las células puede estar representando a las miofibrillas que le dan la característica estriada al músculo cardíaco, la cual es evidenciada al usar esta coloración. También se pudo observar en algunos casos, unas líneas oscuras entre los extremos de las células, que pueden estar representando las interacciones especializadas del tejido cardíaco.

Existen proteínas que encontramos asociadas a ciertos tipos de células, denominados marcadores, ya que nos ayudan identificar a células pertenecientes a ciertos linajes específicos (Freshney, 2010), uno de estos de marcadores es la proteína conocida como desmina, la cual se encuentra en células del tipo muscular, y se evidenció al marcar con anticuerpos anti-desmina los cardiomiocitos aislados de los corazones de los fetos. En este sentido, al realizar el marcaje o la inmunotinción con este anticuerpo anti-desmina, en las células inducidas con medios condicionados, encontramos una reacción positiva, sin embargo esta fue menor en comparación con la reacción observada en los cardiomiocitos aislados. La reacción positiva

ante el anticuerpo, aparte de demostrar la presencia de desmina en las células inducidas, nos permitió observar la misma red de filamentos interna que se podía apreciar con la coloración PTAH. Así pues, la presencia de desmina muestra tener relación con estas redes internas, lo cual puede ser un indicio del inicio de un arreglo sarcomérico de las miofibrillas musculares, por cual se puede decir que la inducción al proceso de diferenciación cardíaca fue positivo. Igualmente, Xu y colaboradores en el 2004, luego de realizar un tratamiento con azacitidina durante dos semanas a CMM aisladas de médula ósea, encuentran positividad para la desmina y otros marcadores cardíacos así como también cambios morfológicos similares a los descritos anteriormente.

Es probable que la menor o baja intensidad del marcaje observada en este trabajo, puede estar asociado a una etapa de diferenciación temprana. Algunos autores reportan presencia de marcadores cardíacos positivos y morfología semejante a cardiomiocitos para 3 o 4 semanas de tratamiento (Antonitsis y col., 2007; Waheed y col., 2010) mientras que otros investigadores lograron la maduración total del aparato sarcomérico en las CMM inducidas con un tratamiento de heparina a los 60 días, observando a la desmina como parte de su pool de marcadores para identificar la diferenciación hacia el linaje cardíaco (Lin y col., 2016).

6. Evaluación morfológica de la inducción cardiomiogénica mediante el establecimiento de co-cultivos de CMM y células de corazón de fetos de ratón.

Al establecer los sistemas de co-cultivos, empezaron a verse cambios al tercer día en la morfología celular, donde las CMM indiferenciadas de forma fusiforme comenzaron a ampliar sus extremos agudos y su núcleo empezó a redondearse, transcurridos 7 días se pudo apreciar el establecimiento de conexiones semejantes a los discos intercalares entre las células, lo que ha sido descrito por Boheler y col. en el 2002, quienes consiguen que tras una

semana, las células madres embrionarias en un cultivo en 3D con cardiomiocitos y células epiteliales, pierden la morfología redonda y pequeña, alargándose y formando unas uniones célula-célula parecidas a las que se encuentran en el tejido cardíaco “in vivo”.

Posteriormente a los 14 días de co-cultivo, las células inducidas ya presentan una morfología cilíndrica con ramificaciones alargadas que interactúan con las células cercanas. Esta morfología y comportamiento fue descrito tanto por Li y col. en el 2007 como por Zheng y col. en el 2008, al establecer sistemas de co-cultivo de CMM de médula ósea con cardiomiocitos de ratas neonatales por dos semanas. Sin embargo, particularmente Li y colaboradores en el 2007, reportan contracción espontánea a los 7 días de cultivo a diferencia de lo observado en nuestro caso, lo cual puede haberse dado debido a que ellos distribuyen el sistema de co-cultivo de forma contraria, dejando en la parte superior a los cardiomiocitos, lo que podría estar asegurando de esta forma entonces, que los factores liberados por estos lleguen a las CMM, ubicadas en el compartimiento de abajo por acción gravitatoria, además ellos realizan cambios semanales de las poblaciones de miocitos cardíacos en los sistemas de co-cultivo, lo que podría estar promoviendo también la contracción espontánea de las células inducidas. Más tarde, a los 21 días las células inducidas mantienen la morfología cilíndrica con ramificaciones en los extremos, la cual se asemeja a la descripción de fibras musculares cardíacas hecha por Ross y Pawlina (2007).

Simultáneamente a estos cambios morfológicos, hubo una disminución en las células adheridas, ya que varias de las células sembradas en los co-cultivos se agregaron y posteriormente se desprendieron del inserto, estos agregados son semejantes a las cardioesferas que se forman de células madres cardíacas, encontradas por Messina y col. (2004), las cuales espontáneamente luego se diferencian a cardiomiocitos.

Es importante resaltar, que los cambios observados en las células inducidas mediante los sistemas de co-cultivos resultaron ligeramente menores con respecto a los observados al aplicar los medios condicionados, lo que no puede estar indicando que en este caso, los medios condicionados están siendo más efectivos a la hora de inducir hacia la diferenciación cardiaca. Estas diferencias podrían estarse generando debido a que quizás en el medio condicionado se encuentran una mayor concentración de promotores de la diferenciación cardiomiogénica, lo que podría estar promoviendo en mayor grado la diferenciación hacia el linaje cardiaco de las CMM.

6.1. Caracterización morfológica, histoquímica e inmunocitoquímica de la inducción cardiomiogénica.

Las células inducidas, que permanecieron adheridas a los insertos, mediante las coloraciones de rutina aplicadas, se pudo observar que mantuvieron la morfología cilíndrica, con el núcleo central semejante a la morfología de los cardiomiocitos anteriormente descrita. Además presentaron en los bordes internos del citoplasma estriaciones visibles, reveladas por la coloración PTAH, lo cual concuerda con lo descrito por Wobus y col., en el 2002 en las etapas tempranas de diferenciación al linaje cardiaco de células madres embrionarias, en las cuales se pueden apreciar miofibrillas dispersas o un desarrollo fibrilar desorganizado (Wobus y col., 2002 citado por Boheler y col., 2012).

Otros autores, tales como Mummery y colaboradores (2002 y 2003), quienes inducen la diferenciación cardiaca por medio de sistemas de co-cultivo de células madres embrionarias humanas con células endodérmicas, muestran en sus resultados la morfología cilíndrica de las células inducidas, la cual es semejante a la reportada en este trabajo.

La reacción positiva por parte del anticuerpo anti-desmina, especialmente en los bordes de la célula, nos indica la presencia de este desarrollo fibrilar por la función que tiene la desmina en la formación de los sarcómeros. La positividad de este marcador también es reportada por Li y col. en el 2007 en la CMM inducidas a linaje cardiaco mediante sistema de co-cultivos con miocitos de ventrículo de ratas neonatales. Sin embargo, al igual que las células inducidas por medios condicionados, el marcaje fue menor en relación con los cardiomiocitos, lo que nos puede estar indicando un desarrollo fibrilar temprano.

6.2. Histología de los agregados formados por las células inducidas.

Para poder determinar el estado de diferenciación de las células que formaron los agregados, se realizó la tinción PTAH a los cortes histológicos obtenidos de éstos. Al ser una estructura tridimensional se observan regiones donde las células están cortadas transversal y longitudinalmente, en este último caso se observan las células alargadas ubicada paralelamente, semejante a la organización *in vivo* de las fibras musculares cardíacas (Gartner y Hiatt, 2002) lo que nos puede estar indicando que hay tanto un cambio de forma hacia la morfología cilíndrica de las células inducidas que componen el agregado, como un proceso de organización paralela entre las células, lo que podría estar asociado a un proceso de diferenciación temprano hacia linaje cardiomiogénico. Estos resultados son semejantes a lo observado en el corte de corazón, así como a lo reportado por Messina y col., 2004, al marcar con anticuerpos los criocortes de los agregados de células progenitoras cardíacas denominadas cardioesferas.

Al observar con mayor detalle, inclusive se logró apreciar unas líneas oscuras escalonadas entre las células cortadas longitudinalmente que se puede inferir que corresponde a los discos intercalares.

6.3. Comparación de perfiles proteicos de las células inducidas con las CMM y corazón.

Comparando los perfiles proteicos obtenidos luego de la corrida electroforéticas encontramos que las CMM inducidas en los sistemas de co-cultivo, presentan una composición intermedia entre el fenotipo cardíaco y el fenotipo indiferenciado de las CMM, ya que posee bandas de proteínas semejantes a las bandas de proteínas obtenidas en las electroforesis en geles de poliacrilamida de las CMM y células del corazón. Las bandas en común con las CMM, podrían estar compuestas por Endoplasmina (Banda 1), una proteína asociada al retículo endoplasmático específicamente en mamíferos, que puede servir como marcador de este organelo (Koch y col., 1988), que presenta un peso molecular de 92.6 KDa y es encontrado en las CMM, y por la vimentina (Banda 2) que presenta un peso molecular de 53.6 KDa (Zagoura y col., 2013) y la cual obtuvo reacción positiva al inmunocarraje en las CMM en este trabajo. La única banda en común con los componentes proteicos cardíacos, puede estar representada por la α -actina cardíaca (Banda 3), la cual forma parte de la composición del citoesqueleto y cumple una función en la maquinaria contráctil de las células musculares cardíacas, presentando un peso molecular de 41.8 KDa (Leone, 2013), semejante al encontrado en nuestros resultados. Por último, las bandas 4 y 5, presentaron un bajo peso molecular de entre 20-30 KDa y de aproximadamente 1 KDa respectivamente, donde la banda 4 podría estar representada por la proteína Glutathione S-Transferasa P, la cual es una chaperona asociada a la respuesta ante el stress celular, reportada con un peso molecular cercano a 23.5 KDa tanto para perfiles proteicos de CMM y de células de corazón (Zagoura y col., 2013; Leone, 2013). La banda 5 podría corresponder a la Carnitina o-palmitoyltransferasa 2 mitocondrial que es una proteína ubicada en la membrana interna de

la mitocondria (Leone, 2013) con un función en el metabolismo de ácidos grasos (Rufer y col., 2006).

Este perfil proteico intermedio presentado por las células inducidas por los co-cultivos, nos puede estar indicando que hay una inducción temprana hacia la diferenciación cardiaca, lo cual coincide con los resultados obtenidos a nivel morfológico, y para que el proceso de diferenciación se de en su totalidad podría requerirse de un mayor tiempo de cultivo o inclusive agregar al medio base algunos factores de crecimiento que favorezcan la diferenciación completa hacia el linaje cardiaco.

8. CONCLUSIONES

Las poblaciones de células madres mesenquimales se lograron aislar de las diferentes regiones del cordón umbilical humano, con una mayor eficiencia mediante las técnicas de disgregación enzimática. Estas células se mantuvieron en cultivo en condiciones óptimas que permitieron su proliferación hasta el sexto subcultivo con sus características morfológicas sin rasgos de senescencia.

una vez establecidos los cultivos de las células madres mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano se indujeron hacia el linaje cardiomiogénico, evidenciándose características similares a las células cardiacas aisladas de los corazones de fetos de ratón, tanto el uso de medios condicionados obtenidos de cultivos de corazones de fetos de ratón como el establecimiento de sistemas de co-cultivo entre las CMM y los cardiomiocitos aislados de los corazones de fetos de ratón, permitieron la diferenciación temprana hacia el linaje cardiaco de las células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical humano, siendo más evidente la inducción en cultivos tratados con medios condicionados a nivel morfológico, aunque en los sistemas de co-cultivos se evidenció la expresión de proteínas similares a las del tejido cardiaco como el comportamiento semejante al de los progenitores cardiacos en cultivo.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Anker, P., Scherjor, S. A., Kleijburg- van der Keur, C., de Groot-Swings, G. M. J. S., Claas, F. H. J., Fibbe, W. E., Kanhai, H. H. H. 2004. Isolation of Mesenchymal Stem Cells of Fetal or Maternal Origin from Human Placenta. *Stem Cells*. **22**:1338–1345
2. Araos, C. 2009. Cultivo de Células Madre Mesenquimales del Cordón Umbilical Humano. Potencialidad Ósteo- Condrogénica “in vitro”. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
3. Arévalo, J., Páez, D., Rodríguez, V. 2007 Células Madre Mesenquimales: Características Biológicas y Aplicaciones Clínicas. *NOVA* **5**: 101-212
4. Baksh, D., Yao, R., Tuan, R. S. 2007. Comparison of Proliferative and Multilineage Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord and Bone Marrow. *Stem Cells*. **25**: 1384–1392
5. Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Gehron, P. 2001. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology and Potential Applications. *Stem Cells* **19**: 180-192.
6. Bishop, A., Gallup, B., Skeate, Y., Dubowitz, V. 1971. Morphological Studies on Normal and Diseased Human Muscle in Culture. *J. Neurol.Sci.* **13**: 333-350.
7. Bieback, K., Kern, S., Klüter, H., Eichler, H. 2004. Critical Parameters for the Isolation of Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood. *Stem Cells*. **22** :625–634.
8. Cabero. R, L., Saldivar. R, D. 2007. Obstetricia y Medicina Materno- Fetal. Ed. Medica Panamericana. Madrid, España.
9. Calderón, D. 2007. Establecimiento del Cultivo de Células Mesenquimales del Cordón Umbilical Humano y Estudio de su Potencialidad de Diferenciación *in vitro*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.
10. Cao, B., Li, Z., Peng, R., Ding, J. 2015. Effects of the Cell-Cell Contact and Oxygen Tension on Chondrogenic Differentiation of Stem Cells. *Biomaterials*. **64**: 21-32.
11. Chao, K., Chao, K., Fu, Y., Liu, S. 2008. Islet-like Cluster Derived from Mesenchymal Stem Cells in Wharton’s Jelly of the Human Umbilical Cord for Transplantation to Control Type 1 Diabetes. *Plos ONE*. **3**: e1451. doi:10.1371/journal.pone.0001451
12. Coetzee, G., Gevers, W. 1978. Myosin in Primary Cultures of Hamster Heart Cells. *Dev. Biol.* **63**: 128-138.

13. Corning. 2013. Transwell Permeable Supports Selection and Use Guide. Corning Incorporated. Estados Unidos
14. Cuhna. F, A., Gallo. V, M., Maria. F, R., Mauad. F, M. 2012. Cordón Umbilical y Membranas. Págs. 177-180 en: Mauad. F, M., Cuhna. F, A., Naves do Amaral, W. (Eds.), Ultrasonografía en Ginecología y Obstetricia: Guía Práctica. Amolca. México. D.F, México.
15. den Haan, A., Veldkamp, M., Bakker, D., Boink, G., Janssen, R., Bakker, J., Tan, H. 2014. Organ Explant Culture of Neonatal Rat Ventricles: A New Model to Study Gene and Cell Therapy. *Plos One*. **8**: e59290. doi:10.1371/journal.pone.0059290 (Consulta en línea: 09-10-2016)
16. Ding, D., Chang, Y., Shyu, W., Lin, S. 2015. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: A New Era for Stem Cell Therapy. *Cell. Transplant*. **24**: 339-347.
17. Dominici, M., LeBlank, K., Mueller, I., Slaper-Conterbachi, F., Krause, D., Deans, R., Kreating, A., Prockop, D., Horwitz, E. 2006. Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stroma Stem Cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**: 315-317.
18. Ericksson, J., Dechat, T., Grin, B., Helfand, B., Mendez, M., Pallari, H., Goldman, R. 2009. Introducing Intermediate Filaments: From Discovery to Disease. *J. Clin. Invest*. **119**: 1763-1771.
19. Eroschenko, V. (1995). Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Williams&Williams. 8va Edición. Canadá.
20. Eshgui, S., Schaffer, D. (2008). Engineering Microenvironments to Control Stem Cells Fate and Function. StemBook, Ed. The Stem Cell Research Community, Massachusetts, USA.
21. Flores, F. A. 2010. Guía de Embriología Humana: Placenta y Anexos Fetales. [en línea] Universidad de los Ángeles de Chimbote, Chimbote, Perú. http://files.uladech.edu.pe/docente/25558907/EMBRIOLOGIA_HUMANA/SESION_06/PLACENTA_Y_MEMBRANAS_FETALES.pdf [Consulta: 28 Diciembre 2015]
22. Franke, W., Schmid, E., Osborn, M., Weber, K. 1978. Different Intermediate-size Filaments Distinguished by Immunofluorescence Microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci*. **75**: 5034-5038
23. Freshney, I. 2010. Culture of Animals Cells: A Manual of Basic Techniques and Specialized Applications. Editorial Wiley-Blackwell. Sexta edición. New Jersey, Estados Unidos.
24. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R., Latsinik, N., Panasyuk, A., Keiliss-Borok, I. 1974. Stromal Cells Responsible for Transferring the Microenvironment of Hemopoietic Tissues: Cloning In Vitro and Replantation. *Transplantation*. **17**: 331-340

25. Gang, E., Jeong, J., Hong, S., Hwang, S., Kim, S., Yang, I., Ahn, C. y colaboradores. 2004. Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. *Stem Cells*. **22**: 617-624.
26. Gartner, L., Hiatt, J. 2002. Texto atlas de Histología. McGraw-Hill Interamericana. 2da edición. México D.F.
27. Goers, L., Freemont, P., Polizzi, K.M. 2014. Co-culture Systems and Technologies: Taking Synthetic Biology to the Next Level. *J. R. Soc. Interface* **11**: 00-65
<http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0065> [Consulta en línea 02/01/2016]
28. Granger, B., Lazarides, E. 1979. Desmin and Vimentin Coexist at the Periphery of Myofibril Z Disc. *Cell*. **18**: 1053-1063.
29. Gronthos, S., Zannettino, A., Hay, S., Shi, S., Graves, S., Kortessidis, A., Simmons, P. J. 2003. Molecular and Cellular Characterization of Highly Purified Stromal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow. *J. Cell. Sci.* **116**: 1827-1835
30. Hernández, D., Millard, R., Sivakumaran, P., Wong, R., Crombie, D., Hewitt, A., Liang, H., Hung, S., Pébay, A., Shepherd, R., Distingu, G., Lim, S. 2015. Electrical Stimulation Promotes Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International*. **2016**: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1718041> [Consulta en línea 22/9/2016]
31. Hickman, C. P., Roberts, L. S., Larson, A., l'Anson, H., Eisenhour, D. J. 2002. Principios Integrales de Zoología. Editorial McGraw-Gill Interamericana. Edición 13ava. Madrid, España.
32. Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J. M., Bunnell, B. A. 2006. Biologic Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Adipose Tissue. *J. Cell. Biochem.* **99**: 1285–1297.
33. Jacobs, S., Roobrouck, V., Verfaillie, C., Van Gool, S. 2013. Immunological Characteristics of Human Mesenchymal Stem Cells and Multipotent Adult Progenitor Cells. *Immunol. Cell Biol.* **91**: 32-39
34. Johnson, R., Dlodla, P., Muller, C. J. F., February, F., Louw, J. 2014. Recommendations for Short Term Culturing of Viable Rod Shaped Rat Cardiomyocytes. *Bioenergetics*. **3**: <http://dx.doi.org/10.4172/2167-7662.1000116> (Consulta en línea 09/10/2016).
35. Karahuseyinoglu, S., Cinar, O., Kilic, E., Kara, F., Akay, G. G., Demiralp, D. O., Tukun, A. y colaboradores. 2007. Biology of Stem Cells in Human Umbilical Cord Stroma: In Situ and In Vitro Surveys. *Stem Cells*. **25**: 319–331

36. Kawada, H., Fujita, J., Kinjo, K., Matsuzaki, Y., Tsuma, M., Miyatake, H., Muguruma, Y. y colaboradores. 2004. Nonhematopoietic Mesenchymal Stem Cells can be Mobilized and Differentiate into Cardiomyocytes after Myocardial Infarction. *Blood*. **104**: 3581-3587
37. Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., Bieback, K. 2006. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood or Adipose Tissue. *Stem Cells*. **24**: 1294–1301
38. Kim, D., Staples, M., Shinozuka, K., Pantcheva, P., Kang, S., Borlongan, C. V. 2013. Wharthons Jelly- Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 11692- 11712.
39. Koch, G., Macer, D., Wooding, F. 1988. Endoplasmin is a Reticuloplasmin. *J. Cell Sci.* **90**: 485-491.
40. Koyanagi, M., Haendeler, J., Badorff, C., Brandes, R., Hoffman, J., Pandur, P., Zeiher, A. y colaboradores. 2005. Non-canonical Wnt Signaling Enhances Differentiation of Human Circulating Progenitor Cells to Cardiomyogenic Cells. *J. BIOL. CHEM.* **280**: 16838–16842
41. Laemmli, U. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. **227**: 680-685.
42. Leone, R. 2013. Análisis Proteómico del Musculo Cardíaco de Ratto in curso d'invecchiamento. Tesis Doctoral. Universidad de Milan. Milan. Italia.
43. López R., Álvarez M., Merentes E. Caracterización de Células Mesenquimales de la Membrana Amniótica Humana usando Sondas Fluorescentes. III Congreso de Ciencia Tecnología e Innovación, 27-29 de Noviembre de 2014. Caracas
44. Li, D., Wu, J., Bai, Y., Zhao, X., Liu, L. 2014 Isolation and Culture of Adult Mouse Cardiomyocytes for Cell Signaling and *in vitro* Cardiac Hypertrophy. *J. Vis. Exp.* **87**: doi:10.3791/51357. (Consulta el 09 de octubre de 2016).
45. Li, X., Yu, X., Lin, Q., Deng, C., Shan, Z., Yang, M., Lin, S. 2007. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Functional Cardiac Phenotypes by Cardiac Microenvironment. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**: 295-303.
46. Lin, Y., Linask, K., Mallon, B., Johnson, K., Klein, M., Beers, J., Xie, W., Du, Y., Liu, C., Lai, Y., Zou, J., Haigney, M., Yang, H., Rao, M., Chen, G. 2016. Heparin Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Chemically Defined Albumin- Free Medium, Enabling Consistent Manufacture of Cardiomyocytes. *Stem Cells Transl. Med.* **5**:1-12

<http://stemcellstm.alphamedpress.org/content/early/2016/09/02/sctm.2015-0428.long>

[Consulta 22/09/2016]

47. Lu, L., Liu, Y., Yang, S., Zhao, Q., Wang, X., Gong, W., Han, Z. y colaboradores. 2006. Isolation and characterization of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells with Hematopoiesis: Supportive Function and other Potentials. *Haematologica* **91**: 1017-1026.
48. Merentes, E. 2009. Fuentes de Obtención de Células Madre Mesenquimales Potencialidad de Diferenciación *in vitro*. Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
49. Merrill, C., Golman, D., Van Keuren, M. 1982. Simplified Silver Protein Detection and Image Enhancement Methods in Poliacrilamide gel. *Electrophoresis*.**3**: 17-23.
50. Messina, E., De Angelis, L., Frati, G., Morrone, S., Chimentin, S., Fiordaliso, F., Salio, M., y colaboradores. 2004. Isolation and Expansion of Adult Cardiac Stem Cells from Human and Murine Heart. *Circ. Res.* **95**: 911-921.
51. Mitchenson, J., Hancox, J., Levi, A. 1998. Cultured Adult Cardiac Myocytes: Future Applications, Culture Methods, Morphological and Electrophysiological Properties. *Cardiovasc. Res.* **39**: 280-300.
52. Mummery, C., van Oostwaard, D., Doevendans, P., Spijker, R., Van den Brink, C. E., Hassink, R., van de Heyden, M. y colaboradores. 2003. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes Role of Coculture with Visceral Endoderm-Like Cells. *Circulation*. **107**: 2733-2740
53. Mummery, C., Ward, D., Van den Brink, C. E., Bird, S. D., Doevendans, P.A., Opthof, T., Brutel de la Riviere, A. y colaboradores. 2002. Cardiomyocyte Differentiation of Mouse and Human Embryonic Stem Cells. *J. Anat.* **200**: 233–242
54. Passier, R., Ward-van Oostwaard, D., Snapper, J., Kloots, J., Hassink, R., Kuij, E., Roelen, B. y colaboradores. (2005). Increased Cardiomyocyte Differentiation from Human Embryonic Stem Cells in Serum-Free Cultures. *Stem Cells*. **23**: 772–780.
55. Phadwal, K., Watson, A., Simon, A. 2013. Tightrope Act: Autophagy in Stem Cells Renewal, Differentiation, Proliferation and Aging. *Cell Mol. Life Sci.* **70**: 89- 103.
56. Plotnikov, E., Khryapenkova, T., Vasileva, A., Marey, M., Galkina, S., Isaev, N., Sheval, E. y colaboradores. 2007. Cell-to-Cell Cross-talk between Mesenchymal Stem Cells and Cardiomyocytes in Co-culture. *J. Cell. Mol. Med.* **12**: 1622-1631

57. Qian, Q., Qian, H., Zhang, X., Zu, W., Yan, Y., Ye, S., Peng, X. y colaboradores. 2012. 5-Azacytidine induces Cardiac Differentiation of Human Umbilical Cord- Derived Mesenchymal Stem Cells by Activating Extracelular Regulated Kinase. *Stem. Cells. Dev.* **21**: 67-75.
58. Qiao, X., Xu, W., Zhu, W., Hu, J., Qian, H., Yin, Q., Jiang, R. y colaboradores. 2008. Human Mesenchymal Stem Cells isolated from Umbilical Cord. *Cell. Biol. Int.* **32**: 8- 15
59. Rangappa, S., Fen, C., Lee, H., Bongso, A., Wei, K, E. S. 2003. Transformation of Adult Mesenchymal Stem Cells Isolated From the Fatty Tissue Into Cardiomyocytes. *Ann. Thorac. Surg.* **75**: 775–9
60. Rodríguez, M. 2010. Estudio Comparativo Del Potencial de Diferenciación hacia Linaje Epitelial De las Células Madres Mesenquimales Provenientes Del Tejido Adiposo de Ratón y Humano. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
61. Rojas, M., Meruane, M. 2012. Potencialidad celular evolutiva y medicina regenerativa. *Int. J. Morphol.* **30**: 1243-1251.
62. Romanov, Y. A., Svinsitskaya, V. A., Smirnov, V. N. 2003. Searching for Alternatives Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells.* **21**: 105–110
63. Ross, M., Pawlina, W. (2008). *Histología: Texto y Atlas a Color con Biología Celular y Molecular*. Médica Panamericana. 5ta edición. Buenos Aires, Argentina.
64. Rufer, A., Thoma, R., Benz, J., Stihle, M., Gsell, B., De Roo, E., Banner y colaboradores. 2006. The Crystal Structure of Carnitine Palmitoyltransferase 2 and Implications for Diabetes Treatment. *Structure.* **14**: 713-723.
65. Salameh, A., Dhein, S. 2005. Culture of Neonatal Cardiomyocytes. Págs. 568-576 en: Dhein, S., Mohr, F., Delmar, M. (Eds.), *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Editorial Springer. Berlin. Alemania.
66. Schittini, A., Celedon, P., Stimamiglio, M., Krieger, M., Hansen, P., Affonzo da Costa, Francisco., Goldenberg, Samuel. y colaboradores. 2010. Human Cardiac Explant-conditioned medium: Soluble Factors and Cardiomyogenic effect on Mesenchymal Stem Cells. *Exp. Biol. Med.* **235**: 1015–1024.
67. Schlüter, K., Piper, H. 2005. Isolation and Culture of Adult Ventricular Cardiomyocytes. Págs 557-567 en: Dhein, S., Mohr, F., Delmar, M. (Eds.), *Practical Methods in Cardiovascular Research*. Editorial Springer. Berlin. Alemania.

68. Schwarzfeld, T., Jacobson, S. 1980. Isolation and Development in Cell Culture of Myocardial Cells of the Adult Rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **13**: 563-575
69. Stecklum, M., Wulf-Goldenberg, A., Purfust, B., Siegert, A., Keil, M., Eckert, K., Finchtner, I. 2015. Cell differentiation mediated by Co-culture of Human Cord Blood Stem Cells with Murine Hepatic Cells. *In Vitro Cell.Dev.Biol.* **51**: 183-191.
70. Scott, Gilbert. (2006). *Biología del Desarrollo*. Editorial Médica Panamericana. 7ma Edición. Buenos Aires, Argentina.
71. Shen, H., Wang, Y., Zhang, Z., Yang, J., Hu, S., Shen, Z. 2015. Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Regenerative Therapy: Optimization of Cells Differentiation Strategy. *Stem Cells International*. **2015**: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/524756> [Consulta 22/09/2016]
72. Shi, S., Wu, X., Wang, X., Hao, W., Miao, H., Zhen, L., Nie, S. 2016. Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Cardiomyocyte- Like Cells Is Regulated by the Combined Low Dose Treatment of Transforming Growth Factor B1 and 5 azacytidine. *Stem Cells International*. **2016**: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3816256> [Consulta 22/09/2016]
73. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., Kessler, P. D. 2002. Human Mesenchymal Stem Cells Differentiate to a Cardiomyocyte Phenotype in the Adult Murine Heart. *Circulation*. **105**: 93-98
74. Ullah, I., Baregundi, R., Rho, G. J., 2015. Human Mesenchymal Stem Cells: Current Trends and Future Prospective. *Biosci. Rep.* **35**: <http://www.bioscirep.org/content/35/2/e00191.full-text.pdf> [Consulta 02/09/2016].
75. Waheed, I., Mnati, I., Kadhim, A. 2010. *In vitro* Study of Adult Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived from Albino Rats and their Cardiomyogenic Differentiation. *Jordan j. Biol. Sci.* **3**: 185-192.
76. Wang, H., Hung, S., Peng, S., Huang, C., Wei, H., Guo, Y., Fu, Y. y colaboradores. 2004. Mesenchymal Stem Cells in the Whaton's Jelly of the Human Umbilical Cord. *Stem Cells*. **22**: 1330-1337.
77. Willerth, S., Rader, A., Sakiyama-Elbert, S. 2008. The Effect of Controlled Growth Factor Delivery on Embrionic Stem Cell Differentiation inside of Fibrin Scaffolds. *Stem Cells Res.* **1**: 205-2018.
78. Xu, W., Zhang, X., Qian, H., Zhu, W., Sun, X., Hu, J., Zhou, H., y colaboradores. 2004. Mesenchymal Stem Cells from Adult Human Bone Marrow Differentiate into a Cardiomyocyte Phenotype In Vitro. *Society for Exp. Biol. Med.* **229**: 623-631

79. Zagoura, D., Trohatou, O., Bitsika, V., Makridakis, M., Pappa, K., Vlahou, A., Roubelakis, M., Anagnou, N. 2013. AF-MSC Fate can be regulated by Culture Conditions. *Cell Death Dis.* **4**: e571; doi:10.1038/cddis.2013.93 [consulta 10 de octubre 2016]
80. Zhang, J., Klos, M., Wilson, G., Herman, A., Lian, X., Raval, K., Barron, M., y colaboradores. 2012. Extracellular Matrix Promotes Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells: The Matrix Sandwich Method. *Circ. Res.* **111**: 1125-1136
81. Zheng, J., Wang, Y., Wei, Y., Xie, A., Lou, Y., Zhang, M. 2008. Co-culture with Cardiomyocytes induces Mesenchymal Stem Cells to Differentiate into Cardiomyocyte-Like Cells and Express Heart Development-associated genes. *Cell Res.* **18**: s62. doi: 10.1038/cr.2008.152. Sesión tipo Poster. [Consulta 18 de agosto de 2016]

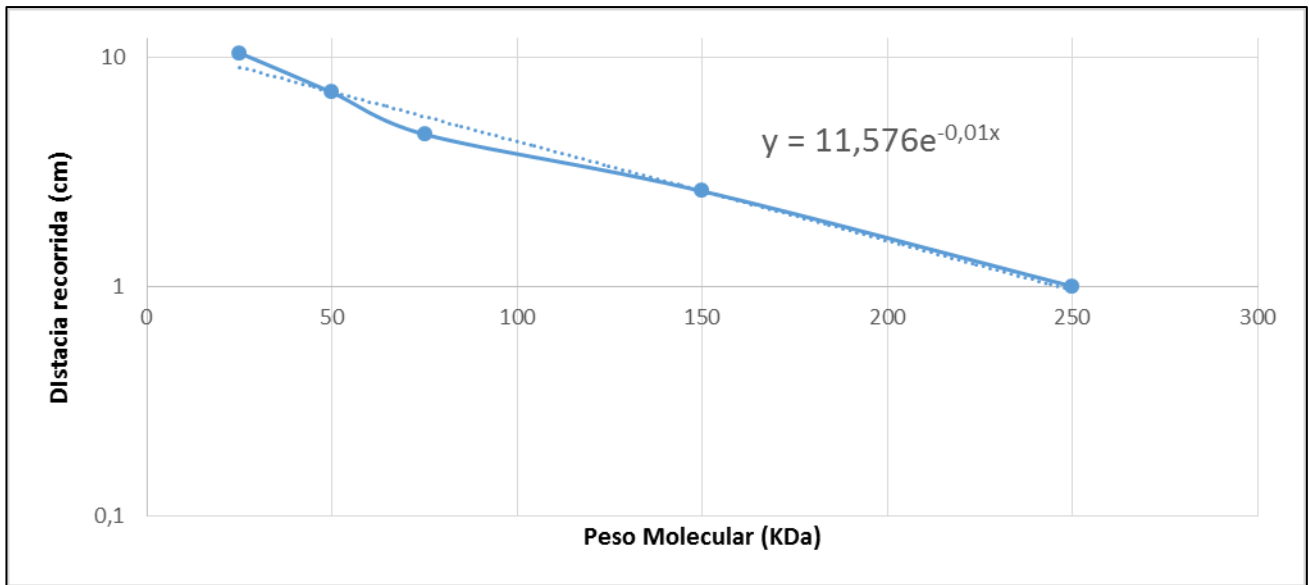
Consultas en línea

- <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/oi/authority.20110803095631131> [Consulta el 03 de enero de 2016]
- http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/clonembrion.htm#_Toc3643836 [Consulta el 11 de diciembre de 2015]
- <http://www.elsevier.es/es-revista-cardioco-298-articulo-que-es-una-celula-madre-90001321> [Consulta el 03 de enero de 2016]
- <http://factorstem.es/celulas-madre/> [Consulta el 04 de enero de 2016]
- <http://cuidadoinfantil.net/complicaciones-con-el-cordon-umbilical.html> [Consulta el 25 de enero de 2016]
- <https://elcuerpohumanoedwin.wordpress.com/el-corazon/> [Consulta el 27 de enero de 2016]
- http://mmegias.webs.uvigo.es/a-imagenes-grandes/muscular_cardiaco.php [Consulta el 06 de enero de 2016]
- <https://www.urmc.rochester.edu/urmc-labs/pathology/stainsmanual/index.html?MICROWAVEMALLORYSPHOSPHOTUNGSTICACIDHEMATOXYLINMETHODPTAH>. [Consulta el 03 de octubre de 2016]
- <http://www.histalim.com/accueil/activities/our-services/histology/may-grunwald-giemsal> [Consulta el 08 de agosto de 2016]
- https://www.labce.com/spg531616_phosphotungstic_acid_hematoxylin_ptah_staining__c.aspx [Consulta el 09 de octubre de 2016]

10. ANEXOS

Anexo1. Tabla de los Peso Moleculares hallados para las proteínas de las CMM, Células inducidas por co-cultivo y corazón en relación a su distancia.

CMM		Células inducidas por co-cultivo		CORAZÓN	
Distancia	PM	Distancia	PM	Distancia	PM
0.7	280.56	4.6	92.28	0.3	365.29
1.2	226.66	6.1	64.06	0.7	280.56
1.8	186.11	7	50.30	1.4	211.24
3.3	125.50	7.4	44.74	3.1	131.75
4.6	92.28	8.6	29.71	4.9	85.96
7	50.30	11.6	-0.2	6.3	60.83
7.8	39.48			7.5	43.40
9.1	24.07			7.9	38.20
11	5.10			9.2	22.97
11.4	1.53			10	14.63
				11.6	-0.20



Anexo 2. Curva de calibración hecha con los marcadores de peso molecular (MPM) para hallar luego los pesos moleculares de las bandas con proteínas de las CMM, células inducidas por co-cultivo y de corazón.