



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

**DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ADSCs) EN CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE COCULTIVO INDIRECTO: PROLIFERACIÓN CELULAR Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CARDÍACAS.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERÍA BIOMÉDICA)**

PRESENTA:

LIC. TERESA GÓMEZ QUINTERO

**DIRECTORES DE TESIS:**

DRA. ATLÁNTIDA M. RAYA RIVERA

DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ

**JURADO EVALUADOR:**

PRESIDENTE:

DR. ROBERTO OLAYO GONZÁLEZ

SECRETARIO:

DR. JOSÉ RAFAEL GODÍNEZ FERNÁNDEZ

VOCAL:

DR. ALEJANDRO MARTÍNEZ HERRERA

CDMX, ABRIL 2018

## *Agradecimientos*

Al programa de Becas de CONACyT por el apoyo económico.

Al personal de laboratorio que me asistió a lo largo de mis pruebas; con especial atención al

Dr. Ismael Medina y al Laboratorista Clínico Marco Antonio Ochoa Arias.

Al Dr. Diego R. Esquiliano Rendón que me apoyó e instruyó a lo largo de todo el protocolo experimental.

## *Dedicatoria*

A mi incondicional familia: Gerardo, Lorena, Eduardo y Daniela. Por su apoyo y cariño incondicionales.

A mis amigas que volvieron: Karen y Ana; a mis nuevos amigos: Alida, Misael y Noé. A mi amigo que estuvo siempre: Israel.

A mis primos Fabián y Stephanie, junto con sus padres Noé y Patricia; por estar conmigo en tiempos difíciles.

A mis abuelas, por cuidarme y esperar siempre mi regreso: A mi *Tita* por siempre estar pendiente de mí; a mi abuelita *Chilo* por habernos recibido con una sonrisa toda su vida.

A mis profesores: Atlántida y Roberto, sin quienes este trabajo no hubiera sido posible.

A Simba, por esperarme siempre (24 de marzo de 2018).

A todas las personas que estuvieron conmigo el último año, nuevas o reconquistadas; por sus palabras, ayuda y paciencia. No fui la mejor versión de mi misma, pero contribuyeron en mucho a mis mejoras.

Gracias por todo.

# Índice de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>ADSCs</b>	Células madre derivadas de tejido adiposo
<b>BMSCs</b>	Células madre derivadas de médula ósea
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular
<b>SVCs</b>	Células vasculares estromales

# Índice

Resumen .....	07
Abstract .....	09
1. Introducción .....	11
El tejido cardíaco en ingeniería de tejidos	
1.1 Marco teórico .....	14
Células madre y su función	
¿Por qué ADSCs sobre BMSCs?	
Tejido adiposo: Obtención y cultivo	
Caracterización de ADSCs: Inmunofenotipos	
Cardiomiocitos: Generalidades y caracterización	
Inmunofenotipo cardíaco	
Diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos	
1.2 Proyecto General .....	18
1.3 Justificación .....	19
1.4 Planteamiento del problema .....	19
1.5 Objetivo general .....	20
1.6 Objetivos específicos .....	20
1.7 Hipótesis .....	20
2. Materiales y métodos .....	21
2.1 Obtención y cultivo primario de ADSCs .....	23
2.2 Cultivo primario de cardiomiocitos de conejo .....	24
2.3 Pruebas de diferenciación de ADSCs usando 5-Azacitidina .....	25
2.4 Pruebas de diferenciación de ADSCs por Co-Cultivo indirecto empleando medio condicionante de cardiomiocitos de conejo .....	25
2.5 Pruebas de caracterización .....	26
Inmunotinción	
Citometría de flujo	
Ensayo MTT	
3. Resultados y discusión .....	28
3.1 ADSCs tratadas con 5-Azacitidina .....	28
3.1.1 Inmunocitoquímica ADSC y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (marcaje actina) .....	33
3.1.2 Inmunocitoquímica ADSC y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (marcaje miosina) .....	35
3.1.3 Inmunocitoquímica ADSC y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (marcaje desmina) .....	37
3.1.4 Inmunofluorescencia ADSC, tejido nativo y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (marcaje troponina cardíaca T) .....	38
3.2 ADSCs en Co-Cultivo indirecto .....	39
3.2.1 Inmunocitoquímica tejido nativo cardíaco y ADSCs en Co-Cultivo indirecto (marcaje actina)	

.....	41
3.2.2 Inmunocitoquímica ADSCs en Co-Cultivo indirecto y tejido nativo (marcaje miosina) .....	43
3.2.3 Inmunocitoquímica ADSCs en Co-Cultivo indirecto y tejido nativo (marcaje desmina) .....	45
3.2.4 Inmunofluorescencia ADSCs en Co-Cultivo indirecto. Tejido nativo y ADSCs en Co-Cultivo indirecto (marcaje Troponina cardíaca T) .....	47
3.3 Citometría de flujo para marcadores cardíacos .....	48
3.4 Resumen de expresión de marcadores de superficie .....	49
3.5 Viabilidad celular de grupos experimentales .....	50
3.6 Binucleación .....	51
3.6.1 ADSCs tratadas con 5-Azacitidina .....	51
3.6.2 ADSCS tratadas en Co-Cultivo indirecto .....	54
4. Conclusiones .....	57
Bibliografía .....	59
Anexo .....	63

# *Resumen*

**Introducción.** El campo de la ingeniería de tejidos se proyecta como una de las opciones más prometedoras dentro de las ramas de la medicina regenerativa, para la generación o reconstitución de órganos y tejidos en la aplicación clínica. La fabricación de implantes autólogos funcionales para uretra, vejiga, esófago y piel a partir de combinar células madre derivadas de tejido adiposo o de médula ósea combinadas con andamios biocompatibles, son los ejemplos representativos del potencial clínico de la disciplina. Sin embargo, la fabricación de órganos complejos como riñón, pulmón, hígado y corazón aún representa un reto tecnológico considerable; comenzando por la fuente de obtención de células autólogas altamente especializadas que tales órganos requieren.

La disponibilidad de órganos para trasplante se ve reducida ante la carencia de donaciones, el bajo porcentaje de órganos que pueden ser trasplantados y los problemas de histocompatibilidad, aunado al riesgo de rechazo y pérdida del órgano trasplantado; por lo que el desarrollo de diferentes proyectos de investigación que buscan mejorar o brindar una mejor alternativa al procedimiento actual de trasplante va en auge. Las principales vertientes tecnológicas abordadas para solventar la demanda creciente de órganos y tejidos se centran en el desarrollo de mejores biomateriales para injerto y cultivo celular, la bioimpresión en 3D de estructuras celulares, los xenotrasplantes, la descelularización y repoblación de matriz extracelular de órganos y tejidos. De todas, esta última, se ha convertido en una de las opciones más atractivas para la obtención de tejidos u órganos debido a que preserva la mayoría de los componentes estructurales de la matriz extracelular y elimina la mayor parte de los componentes con ADN del donador; teniendo mejores condiciones para la adhesión de las células del futuro receptor y menor riesgo de incompatibilidad. Los modelos animales y cadavérico humano explorados con esta técnica han mostrado resultados importantes; sin embargo, la repoblación de los tejidos se realiza con cultivos primarios (cuya obtención y expansión está limitada para varios tipos celulares, entre ellos, miocitos cardíacos). Obtener un gran número de células autólogas para repoblar la matriz extracelular del órgano se convierte en una condición necesaria para producir órganos complejos: riñón, pulmón o corazón, por ejemplo.

Se han reportado diversos protocolos para la inducción de células madre (derivadas de médula ósea o de tejido adiposo), todavía no está establecido un método que permita dicha transformación eficientemente. El método reportado más efectivo es el de Co-Cultivo directo: poniendo células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) en contacto directo con células de cultivo primario, en proporciones desiguales, donde los cardiomiocitos nativos superan por mucho la cantidad de células madre por diferenciar. Este método tiene grandes inconvenientes para la aplicación clínica de los injertos, pues requiere de perfeccionar el método de separación de ambas poblaciones celulares y presenta una complicación extra al tratarse de un cultivo primario de tejido cardíaco o pulmonar (donde la toma de biopsia confiere un riesgo alto para el paciente tratado o el donante).

**Materiales y métodos.** Este trabajo se centró en la diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) de conejo en células musculares cardíacas a través de Co-Cultivo indirecto (utilizando un medio condicionado para cardiomiocitos); con el objetivo de averiguar si este tipo de células madre pueden ser transformadas a musculares cardíacas a través de las condiciones de cultivo en comparación con otro método previamente reportado en el mismo modelo, donde se utiliza un fármaco anticancerígeno, 5-Azacidina, y se verificó la presencia de proteínas cardíacas. Se consideraron 4 grupos experimentales para el análisis: ADSCs sin tratamiento (control negativo);

tejido nativo (control positivo); ADSCs tratadas con 5-Azacitidina y ADSCs tratadas por Co-Cultivo indirecto.

Se comparó la expresión de proteínas musculares  $\alpha$ -actina, miosina y desmina (con tinción por inmunocitoquímica); y la expresión de troponina cardíaca T y conexina 43 como marcadores del linaje cardíaco (con tinción por inmunofluorescencia para el primer marcador, y citometría de flujo para el segundo). Esto para ADSCs sin tratamiento, ADSCs tratadas con 5-Azacitidina y ADSCs en Co-Cultivo indirecto; tomando tejido cardíaco nativo como control positivo.

Se evaluó la tasa de proliferación y viabilidad celular de las ADSCs en tratamiento, comparando con las células madre del grupo control, a través de un ensayo MTT.

**Resultados.** Los resultados obtenidos indican que ambos tratamientos; 5-Azacitidina así como el Co-Cultivo indirecto, mostraron la expresión de proteínas diferentes a las expresadas en el grupo de ADSCs del grupo control. Tanto para proteínas musculares, como específicas cardíacas. El método de Co-Cultivo indirecto fue el más eficiente para la diferenciación, dado que mostró expresión de tres proteínas musculares ( $\alpha$ -actina, miosina y desmina) y dos proteínas específicas cardíacas (troponina T y conexina 43), en comparación con la expresión en el grupo de ADSCs tratadas con 5-Azacitidina. Además de mostrar una tasa de proliferación celular controlada.

La principal diferencia entre ADSCs tratadas con 5-Azacitidina y las ADSCs en Co-Cultivo indirecto se observó en el análisis por citometría de flujo para Conexina 43; el porcentaje de expresión del grupo tratadas con Azacitidina fue 6%, en comparación con el porcentaje de expresión de las ADSCs en Co-Cultivo de 16%, equiparable a la expresión del tejido nativo, 14%.

**Conclusión.** Respecto a las proteínas analizadas y la tasa de proliferación de los grupos, se pudo concluir que, bajo nuestras condiciones de aislamiento y cultivo celular, el método de Co-Cultivo indirecto es más eficiente para la transformación de ADSCs en células musculares cardíacas respecto al tratamiento con 5-Azacitidina. Resaltando como método eficiente para la obtención de células autólogas diferenciadas tipo cardiomiocito.



# *Abstract*

**Introduction.** The field of tissue engineering is projected as one of the most promising options, within the branches of regenerative medicine, for the generation or reconstitution of organs and tissues for clinical application. The fabrication of functional autologous implants for urethra, bladder, esophagus and skin from combining stem cells derived from adipose tissue or bone marrow combined with biocompatible scaffolds, are representative examples of the clinical potential of the discipline. However, the manufacture of complex organs such as kidney, lung, liver and heart still represents a considerable technological challenge; starting from the source of obtaining highly specialized autologous cells that such organs require.

The availability of organs for transplant is reduced due to the same lack of donations, the low percentage of organs that can be transplanted and the present histocompatibility problems, together with the risk of rejection and loss of the transplanted organ; so, it is necessary the development of different research projects that seek to improve or provide a better alternative to the current transplant procedure. The main technological aspects addressed to solve the growing demand of organs and tissues are focused on the development of better biomaterials for grafting and cell culture, 3D bioprinting of cellular constructs, xenotransplantation, decellularization and repopulation of extracellular matrix of organs and tissues. Of all, the latter, has become one of the most attractive options for obtaining tissues or organs because it preserves most of the structural components of the extracellular matrix and removes most of the components with donor DNA; having better conditions for the adhesion of the cells of the future recipient and lower risk of incompatibility. The animal and cadaverous human models explored with this technique have shown important results; however, repopulation of the tissues is carried out with primary cultures (which obtain and expand for several cell types is limited, including cardiac myocytes). Obtaining many autologous cells to repopulate the extracellular matrix of the organ becomes a necessary condition to produce complex organs: kidney, lung or heart, for example.

Although several protocols have already been reported for the induction of stem cells (derived from bone marrow or adipose tissue), a method that allows such transformation efficiently is not yet established. The most effective method reported is that of direct Co-Culture: by placing stem cells derived from adipose tissue (ADSCs) in direct contact with cells of primary culture, in unequal proportions, where native cardiomyocytes far outnumber the number of stem cells to be differentiated. This method has great disadvantages for the clinical application of grafts, because it confers perfecting the method of separation of both cell populations and has the extra complication since it is a primary culture of cardiac or pulmonary tissue (where the biopsy sample itself confers a risk high for the treated patient or the donor).

**Materials and methods.** This work focused on the differentiation of rabbit stem cells derived from adipose tissue (ADSCs) in cardiac skeletal muscle cells through indirect Co-Culture (using a conditioned medium for cardiomyocytes); with the aim of finding out if this type of stem cells can be transformed to cardiac skeletal muscle through culture conditions, compared to another method previously reported with the use of an anticancer drug, 5-Azacididine, where the presence of cardiac proteins was verified. Four experimental groups were considered for the analysis: ADSCs without

treatment (negative control); native tissue (positive control); ADSCs treated with 5-Azacitidine and ADSCs treated by indirect Co-Culture.

The expression of muscle proteins  $\alpha$ -actin, myosin and desmin was compared (using immunocytochemistry staining); and cardiac troponin T and connexin 43 expression as markers of specific cardiac lineage (using immunofluorescence staining for the first marker, and flow cytometry for the second). This for ADSCs without treatment, ADSCs treated with 5-Azacitidine and ADSCs in indirect Co-Culture; taking native heart tissue as a positive control.

The rate of cell proliferation and viability of the ADSCs under treatment was evaluated, comparing with the stem cells of the control group, through an MTT assay.

**Results.** The results obtained indicate that both treatments; 5-Azacitidine as the indirect Co-Culture, show expression of proteins different from those expressed in the ADSCs of the control group, both for muscle and cardiac proteins. The indirect Co-Culture method was the most efficient for differentiation, since it showed expression of the three muscle proteins and both cardiac proteins, in comparison with the expression in the group of ADSCs treated with 5-Azacitidine. They also showed a controlled cell proliferation rate.

The main difference between ADSCs treated with 5-Azacitidine and the ADSCs in indirect Co-culture was observed in the flow cytometry analysis for Connexin 43; the percentage of expression of the group treated with Azacitidine was 6%, in comparison with the percentage of expression of the ADSCs in Co-Culture of 16%, showing levels comparable to the expression of the native tissue, 14%.

**Conclusion.** Regarding the proteins analyzed and the proliferation rate of the groups, we can conclude that, under our isolation and cell culture conditions, the indirect Co-Culture method is more efficient for the transformation of ADSCs into cardiac muscle cells with respect to treatment with 5-Azacitidina. Highlighting as an efficient method to obtain cardiomyocyte-type autologous differentiated cells.

# *1.Introducción*

La medicina regenerativa es una rama de la bioingeniería que, en su intento de mejorar la función biológica de un sistema, se ha valido del uso de células, materiales biológicamente compatibles y principios fisicoquímicos para restablecer el funcionamiento de tejido u órgano dañado (por males congénitos, enfermedades crónicas o cualquier otra causa) [1]. Dentro de las ramas de la medicina regenerativa, se encuentran la ingeniería de tejidos, la terapia celular y la terapia génica; cada una con objetivos y alcances distintos.

El campo de la ingeniería de tejidos se ha constituido como una de las opciones más prometedoras de la medicina regenerativa; los avances obtenidos y la aplicación clínica en regeneración o reconstitución de tejidos sencillos han mejorado la calidad de vida de muchas personas. Entre las aplicaciones clínicas más importantes se encuentran la fabricación de implantes autólogos para reparar uretra: basados en su reconstrucción a partir de células musculares y epiteliales autólogas sembradas sobre andamios tubulares de ácido poliláctico, posteriormente implantadas en el sitio de la lesión; vejiga: implantes de andamio biodegradable de colágena con forma de vejiga, sembrados con células uroteliales y musculares utilizados para reconstruir o mejorar la función de la vejiga nativa; esófago: la reconstrucción del conducto después de realizar una disección mucosal endoscópica, utilizando trasplante de hoja celular de mucosa oral, sobre el sitio de la disección; y piel: donde la reconstrucción utiliza células madre derivadas de tejido graso, junto con biomateriales inyectables para corregir mediante cirugía plástica defectos generados por traumas, defectos congénitos, quemaduras, etc. Las anteriores aplicaciones son las pruebas más fehacientes de las posibilidades clínicas de la ingeniería de tejidos en cuanto a la reparación y reconstitución de tejido perdido o dañado total o parcialmente [1-4]. Sin embargo, la fabricación de órganos complejos como riñón, pulmón, hígado y corazón aun representa un reto tecnológico considerable; desde la obtención de una fuente viable de células autólogas específicas como la construcción del complejo tisular.

Para darnos una idea del número de trasplantes de órganos requeridos a nivel mundial, las estadísticas mundiales registradas hasta 2014 mostraron que se realizó un número de trasplantes de órgano sólido (Riñón, hígado o corazón) mayor a 119 mil, de acuerdo con el Observatorio Mundial de Donación y Trasplante (GODT) [5], las estadísticas indican que más de 21 mil personas en nuestro país están en lista de espera [6]. Sin embargo, conseguir un órgano disponible para trasplante no es el único problema que el paciente enfrentará. Los problemas de histocompatibilidad reducen drásticamente las probabilidades de recibir uno o varios órganos cuando este los necesita; sin considerar la toma de medicamentos inmunosupresores pre y post operatorios, que dejan al paciente en estado permanente de susceptibilidad a infecciones (la principal causa de muerte entre pacientes trasplantados sea por agente bacteriano, fúngico o viral); el estado de salud general y la edad del paciente trasplantado [7-10]. La probabilidad de rechazo del órgano dentro del primer año post cirugía es alta, por ejemplo, en trasplante pulmonar se llega a registrar un rechazo en el 55% de los casos [11]; en trasplante renal, el rechazo mediado por anticuerpos permanece como una de las principales causas del rechazo agudo y crónico del órgano [12]; sin mencionar las complicaciones propias de la toma de inmunosupresores asociadas al tipo de trasplante realizado, por ejemplo, la formación de placa bacteriana en vías respiratorias producida por el cambio de inmunosupresores después de un trasplante cardíaco [13].

La demanda creciente de órganos disponibles para trasplante y los problemas de histocompatibilidad o rechazo por parte de los pacientes receptores ha generado un auge de diferentes proyectos de investigación que buscan mejorar o brindar una mejor alternativa al procedimiento actual de trasplante.

Para solventar la creciente demanda de órganos, e incluso reparar afecciones locales, las principales vertientes tecnológicas se centran en el desarrollo de mejores biomateriales para injertos y cultivo celular, la Bioimpresión en 3D de estructuras o andamios celulares, los xenotrasplantes, la descelularización y repoblación de matriz extracelular de órganos y tejidos.

La mejora de biomateriales a través de la funcionalización especializada ha permitido obtener de ellos mejores propiedades funcionales y de adherencia celular, ya sea por el propio método de síntesis que permita a los materiales tener una variedad de grupos terminales importante, por ejemplo, la polimerización de polipirrol por plasma [14]; o por la incorporación de polisacáridos componentes de la matriz extracelular nativa, haciendo la superficie del andamio similar al tejido biológico [15].

La Bioimpresión es una de las apuestas tecnológicas novedosas que han mostrado funcionalidad considerable en 2D, siendo la piel, vasos sanguíneos y vejiga, las estructuras más populares y exitosas de la impresión en dos dimensiones; sin embargo, órganos sólidos, como riñón, hígado o corazón son estructuras con inervaciones complejas y un árbol vascular considerablemente especializado; moldear una estructura 3D con diferentes tipos celulares es un problema que aún enfrenta la Bioimpresión celular, pues los dispositivos actuales no cuentan con la resolución necesaria para fabricar tejidos en bulto, la precisión geométrica es baja; además, todavía deben mejorarse las biotintas disponibles para que permitan semejar las propiedades físico-químicas de una matriz extracelular nativa determinada [16].

Los xenotrasplantes son aquellos trasplantes donde el receptor del órgano en cuestión es de especie distinta al donador; aún no se han realizado trasplantes de órgano completo de una especie animal (por ejemplo, cerdo) a humano. Se está investigando la modificación genética de animales para poder cultivar órganos humanos en ellos o a partir de algún tejido animal; este tipo de estudios se han realizado en varios modelos animales, auxiliados de poderosos inmunosupresores [17]. Por otro lado, está el peligro latente de transmitir infecciones animales a través de tales trasplantes, por ejemplo, los cerdos, animales reportados como compatibles a nivel estructural y funcional con los sistemas humanos, se han utilizado ya como donantes a otros animales (primates, mediante trasplante hepático), con un éxito significativo, pero con limitaciones relacionadas con el sistema inmune y la prevalencia de retrovirus endógenos [18]. Con la mejora en técnicas de manipulación genética, los xenotrasplantes podrían convertirse en una alternativa altamente viable para la obtención de diferentes órganos, aunque sólo existen estudios en modelos animales, por lo que actualmente no se considera una alternativa de tratamiento.

La técnica de descelularización y repoblación celular de matriz extracelular se ha convertido en una de las opciones más atractivas para la obtención de tejidos u órganos para trasplante, debido a que preserva la mayoría de los componentes estructurales de la matriz extracelular tisular y se eliminan la mayor parte de los componentes con ADN del donador (reduciendo la respuesta inmune después del trasplante), lo que permite a las nuevas células (del futuro receptor) adherirse y proliferar en un andamio con la morfología necesaria y óptima del órgano a reemplazar, con estructura, propiedades mecánicas y composición química ideales para la construcción del tejido específico. Además de conservar la micro vascularización del órgano en cuestión, lo que facilitaría la conexión directa del tejido con el sistema vascular del paciente durante el trasplante (permitiendo la entrada directa de nutrientes y oxígeno a través de la circulación) [19]. Se han realizado ya muchos estudios de descelularización y repoblación celular sobre modelo animal y cadavérico humano; por ejemplo, se ha reportado la descelularización de riñón de cerdo a través de un sistema de perfusión con Dodecil sulfato de sodio al 0.5%, y repoblación con células tubulares renales de cultivo primario de la misma especie, las cuales mantuvieron viabilidad y morfología similar al tejido nativo, además de la síntesis

de eritropoyetina y actividad de hidrolasas, por lo que la matriz extracelular exhibió las características necesarias para la adhesión de las células renales [20]; también se han visto avances en cuanto a tejido pulmonar, descelularizando pulmón de rata y repoblando con células madre derivadas de tejido graso y células endoteliales, las células grasas se diferenciaron a Pericitos y estabilizaron a las células endoteliales en el lugar correspondiente a los vasos sanguíneos, contribuyendo de manera considerable a la formación de la vasculatura nativa de los alveolos [21]. Se ha reportado la descelularización y repoblación de hígado en el modelo de rata utilizado perfusión con tritón x-100 al 4%, repoblando con hepatocitos primarios, observando producción de albúmina en el tejido tratado [22]; también se ha descelularizado y repoblado corazón de rata, con células cardíacas neonatales y células endoteliales (misma especie), manteniendo la matriz extracelular nutrida por perfusión coronaria, y simulando las condiciones naturales de contracción a partir de la estimulación mecánica del ventrículo izquierdo, con lo que han reportado conservación de vasos y formación de tejido parecido al nativo [23]. Sin embargo, la mayoría de los grupos que reportan descelularización y repoblación, utilizan cultivo primario para la segunda etapa, que, dependiendo del órgano en cuestión, y tratando de escalar a una aplicación clínica, representaría un problema ya que al tomar una biopsia cardíaca para repoblar un corazón descelularizado, podría causar más daño del que ya tiene el paciente. Por lo que una fuente segura y autóloga de células del paciente receptor del órgano se convierte en una de las principales cuestiones a resolver en el campo de la descelularización y repoblación de órganos y tejidos complejos.

Los trabajos de aislamiento y diferenciación de células madre, combinados con las técnicas de descelularización y repoblación celular parecieran ser una combinación prometedora para la obtención de órganos complejos como son corazón, hígado o riñón.

### **El tejido cardíaco en Ingeniería de Tejidos**

Reparar tejido cardíaco ha sido una de las principales tareas de la medicina regenerativa, la terapia génica se vislumbró como la primera generación de medicina regenerativa cardíaca, pero fue rápidamente abandonada por el hecho de que modificar un solo gen o un par de ellos no era suficiente para reparar una lesión, si acaso, se puede corregir una deficiencia enzimática. Posteriormente se han enfocado en utilizar terapia génica para generar células cardíacas con potencial regenerativo mayor, aunque esta no es una opción para lesiones cardíacas considerables, como infartos al miocardio o fallas cardíacas parciales y generalizadas [24]. En la década pasada, la terapia celular con células madre derivadas de médula ósea y células madre derivadas de tejido adiposo, jugaron un papel central en la reparación de secciones isquémicas, mostrando diferenciación a células del tipo cardíaco en la zona de la lesión [25-26]. Sin embargo, restablecer tejidos seriamente dañados o reconstruir secciones completas de tejido cardíaco, como, por ejemplo, un ventrículo, se convierte en todo un desafío, tanto por la estructura compleja y la diversidad celular del tejido nativo, como por el número de células requeridas. Los cardiomiocitos, las células musculares del corazón, no son expandibles en cultivo primario, por lo que una pequeña biopsia no es útil al tratarse de repoblar una matriz extracelular descelularizada.

Para la fabricación de un corazón a partir de ingeniería de tejidos se necesitan varias cosas: músculos, nervios, vasos, la red de organización de todos ellos, un andamio (la matriz extracelular de colágeno, laminina, proteoglicanos y polisacáridos) que ofrezcan forma y función a todas las células. El primer intento de obtener un corazón completo a partir de ingeniería de tejidos fue llevado a cabo por grupo de Ott, donde los corazones de rata descelularizados y repoblados con células neonatales de la misma

especie y células endoteliales llevó a un producto funcional en un 25%. Posteriormente, otros grupos comenzaron a probar la diferenciación de células humanas pluripotentes inducidas (iPSCs) junto con células cardíacas animales y factores de crecimiento cardíacos, proponiendo clínicamente a los xenotrasplantes como una opción a futuro para el cultivo de células cardíacas humanas [27]. En 2015, Guyette *et al.*, llevaron a cabo la descelularización de corazones cadavéricos humanos, reportando andamios con un porcentaje muy bajo de ADN residual, lo que los proponía como una opción viable para repoblar el andamio e implantarlo con menor riesgo de problemas de rechazo [28].

Otro detalle importante, es el número de células ya que se requieren billones de estas para repoblar todo un corazón. Las células cardíacas pueden clasificarse dentro de los siguientes grupos:

- Células endoteliales
- Cardiomiocitos
- Fibroblastos
- Células de músculo liso
- Células conductoras especializadas: Marcapasos y fibras de Purkinje

Un corazón humano adulto posee alrededor de 4 billones de cardiomiocitos [29].

La generación de un corazón fabricado a partir de ingeniería de tejidos es uno de los grandes retos actuales, cada vez se prueban nuevos y mejores protocolos de descelularización, mejores condiciones de cultivo y mantenimiento dentro de nuevos biorreactores (con control cada vez más fino de las variables fisiológicas necesarias). Sin embargo, no existe un protocolo aceptado mundialmente que permita obtener cardiomiocitos a partir de algún otro linaje celular, ya sean células madre derivadas de médula ósea (BMSCs), células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) u otro linaje. Existen protocolos en modelos animales que han sido de utilidad para la obtención de cardiomiocitos en: ratón, rata o conejo. La diferenciación *in vitro* ha explorado varias metodologías, sin poder aun contar con un protocolo generalmente aceptado que nos permita obtener una concentración de cardiomiocitos diferenciados aplicables clínicamente.

## 1.1 Marco Teórico

### Células madre y su función

Una célula madre (o troncal) es aquella que tiene la capacidad de autorrenovación y puede diferenciarse en múltiples líneas celulares. Existen básicamente dos tipos de células troncales, las células troncales/madres embrionarias (ESCs) y las células troncales/madre adultas o mesenquimales (MSCs). Las ESCs son las únicas pluripotenciales, pero hay limitaciones prácticas y éticas para su utilización. Las MSCs son células de origen mesodérmico, consideradas multipotenciales con autorrenovación limitada y con capacidad de dar origen a tejidos de la misma capa embrionaria (sin embargo, recientes publicaciones han mostrado capacidad de diferenciarse en linajes de otras capas, por lo que su pluripotencialidad aún está en discusión). La función principal de las MSCs es mantener la estructura y funcionamiento normal de todos los órganos, a través de la renovación de tejidos [30].

Las MSCs más estudiadas son las células madre derivadas de médula ósea (BMSCs) y las células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs). Las BMSCs son consideradas como las células progenitoras de tejidos esqueléticos, clonógenas, con forma fibroblástica, diferenciables a osteoblastos, condrocitos, adipocitos y células hematopoyéticas [31]. Las células madre adiposas,

ADSCs, también tienen forma fibroblástica; se diferencian hacia adipocitos, fibroblastos, miocitos, osteocitos y condrocitos [30].

### ¿Por qué ADSCs sobre BMSCs?

Las BMSCs han sido más ampliamente estudiadas, no obstante, la elección de ADSCs para la diferenciación a otro linaje celular presenta sus ventajas. Para empezar, las células madre de tejido adiposo son consideradas ilimitadas ante la creciente epidemia de obesidad mundial. Un mismo individuo puede tener una cantidad variable e importante de grasa a lo largo de toda su vida, en comparación con las células madre de médula ósea que generalmente tienen sólo un periodo efectivo de autorrenovación (la edad y salud del paciente juegan un papel importante). El método de obtención de las BMSCs es invasivo, se requiere una punción ósea muy dolorosa, en comparación con una liposucción que se realiza incluso con anestesia local, de forma menos invasiva para el paciente, o como procedimiento secundario en una cirugía mayor. Además, el número de tomas de biopsia de BMSCs es menor que el de ADSCs, generalmente hay mucha más grasa que médula ósea que aspirar.

A pesar de mostrar una morfología similar, el cultivo *in vitro* de ambos tipos celulares exhibe características diferentes, mostrando a las ADSCs como una fuente realmente atractiva de células madre. Las BMSCs son estables por poco tiempo en cultivo, con una escasa proliferación; mientras las ADSCs son estables por mayor tiempo y se duplican con facilidad antes de llegar a la senescencia, por lo que requieren pocos pasajes para obtener una cantidad de células aplicable clínicamente. Por cada mililitro de médula ósea se tienen aproximadamente  $6 \times 10^6$  células, de las cuales entre el 0.001 y 0.01% son BMSCs: 6,000-60,000 BMSCs; por cada gramo de grasa aspirado se tienen  $2 \times 10^6$  células, de las cuales, aproximadamente, el 10% son ADSCs: 200,000 ADSCs. Por cada aspirado de médula ósea se toman sólo algunos mililitros, en una liposucción se aspiran fácilmente decenas de gramos [32].

### Tejido adiposo: Obtención y cultivo

Macroscópicamente, existen 5 tipos de tejido graso: Grasa parda, blanca, mamaria, de soporte mecánico y de médula espinal; cada una con un rol específico, la grasa parda es termogénica (rodea corazón, riñones, aorta y gónadas en el infante, desaparece en adultos), genera calor a través del desacoplamiento de una proteína única que altera el gradiente de pH mitocondrial; la grasa blanca actúa como reservorio de energía para los demás tejidos y brinda aislamiento; la grasa mamaria provee de nutrientes y energía durante la lactancia; la grasa de soporte mecánico, como por ejemplo, las almohadillas de grasa palmar, brindan soporte crítico a las estructuras. Finalmente, la grasa de médula espinal ocupa un espacio no requerido para la hematopoyesis y sirve como reservorio de energía y fuente de citosinas para eventos osteogénicos y hematopoyéticos [33].

Las ADSCs generalmente se aíslan de tejido graso blanco abdominal (donde se concentra más del 22% de la grasa total del cuerpo) o de extremidades. No se ha visto diferencias entre las concentraciones de ADSCs de grasa blanca de tronco o extremidades en sujetos jóvenes [30].

El método de aislamiento y cultivo de estas células es bien conocido, básicamente consiste en la toma de la muestra, su lavado para eliminar excesos de sangre u otros tejidos, y su posterior digestión con Colagenasa tipo I; después de degradada la estructura de colágeno, cuando el tejido está bien disgregado, se procede a lavar la colagenasa y centrifugar el tejido, generalmente, se cultiva la fracción inferior del tubo, conocida como fracción vascular estromal (SVF), que contiene ADSCs, eritrocitos, fibroblastos, pericitos, células endoteliales, preadipocitos, etc. Si bien, no todas las células

obtenidas son células madre derivadas de tejido adiposo propiamente, un porcentaje considerable posee tales características [33].

### **Caracterización de ADSCs: Inmunofenotipos**

Las ADSCs, como las MSCs, y muchas otras células, poseen una morfología de huso o fibroblástica, por lo que su identificación se basa en la expresión de marcadores de superficie específicos. En el caso de las células madre de grasa, estas comparten la mayoría de los marcadores de superficie con las células madre mesenquimales, como se muestra en la tabla 1:

*Tabla 1. Marcadores de superficie para ADSCs y MSCs.*

Marcador de superficie celular	ADSCs	MSCs
CD105	+	+
CD90	+	+
CD44	+	+
CD45	-	-
CD34	-	-
CD31	-	-
SH3	+	-
Stro-1	+	+
CD106	-	+
CD49d	+	-

La expresión de CD34 es controversial, algunos autores la reportan positiva y otros, negativa. No expresan CD31, el marcador endotelial característico; ni los marcadores hematopoyéticos CD45, CD11a, CD14 y CD19. Además de no expresar MHC tipo II [34, 26].

### **Cardiomiocitos: Generalidades y caracterización**

El corazón de mamíferos adultos tiene una limitada, casi nula, capacidad de regeneración; una lesión cardíaca resulta en pérdida del miocardio, cicatrización y pérdida de funcionalidad; con la posibilidad de producir una falla general, dependiendo de la extensión de la misma. Los cardiomiocitos proliferan en todos los mamíferos en etapas embrionarias; algunas especies presentan cierta capacidad proliferativa varias semanas después de nacidos, como es el caso de roedores [35].

Las células precursoras del corazón se observan después de la gastrulación en una región anterior del mesodermo adyacente al endodermo (comparten la misma capa germinal que las ADSCs). Durante el desarrollo fetal y posnatal, los cardiomiocitos terminan su diferenciación en células musculares conectadas célula-célula por uniones gap, lo que les permite tener actividad contráctil. El ciclo de contracción y relajación de los cardiomiocitos está regulado por el incremento y decremento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$ ; el control de la liberación del ion calcio, la etapa contráctil, se controla a través de señalización eléctrica sobre el sarcolema. Los cardiomiocitos adultos tienen dos núcleos separados, pierden su capacidad de dividirse, y su crecimiento involucra sólo aumento de



volumen, no de número. El aislamiento y cultivo de estas células representa un reto por dos motivos: estas células no se multiplican, por lo que el número obtenido durante la digestión es el número máximo obtenido para el cultivo; los cardiomiocitos necesitan estar en contacto, unidos por las uniones gap, compartiendo iones y pequeñas moléculas, cuando se aíslan estas células y se separan, se genera una acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  en su interior, lo que puede alterar la célula y llevarla a apoptosis [36].

### **Inmunofenotipo cardíaco**

La identificación de proteínas cardíacas se basa en presencia de troponinas y algunos otros marcadores específicos, como conexinas. Las troponinas cardíacas se encuentran en los filamentos de actina de todos los tipos de músculo estriado, su función es regular la contracción de músculos calcio dependientes; existen tres tipos de troponinas: TnT, TnI y TnC, cuyos nombres están designados por su función (TnT se une a tropomiosina; TnI inhibe la acción de la enzima actomiosina adenosina trifosfatasa; TnC se une al calcio). La TnT tiene una mayor distribución en el tejido y también una concentración libre en citoplasma en comparación con los otros tipos de troponinas [37].

La principal proteína de unión gap de comunicación eléctrica y bioquímica cardíaca es la conexina 43 (Cx43), además de estar presentes miosina de cadena pesada, alfa-actina y desmina (proteínas características de músculo estriado y músculo liso) [38].

### **Diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos**

Existen algunos trabajos publicados donde se describe el intento de diferenciación de células madre (BMSCs o ADSCs) a células musculares cardíacas. Uno de los primeros trabajos publicados fue el de Rangappa *et al.* (2003), donde utilizaron el agente desmetilante de ADN 5-Azacitidina para transformar ADSCs de conejo en cardiomiocitos; este grupo sembró diferentes concentraciones de células madre en diferentes concentraciones de agente desmetilante, por diferentes periodos de tiempo, encontrando que las ADSCs incubadas con 9  $\mu\text{mol/L}$  durante 24 h mostraron cambios significativos: después de la primer semana, las células mostraron binucleación y extensión del citoplasma hacia células adyacentes; a la segunda semana de cultivo, 20-30% de las células incrementaron su tamaño y formaron complejos de 'bola'; en la tercer semana, estos complejos tipo bola latieron espontáneamente. Los estudios de inmunohistoquímica dieron positivo para miosina de cadena pesada,  $\alpha$ -actina y troponina T [39].

Planat-Bénard *et al.* (2004), publicaron que las ADSCs de la fracción estromal de ratón adulto tienen por sí mismas precursores especiales que les permite expresar el fenotipo cardíaco sin el tratamiento con agentes especializados (como, por ejemplo, agentes desmetilantes). La expresión de marcadores cardíacos, tinción inmunohistoquímica (positivo para  $\alpha$ -actina sarcomérica, anti-MEF2C, anti-Conexina 43) y un análisis ultraestructural demostraron presencia de células tipo ventriculares y atriales. Estudios electrofisiológicos mostraron la actividad de marca pasos en tales células al ser estimuladas eléctricamente. El medio de cultivo de este trabajo fue un medio semi sólido de metil celulosa adicionado con interleucinas IL-3 y IL-6, SCF recombinante de ratón, SFS, 2-mercaptoetanol, L-glutamina, insulina recombinante humana y transferrina humana. Las células latentes se observaron entre el día 11 y 14, luego se formaron miotubos; a partir del día 20, se observaron derivaciones y uniones apretadas entre conjuntos de células, características de fibras musculares [40].

Dado que el *Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)* juega un rol importante en la diferenciación de células embrionarias, Song *et al.* (2007), probaron el potencial de diferenciación cardiomiogénica de este factor en células adiposas subcutáneas humanas. Midió la secreción de VEGF por parte de las ADSCs humanas cultivada *in vitro*, este grupo plantea que las ADSCs pueden espontáneamente diferenciarse y expresar marcadores cardíacos troponina T, miosina de cadena ligera 2v, Nkx2.5 y GATA-4; VEGF es el responsable por mecanismo paracrino. Sin embargo, las tasas de diferenciación son del 0.005% al 0.007%, insuficiente para fines terapéuticos poniendo en evidencia que las ADSCs tienen el potencial para transformarse en células musculares cardíacas [41].

Jin *et al.* (2010), probaron Co-Cultivo de ADSCs y cardiomiocitos primarios de ratón, auxiliados de Icariin, un flavonoide de una medicina herbal tradicional china: *Epimedium Nakai*. Se observó un incremento en los niveles de  $\alpha$ -actina en presencia del Icariin, dependiente del tiempo [42].

Un trabajo en células humanas, que buscaba probar la efectividad de los principales protocolos publicados, del grupo de Choi *et al.* (2010), evaluó los protocolos de diferenciación de ADSCs a cardiomiocitos usando 5-Azacitidina, una histona desacetilasa inhibidora de tricostatina A (TSA), en medio modificante cardiomiogénico (MCM) y en Co-Cultivo con cardiomiocitos neonatales de rata (indirecto y directo). Ellos llegaron a la conclusión de que los primeros tres métodos no permitían obtener células latentes, empero el protocolo de Co-Cultivo directo, es decir, poner ADSCs en contacto célula-célula con el cultivo primario de cardiomiocitos, fue lo que indujo una transformación exitosa, utilizando radio 1:10 (ADSCs:Cardiomiocitos primarios) [43]. Sin embargo, la cantidad de células utilizadas para inducir la transformación en el método de Co-Cultivo directo es tan desproporcionada que se convierte en un claro obstáculo para la utilización inmediata debido a problemas de histocompatibilidad (tanto para un Co-Cultivo directo con células de individuos de la misma especie, como de especies distintas). Lo anterior hace necesario contar con una técnica de separación muy sensible, con el fin de evitar trasplantar cardiomiocitos del donante, no autólogos, en el futuro receptor.

En general, estos son los protocolos publicados respecto a la diferenciación. Existen otros protocolos publicados, donde principalmente se utiliza el mismo modelo de Co-Cultivo directo, con poblaciones de cardiomiocitos nativos superiores a la población de células madre que se desea inducir; por ejemplo, el Co-Cultivo reportado por Zhu *et al.*, donde la proporción de ADSCs-Cardiomiocitos primarios es 1:5. Por lo que se aprecia claramente una desventaja clínica inicial con este procedimiento [38, 44].

## 1.2 Proyecto general

Nuestro grupo de trabajo plantea una estrategia experimental que consiste en generar una nueva técnica de descelularización y repoblación gradual de un ventrículo izquierdo de corazón, a partir de apoptosis controlada, y auxiliada por células del sistema inmune (macrófagos y células NK); lo anterior, con miras de obtener tejido cardíaco autólogo disponible para trasplante (trátese de sólo porciones de tejido para sustituir tejido dañado por fallas isquémicas; o la fabricación de un corazón completo para los casos en que el órgano se vea comprometido en su totalidad). El objetivo de esta Tesis es generar la metodología necesaria para la obtención de células para la etapa de repoblación, realizándose a partir de células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) diferenciadas a musculares cardíacas.

Una premisa para la obtención de un tejido cardíaco viable autólogo disponible para trasplante, que tenga la morfología y función adecuados, es necesario contar con una fuente segura de células madre diferenciabile; por ello se eligió trabajar con ADSCs.

Este protocolo se evaluará utilizando ADSCs de conejo, comparando dos posibles métodos de diferenciación: Utilizando 5-Azacitidina (como modelo control) y una variante de Co-Cultivo indirecto (por las ventajas clínicas sobre el Co-Cultivo directo).

### 1.3 Justificación

En el mundo, más de 25 millones de individuos sufren de insuficiencia cardíaca, en Estados Unidos, alrededor de 4000 pacientes esperan un trasplante de corazón [23]. En México, las cifras de pacientes en lista de espera son pocos (menos de 50) [6], sin embargo, las enfermedades cardíacas van en aumento; en niños, las cardiopatías asociadas a malformaciones congénitas se encuentran dentro de las primeras cuatro causas de mortalidad infantil y reducen significativamente la calidad de vida del infante. Alrededor del 7% de los niños nace con algún defecto congénito cardíaco, al menos el 3 % muere sin poder corregir su malformación, como es el caso del síndrome del corazón izquierdo hipoplásico y que no es tratable a largo plazo, requiriendo un trasplante total de corazón; hoy en día existen técnicas quirúrgicas paliativas que permiten una supervivencia de sólo 5 años en más de la mitad de los casos [45].

Si bien, la descelularización y repoblación de órganos procedentes de cadáveres se ha convertido en una de las opciones más exploradas y prometedoras de la ingeniería de tejidos para solventar el problema de la demanda creciente de órganos y tejidos, aún se encuentra en etapas experimentales y no se cuenta con un protocolo que permita crecer tejido cardíaco *in vitro* disponible para trasplante. Existen trabajos publicados en diferentes modelos animales, pero no se cuenta con un consenso en el protocolo necesario para llevar a cabo la diferenciación satisfactoriamente.

Por lo que se busca estandarizar un método seguro para obtener células musculares cardíacas a partir de una fuente renovable de células madre adultas.

### 1.4 Planteamiento del problema

La insuficiencia cardíaca conlleva serias afectaciones al paciente; se trate de una malformación congénita o un daño isquémico. El mal funcionamiento del corazón pone en riesgo la salud general de la persona, reduciendo su tiempo y calidad de vida. El número de órganos disponibles para trasplante, las complejas condiciones para realizar el mismo y la toma de inmunosupresores que reduzcan la probabilidad de rechazo tisular, ponen en evidencia las pocas alternativas clínicas satisfactorias. Descelularizar y repoblar matriz extracelular de diversos órganos (de origen cadavérico) se está convirtiendo en una de las opciones más prometedoras para la obtención de órganos y tejidos autólogos funcionales; sin embargo, el éxito de este procedimiento radica en encontrar una fuente constante y confiable de células autólogas para re-celularizar el tejido dañado.

En el caso de corazón o tejido cardíaco, no es posible tomar una biopsia de tejido cardíaco y expandir sus células (cardiomiocitos) para luego reimplantarlas; por lo que se trabaja para encontrar un método de obtención de cardiomiocitos eficiente y seguro para aplicaciones clínicas. A pesar de que varios grupos de investigación han planteado ya algunos protocolos para la diferenciación, no está establecido y soportado del todo un método no invasivo que permita obtener células musculares

cardíacas autólogas. Recurrir a la inducción de células madre, derivadas de médula espinal o derivadas de tejido adiposo, es una de las alternativas más estudiadas.

Los ensayos experimentales reportados hasta ahora se basan en el uso de medios condicionantes (con uno o más agentes químicos) que inducen cambios morfológicos y expresión de marcadores de superficie específicos y en técnicas de Co-Cultivo. El Co-Cultivo directo, se lleva a cabo colocando a las células madre en contacto directo con células nativas de tejido cardíaco, es el reportado como de mayor eficiencia para la obtención de células tipo cardíacas. Sin embargo, las implicaciones técnicas de combinar poblaciones celulares de diferentes sujetos experimentales conllevan un alto riesgo biológico al momento de tratar de separarlas o utilizarlas para un trasplante autólogo.

Se propone evaluar una versión simple de Co-Cultivo indirecto sobre una población de ADSCs para inducir la transformación de estas en células musculares cardíacas.

El estudio se llevará a cabo en modelo conejo, los resultados obtenidos se compararán con los reportados previamente (en el mismo modelo) utilizando el agente desmetilante de ADN: 5-Azacitidina.

De obtenerse resultados positivos, en la inducción de las ADSCs en células tipo cardíacas, se determinará cuál de estos dos métodos de inducción es el más viable para una futura aplicación clínica. Este establecimiento proveerá de solventar la necesidad de una fuente autóloga de tejido cardíaco funcional.

#### **Pregunta de investigación:**

Entre los métodos para la diferenciación de células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) en células tipo cardiomiocitos, ¿será posible que el método de Co-Cultivo indirecto permita una transformación más eficiente que la inducción reportada con 5-Azacitidina?

#### ***1.5 Objetivo general***

Diferenciar células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) en células musculares cardíacas (cardiomiocitos) y caracterizarlas.

#### ***1.6 Objetivos específicos***

- Evaluar la expresión de marcadores de superficie musculares y cardíacos sobre ADSCs sometidas a tratamiento con un agente desmetilante de ADN, 5-Azacitidina.
- Evaluar la expresión de marcadores de superficie musculares y cardíacos sobre ADSCs sometidas a tratamiento de Co-Cultivo indirecto con un medio condicionante derivado de cultivo primario de cardiomiocitos.
- Comparar ambos métodos de inducción para determinar cuál es más efectivo para la inducción de diferenciación de ADSCs en células musculares cardíacas.

#### ***1.7 Hipótesis***

Será posible diferenciar células madre derivadas de tejido adiposo (ADSCs) a células musculares cardíacas tipo cardiomiocito a través del método de Co-Cultivo indirecto, entonces, se determinaría la eficiencia de esta técnica frente al tratamiento de 5-Azacitidina.

## 2. Materiales y Métodos

En esta sección se describen los protocolos utilizados para el aislamiento y cultivo primario de ADSCs y cardiomiocitos de conejo. Además del protocolo utilizado para las demás pruebas de diferenciación celular. Se mencionan los ensayos de viabilidad y las técnicas de caracterización utilizados, los protocolos para la preparación de muestras se encuentran detallados en el Anexo.

Los grupos experimentales considerados fueron los siguientes: ADSCs sin tratamiento (control negativo); tejido cardíaco nativo (control positivo); ADSCs tratadas con 5-Azacitidina y ADSCS tratadas por Co-Cultivo indirecto.

**Pruebas realizadas:** Inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, citometría de flujo y MTT.

Mediante inmunocitoquímica se verificó la expresión de marcadores de linaje muscular ( $\alpha$ -actina, miosina y desmina); con inmunofluorescencia se verificó la expresión de troponina cardíaca T. La técnica de citometría de flujo se utilizó para medir el porcentaje de expresión de conexina 43.

El ensayo MTT se realizó sólo con los grupos de ADSCs, considerando la tasa de proliferación del grupo de ADSCs sin tratamiento de diferenciación como el 100% de viabilidad celular; se compararon las ADSCs tratadas con 5-Azacitidina y las ADSCs tratadas por Co-Cultivo indirecto.

También se buscó evidencia de células binucleadas, como reportan Rangappa *et al.* [39]; una característica de los cardiomiocitos adultos. Esto fue a través del marcaje de F-actina utilizando faloidina, por su alta afinidad de diversas especies de actina; y apreciable en algunas microscopías de Inmunocitoquímica.

**Modelo del estudio:** Conejo Nueva Zelanda (3 meses de edad).

La toma de biopsias se realizó siempre bajo anestesia general, de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 de Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Los conejos utilizados para la biopsia de corazón para el cultivo primario de cardiomiocitos fueron sometidos a eutanasia con sobredosis endovenosa del anestésico (Pentobarbital, >40 mg/kg).

### Ensayo MTT

Se basa en la reducción de sales de tetrazolio (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) por acción del metabolismo de células viables. El sustrato de MTT se prepara en solución fisiológica y se agrega al cultivo celular, generalmente a una concentración final de 0.2-0.5 mg/ml, incubando de 1 a 4 h. Las sales de tetrazolio reducidas a sales de formazán se consideran directamente proporcionales al número de células viables, y es medida a través de los cambios de absorbancia respecto al grupo control. Las células viables con metabolismo activo convierten el MTT a un subproducto de formazán color morado con una absorbancia máxima cerca de los 570 nm; por lo que se considera una medición directa del número de células vivas. El mecanismo de acción para la reducción de las sales de MTT no es bien conocido aun, pero se sabe que está relacionado con las moléculas reductoras NADH. Anteriormente, se consideraba que se daba a nivel mitocondrial, por lo que se utilizó este ensayo como medio de reporte de actividad mitocondrial.

Las sales de formazán insolubles en el medio de cultivo, y se almacenan al interior de las células, por lo que para medir la absorbancia se requiere solubilizarlas. El agente utilizado para disolver tales sales debe de permitir conservar el color del precipitado, prevenir la evaporación y reducir el efecto del rojo fenol y otros componentes del medio de cultivo; los disolventes más utilizados son isopropanol acidificado, DMSO, dimetilformamida, SDS, etc.

La reacción es dependiente del tiempo y la concentración celular, por lo que, para comparar entre los diferentes grupos, es necesario trabajar concentraciones y tiempos de incubación iguales [46].

### **Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia**

Los inmunoensayos se utilizan para cuantificar molécula de interés biológico basándose en la especificidad y selectividad de un anticuerpo generado. Determinar si se expresa una proteína específica en la superficie o interior de la célula es una de las técnicas de caracterización más utilizadas en histología para determinar el origen tisular de una muestra determinada o para verificar la transformación de un linaje celular a otro. La inmunotinción puede ser superficial o citoplásmica, directa e indirecta. De forma directa, el marcaje se realiza con un solo anticuerpo contra la molécula de interés, que lleva acoplado un agente enzimático (que reaccione con un sustrato específico y como resultado de la reacción se genere un cambio de color) que permite identificar la presencia o no de la molécula de interés. La forma indirecta es utilizando un anticuerpo primario específico contra la molécula de interés que sea posteriormente marcado por un anticuerpo secundario contra la especie del primario, y este anticuerpo secundario traiga acoplado un compuesto enzimático que pueda reaccionar al agregar un sustrato específico.

La inmunocitoquímica se diferencia de la inmunofluorescencia por el hecho de que el anticuerpo final del marcaje (sea el anticuerpo primario o secundario) lleva acoplado un fluorocromo que permite visualizar a través de microscopía de fluorescencia la distribución de la molécula de interés (generalmente fluorocromos que emiten en verde, rojo o azul). En una inmunocitotinción, la reacción enzimática con el sustrato, teñirá las moléculas con colorantes observables con microscopía óptica normal (espectro visible); generalmente en colores rojo, café o negro [46].

### **Citometría de flujo**

La citometría de flujo permite la determinación del tamaño y complejidad de una muestra celular a través de un análisis de la luz transmitida y dispersada de un láser que incide sobre la muestra en cuestión. La identificación se auxilia de la emisión de ondas de un fluorocromo excitado por el haz, luz emitida con una longitud de onda mayor que la de la fuente de luz; el fluorocromo está regularmente acoplado a algún anticuerpo específico o sustancia química al interior o en la superficie celular.

La muestra se analiza líquido que atraviesa un finísimo tubo de vidrio sobre el que incide el rayo de luz monocromática; los colectores del rayo incidente están a la par del láser (colector de rayos dispersados frontalmente: FSC [Forward Scatter o detector de dispersión frontal]) y varios detectores angulares a la trayectoria del haz (Colectores de dispersión Lateral o Side Scatter). El patrón de luz dispersada y fluorescencia recogidos por los colectores, además de las fluctuaciones de las mismas a lo largo del análisis, permite obtener información acerca de la estructura física y química de cada partícula individual [46].

## 2.1 Obtención y cultivo primario de ADSCs

El tejido adiposo de conejo se obtuvo de ejemplares Nueva Zelanda, de 3 meses de edad, de la parte de lomo, bajo anestesia general. La cantidad de grasa obtenida por conejo dependió de su peso corporal, entre 1-3% en relación a su peso. Esta se lavó tres veces con PBS 1X estéril para retirar exceso de sangre, pipeteando entre cada lavado y centrifugando a 2 000 rpm por 7 minutos a 4°C.

Una vez lavado el tejido adiposo, fue disgregado con bisturí o tijeras en un plato de cultivo de 150x25 mm, para incubarse con 15 ml de Colagenasa tipo I (200 unidades/ml) (ICN Biomedicals, US, Cat. 195109) entre 18 y 24 h que resultó ser el tiempo necesario para romper las fibras de colágeno del tejido y observar células flotantes o adheridas a la base de la caja. Se incubó con colagenasa agregando 1 % de suero fetal bovino (SFB) (Biowest, SA, Cat. S1810-500) a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, Fig. 2.2.



Figura 2.2. Tejido adiposo en colagenasa tipo I.

Después del periodo de digestión enzimática, se recuperó el tejido de la caja y se colectó en un tubo falcón de 50 ml estéril, para después homogenizar por pipeteo durante 5 minutos con el fin de disgregar el tejido y romper el colágeno restante. El tejido homogéneo se centrifugó a 2000 rpm por 7 minutos a 4°C para retirar la colagenasa y se realizaron tres lavados más con DMEM completo (10 % SFB, 1% antibiótico-antimicótico) para lavar residuos de enzima. Entre cada lavado, después de centrifugar, se formaron tres precipitados en el tubo, como se muestra en la **Figura 2.3**. La primera fracción (1), ubicada en el fondo del tubo, corresponde a las Células Vasculares Estromales (SVCs) que son preadipocitos, ADSC, MSCs, células progenitoras de endotelio, células T, macrófagos, etc.; la segunda (2) a la colagenasa o DMEM completo de cada lavado; y la tercera (3), corresponde al tejido graso digerido, ADSCs y adipositos. Entre cada lavado, fueron conservadas sólo las fracciones 1 y 3, las cuales fueron sembradas en platos de cultivo con DMEM completo para obtener el cultivo primario de ADSCs.

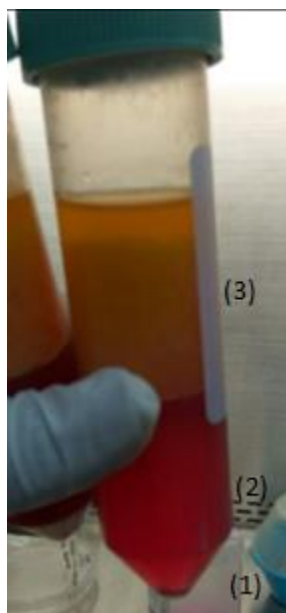


Figura 2.3. Tratamiento de grasa para la obtención de ADSCs. (1) SVCs, (2) Colagenasa I, (3) Adipocitos

El cultivo primario se mantuvo con DMEM completo, en cajas de 150x25 mm, sembradas con aproximadamente  $1 \times 10^6$  células y alcanzaron confluencia del 80 % en dos semanas posteriores a la siembra llevándose a cabo un cambio de medio semanal. El rendimiento fue de 4-5 millones de células por caja aproximadamente.

## 2.2. Cultivo primario de cardiomiocitos de conejo

Para la obtención de cultivo primario de cardiomiocitos, fueron utilizados conejos Nueva Zelanda de 3 meses de edad, a los cuales se les extrajo el corazón bajo anestesia general. Se realizó una incisión para exponer el corazón vivo en el tórax del conejo, cortando el esternón y ligando principales venas y arterias, antes de suministrar una dosis letal de anestesia, lo anterior con la finalidad de extraer el órgano y comenzar la digestión enzimática dentro de los primeros 10-15 minutos posteriores a la extracción, para obtener un mayor número de miocitos viables. El corazón se tomó en su totalidad, colocándose en solución fisiológica o PBS 1X para su transporte a la campana de flujo laminar.

Se realizaron 3 lavados generales con PBS 1X o solución fisiológica a 37 °C, para retirar la mayor cantidad de sangre posible antes de realizar cortes. Se trabajó con las paredes externas de los ventrículos derecho e izquierdo para maximizar el número de células cardíacas obtenidas. El tejido ventricular se cortó en trozos finos con tijeras y bisturí, se lavó con PBS 1X (3 veces) para remover exceso de sangre y retirar coágulos. Estas porciones de tejido finamente cortadas se recolectaron en 5 ml de colagenasa tipo II (200 unidades/ml) (GIBCO, US, Cat. 17101-015), dentro de tubos estériles de 15 ml, sometándose a un pipeteo vigoroso para después incubar a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub> por 15 minutos; después del periodo de incubación, se tomaban 2 ml de la colagenasa superficial, para ser desechados, y estos eran repuestos por nuevos mililitros de colagenasa tipo II; esto fue repetido dos veces, con periodos de incubación de 15 minutos entre cada recambio de colagenasa y pipeteando vigorosamente con cada incorporación. Después de una digestión enzimática de 45 minutos, con tres periodos de incubación, fueron tomados de mililitro en mililitro la colagenasa y el tejido del tubo, y fueron



colocados junto con 15 ml de M199, en un tubo estéril de 50 ml, suplementado con 10 % SFB para la inactivación de la acción enzimática.

Después, se filtró el contenido del tubo de colagenasa y tejido utilizando un filtro de 45  $\mu\text{m}$ , se centrifugó para desechar los restos de colagenasa tipo II a 2000 rpm por 7 minutos a 4°C. Se observó un precipitado, el cual consiste de cardiomiocitos, células endoteliales y fibroblastos; se contó el número de células antes del sembrado, sobre cajas Petri de vidrio durante periodos de 1-1:30 h para que los fibroblastos se adhirieran y en el sobrenadante se encontraran la mayoría de los cardiomiocitos. Se recuperó el sobrenadante de la caja Petri, se cuantificó el número de células por mililitro obtenido para la posterior siembra en cajas de cultivo, con M199. Previamente, durante los primeros cultivos primarios de cardiomiocitos, se evaluó el tiempo de vida del cultivo celular sembrando en medio RPMI 1640 en comparación con el cultivo en M199; este último permitió la mantención del cultivo primario por un periodo de tiempo mayor.

Este cultivo primario se sometió a observaciones diarias, incluyendo cambios de medio, y los sobrenadantes fueron filtrados (con filtro pirinola de 0.25  $\mu\text{m}$ ) y conservados para pruebas de Co-cultivo indirecto con ADSCs, en alícuotas conservadas a -20°C hasta su posterior utilización.

Estas células se utilizaron como control positivo para la determinación de marcadores musculares y cardíacos en los ensayos de tinción.

### ***2.3 Pruebas de diferenciación de ADSCs usando 5-azacitidina***

Se sembraron 12,000 células por pozo (ADSCs) en cajas de 6 pozos 24 h antes de la incubación con el agente desmetilante de ADN. Una vez confirmada visualmente la adhesión celular y que cada pozo tuviera la misma confluencia celular ( $\leq 10\%$ ), se incubó el grupo de tratamiento con DMEM completo con una concentración de 9  $\mu\text{M}$  de 5-azacitidina por 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después del periodo de incubación, se cambió el medio de cultivo por M199 suplementado con 10% SFB y 1% antibiótico-antimicótico. Durante la incubación se hicieron registros diarios al microscopio para monitorear cambios morfológicos o la aparición de células con actividad marcapasos reportada previamente por Rangappa *et al.* [39]

Al término de las 3 semanas de incubación para este tratamiento se realizó ensayo de viabilidad celular MTT sobre las células tratadas, por 24, 48 y 72 h; además de marcaje con anticuerpos musculares y cardíacos:  $\alpha$ -actina, miosina de cadena pesada, desmina, conexina 43 y troponina T).

### ***2.4. Pruebas de diferenciación de ADSCs por Co-Cultivo indirecto empleando medio condicionante de cardiomiocitos de conejo***

Para estos ensayos fueron sembradas 12,000 células por pozo (ADSCs) en cajas de 6 pozos 24 h antes de la incubación con el medio de cultivo de cardiomiocitos primarios de conejo. Una vez confirmada la adhesión celular (visualmente, al microscopio) y una confluencia similar ( $\leq 10\%$ ), se inició el periodo de Co-Cultivo indirecto. Se utilizó el medio sobrenadante del cultivo primario de cardiomiocitos para incubar las ADSCs, en proporción 1:1 (volumen) con medio M199 nuevo, suplementado con 1% Anti-Anti y 10% SFB. El medio de Co-Cultivo descongelado fue pasado por filtro estéril de 21  $\mu\text{m}$  antes de su utilización para remover posibles restos celulares.

Se cambió de medio cada tres días a lo largo de 1 mes para después evaluar si hubo cambios en expresión de marcadores de superficie celulares.

Al término del mes de Co-Cultivo indirecto, se realizó ensayo de viabilidad celular MTT sobre las células tratadas, por 24, 48 y 72 h; además de marcaje con anticuerpos musculares y cardíacos ( $\alpha$ -actina, miosina de cadena pesada, desmina, conexina 43 y troponina T).

## **2.5 Pruebas de caracterización**

Las pruebas de caracterización elegidas para determinar la expresión de proteínas musculares y cardíacas específicas fueron inmunocitoquímica e inmunofluorescencia; además de citometría de flujo para uno de los marcadores cardíacos. El ensayo de viabilidad celular para la comparación de la proliferación entre los grupos de ADSCs sin tratamiento, ADSCs tratadas con 5-Azacitidina y ADSCs en Co-Cultivo indirecto fue un ensayo de MTT.

### **Inmunotinción**

Para la tinción por inmunocitoquímica, se sembraron 40-50,000 células/pozo en laminillas labtek. Una vez que las células estuvieron adheridas a los pozos (18-24 h después de la siembra), se lavó la laminilla con PBS 1X estéril (37 °C), para su posterior fijación con una solución de etanol-acetona (1:1, volumen) en frío. Después del periodo de fijación, la laminilla fue lavada con PBS 1X, para después tratarla con el protocolo del kit para inmunotinción EnVision+ System-HRP (DAB) para anticuerpos primarios de ratón (DAKO, Santa Clara, CA, United States. Cat. K4007); permeabilizando con Tritón X-100 al 0.1%, y marcando con anti  $\alpha$ -actina: Mono mouse anti-human smooth muscle Actin Clone 1A4 (DAKO, US, Cat. M0851) a una dilución 1:50; miosina de cadena pesada; Mono mouse anti-human smooth muscle Myosin heavy chain Clone SSMS-1 (DAKO, US, Cat. M3558) a una dilución 1:100 y anti-desmina: Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin Clone D33 (DAKO, US, Cat. IS606) a una dilución 1:50.

Para la tinción por inmunofluorescencia, se sembraron el mismo número de células/pozo en laminillas lab-tek. Una vez adheridas las células, se fijaron con solución de formaldehído al 4% para después ser lavadas con PBS 1X; permeabilizando con Tritón X-100 al 0.1%, bloqueando con solución de albúmina al 1%. Las laminillas fueron incubadas con los anticuerpos primarios, anti-Troponina cardíaca: Rabbit Anti-Cardiac Troponin T (Abcam, US, Cat. ab45932) a una dilución 1:100 por 12 h, a 8 °C; después se lavó tres veces cada pozo con PBS 1X para eliminar el exceso de anticuerpo primario para su posterior incubación con el anticuerpo secundario; Goat Anti-Rabbit IgG H&L Alexa Fluor® 488 (Abcam, US, Cat. ab150077) a una dilución 1:200, por 1 h a temperatura ambiente, en oscuridad.

El análisis y toma de imágenes de fluorescencia se llevó a cabo en un microscopio invertido Leica DM IR2.

Para la tinción de núcleos, se utilizó DAPI (Molecular Probes, US, Cat. S36939), una gota por pozo, en el momento previo a montar la laminilla. La tinción de F-actina se hizo con Oregon Green 488 phalloidin (Invitrogen, Cat. 07466) a una disolución 1:00, con un periodo de incubación de 1 h, a temperatura ambiente, en oscuridad.

### **Citometría de flujo**

La prueba de citometría de flujo se realizó para la detección de Conexina 43, utilizando los anticuerpos primario y secundario: Mouse anti-Conexina 43/GJA1 [CXN-6] (Abcam, US, Cat. ab11369) y Goat Anti-Mouse IgG H&L (Abcam, US, Cat. ab47830) acoplado a FITC; 1  $\mu$ l/1x10<sup>6</sup> células.

Las células fueron despegadas de la caja de cultivo con Tripsina-EDTA en PBS 1X a una concentración de 10mM, lavadas con DMEM completo y con FACS Flow (2). Los lavados con FACS Flow se realizaron con 1 ml de solución, centrifugando a 2000 rpm durante 5 minutos entre cada lavado. Después del último lavado con FACS Flow, se decantó la solución de cada tubo y se agregó el anticuerpo primario con 200 µl de FACS Flow; se incubó por 1 h, a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación se lavó 3 veces con la misma solución para eliminar el anticuerpo que no se haya fijado (2 ml). Se incubó con el anticuerpo secundario por 1 h, a temperatura ambiente, en oscuridad.

Finalmente, se realizaron tres lavados con 2 ml de FACS Flow. Las lecturas se obtuvieron de un espectrómetro de masas CytoFLEX LX (Beckman Coulter, USA).

### **Ensayo MTT**

En cajas de cultivo de 12 pozos, se sembraron 50,000 células/pozo; 12 h después de la siembra, se revisaron los pozos de todas las cajas para verificar la adhesión de células. Se mantuvieron en incubación a 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, por 24, 48 y 72 h, con medio M199 suplementado con 10 % de SFB y 1 % de antibiótico-antimicótico.

Al término de cada periodo de incubación, se procedió con el ensayo: el medio de cultivo fue sustituido y se incubó con las sales de MTT disueltas en PBS 1X (1 mg/ml) por 4 h. Finalizado el tiempo de incubación, se retiró el medio y se lavó con 500 µl de PBS 1X (por pozo). Las sales de formazán precipitadas al interior de las células se disolvieron con 300 µl de DMSO, de los cuales se tomaron alícuotas de 50 µl en placa de 96 pozos para la medición de densidad óptica en un lector de placas Labsystems Multiskan Ascent 354, a una longitud de onda de 492 nm.

### 3. Resultados y discusión

Los protocolos reportados referentes a la transformación de ADSCs en cardiomiocitos plantean la utilización de agentes desmetilantes del ADN, medios condicionantes enriquecidos (diferentes componentes) o el Co-cultivo directo. La transformación las células madre a musculares se evalúa en función de la expresión de nuevos y específicos marcadores proteínicos; para el caso de la inducción de ADSCs en cardiomiocitos, en los principales protocolos se reporta marcaje positivo para miosina de cadena pesada,  $\alpha$  actina y algunas variantes de troponina en modelo conejo [39].

Otros reportan el marcaje para  $\alpha$  actina sarcomérica, conexina 43, conexina 40, etc., usando ratones adultos [40]. El grupo de Choi *et al.* [43], que revisó los principales protocolos evaluando su eficiencia para inducir ADSCs humanas a cardiomiocitos contráctiles, concluyó que el método de Co-cultivo directo era la mejor opción para la transformación; los marcadores que ellos evaluaron fueron Nkx2.5, Troponina I y  $\alpha$  actina. Sus pruebas de inmunofluorescencia mostraron que la expresión de Trop I en las ADSCs se consigue utilizando un medio condicionante después de 3 semanas de cultivo; esta proteína no se expresó en las células adiposas tratadas con 5-azacitidina. El método de Co-cultivo indirecto (con membranas de división de cultivo por pozo, manteniendo medio de cultivo común para cardiomiocitos primarios y ADSCs) no mostró diferencias durante el marcaje para actina, troponina T, etc., en relación con el grupo control.

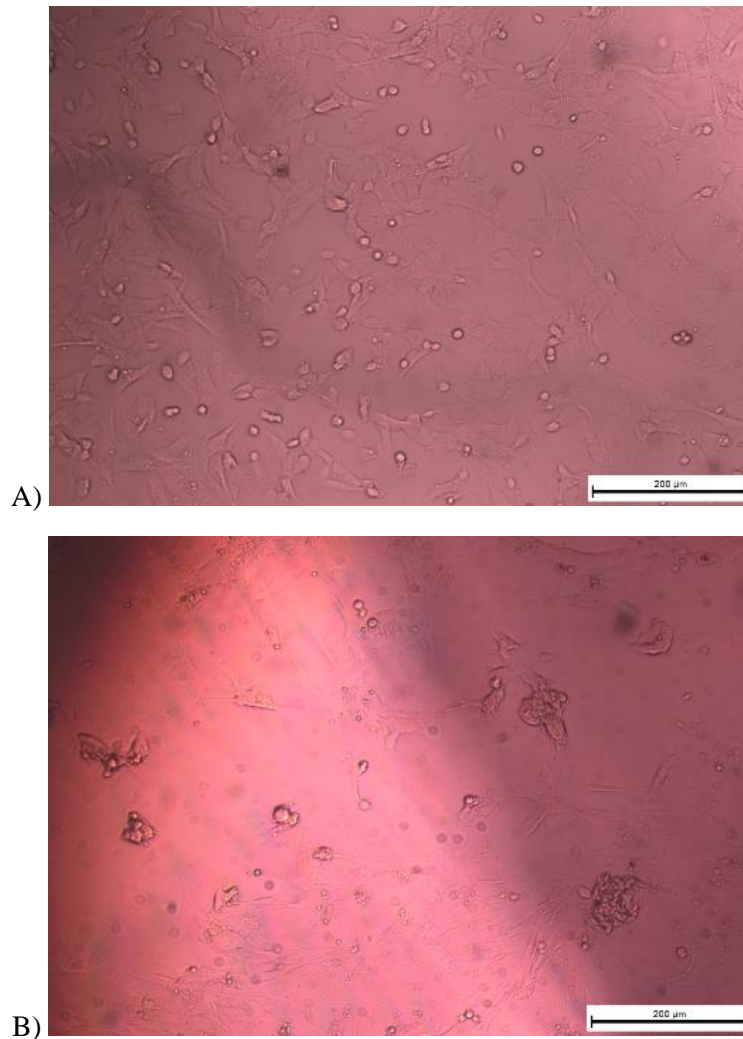
Se consideraron los marcadores  $\alpha$ -actina y miosina de cadena pesada debido a que son dos proteínas comúnmente utilizadas para la evaluación de transformación de ADSCs en células cardíacas [39]; el marcador desmina se seleccionó por ser un marcador de origen muscular (de origen cardíaco, esquelético o liso) [26]. Los marcadores para troponina cardíaca T y conexina 43 se seleccionaron debido a su prevalencia en tejido cardíaco nativo y la expresión de proteínas reportada por otros investigadores [43].

Inicialmente, en las pruebas piloto, se probó el protocolo de 5-Azacitidina en ambos medios de cultivo, M199 y RPMI1640, para determinar en cuál medio se observaban mejores resultados, pero las células sembradas y tratadas con el agente desmetilante en el medio de cultivo RPMI1640 no proliferaban (no se adhirieron a las cajas de cultivo). Por eso se decidió trabajar con M199; además de que el mismo medio, mostraba una mejor conservación del cultivo primario de cardiomiocitos (supervivencia del cultivo de por al menos 14 días; en comparación con los cardiomiocitos cultivados con RPMI1640, con tan sólo 10 días).

#### 3.1. ADSCs tratadas con 5-Azacitidina

A continuación, se muestran las imágenes por microscopia de campo claro de las células tratadas con 5-Azacitidina y no fueron registrados cambios morfológicos en la primera semana del tratamiento; se registró una disminución inicial en la proliferación durante los primeros 3-4 días, en comparación con las células del grupo control. Después de estos días, hubo una recuperación en la tasa de división celular.

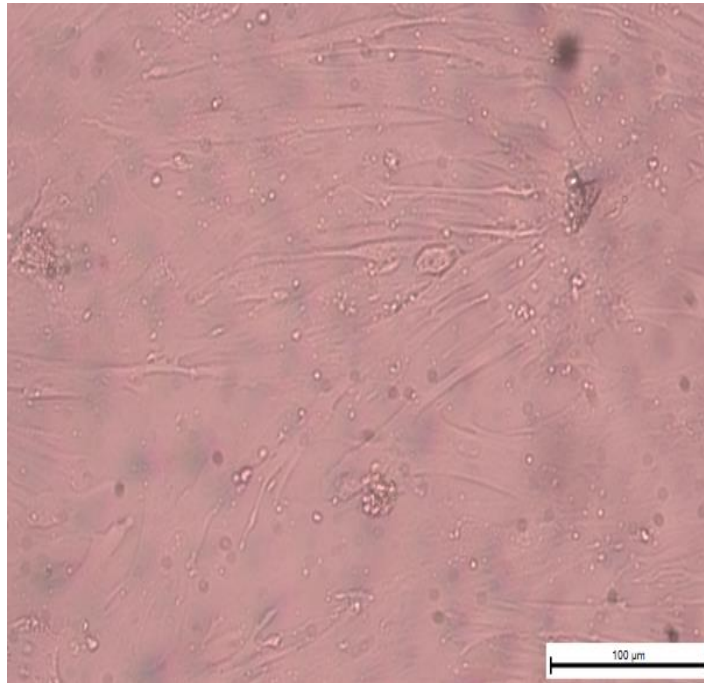
Para la segunda semana, las células comenzaron a mostrar cambios morfológicos, elongando sus citoplasmas o redondeándose; algunas comenzaron a aglomerarse en subconjuntos, posiblemente liposomas, por el origen de las ADSCs (**Figura 3.1**).



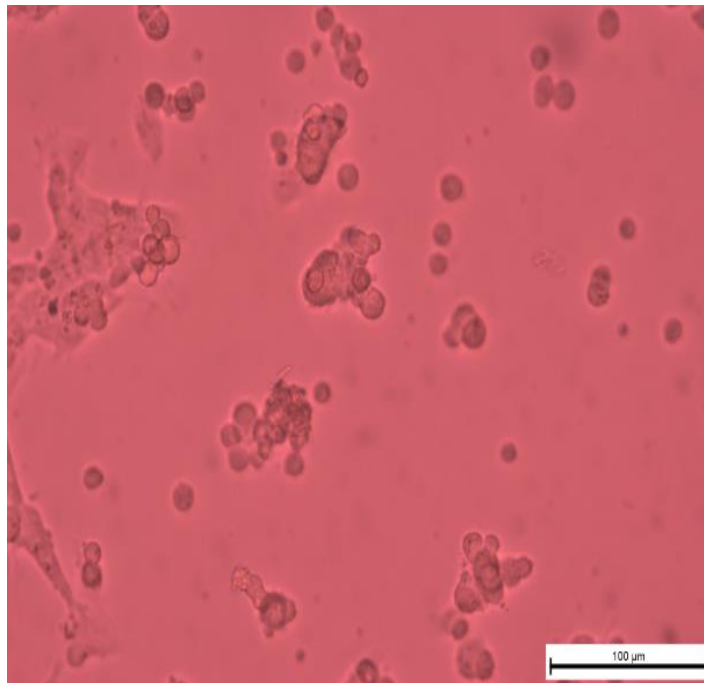
*Figura 3.1. Imágenes de la progresión del cultivo de ADSCs tratadas con 5-Azacytidina. Semana 2.*

*En A) Morfología típica de ADSCs; en B) Prolongación del citoplasma de algunas células, formación de aglomeraciones. Escala de microscopías: 200 µm.*

Para la tercera semana: Se observó una elongación de citoplasma hacia células vecinas más marcada y una reorientación de estas formaciones formando estructuras semi-fibrilares (**Figura 3.2**). Algunas células entraron en apoptosis después de propagar su citoplasma (**Figura 3.3**). Algunos complejos celulares comenzaron a tomar formas redondeadas, parecidos a los cuerpos tipo ‘bola’ de Rangappa *et al.* [39], **Figura 3.4**. Las formaciones de grupos celulares unidas por propagación del citoplasma comenzaron a tener una conformación característica: Se observaron conjuntos de células redondeadas separadas de otros unidas a través de la propagación en conjunto de sus citoplasmas (**Figura 3.5**).



*Figura 3.2. Formación de estructuras semi-fibrilares, ADSCs tratadas con 5-Azacytidina. Semana 3. Formación de estructuras fibrilares. Escala: 100 μm.*



*Figura 3.3. ADSCs tratadas con 5-Azacytidina, células en apoptosis después de propagar su citoplasma. Semana 3. Escala: 100 μm.*

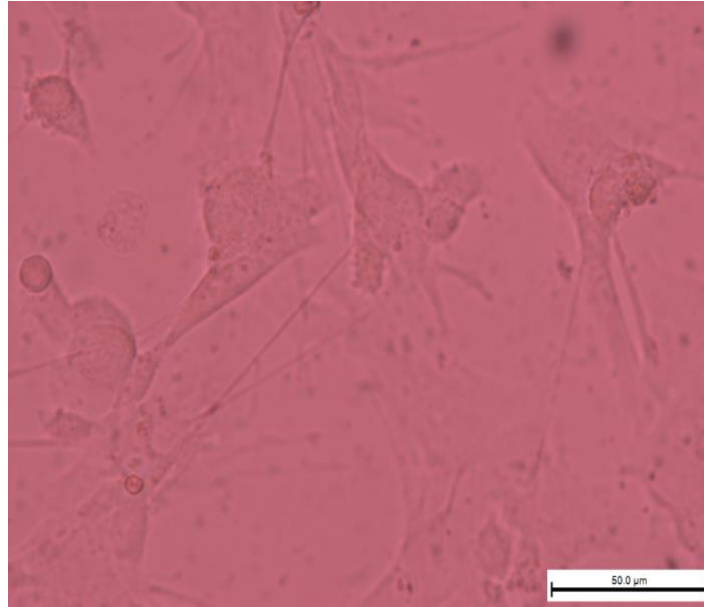


Figura 3.4. Cambios morfológicos del cultivo de ADSCs tratadas con 5-Azacytidina. Semana 3. Formación de complejos tipo 'bola'. Escala: 50  $\mu$ m.

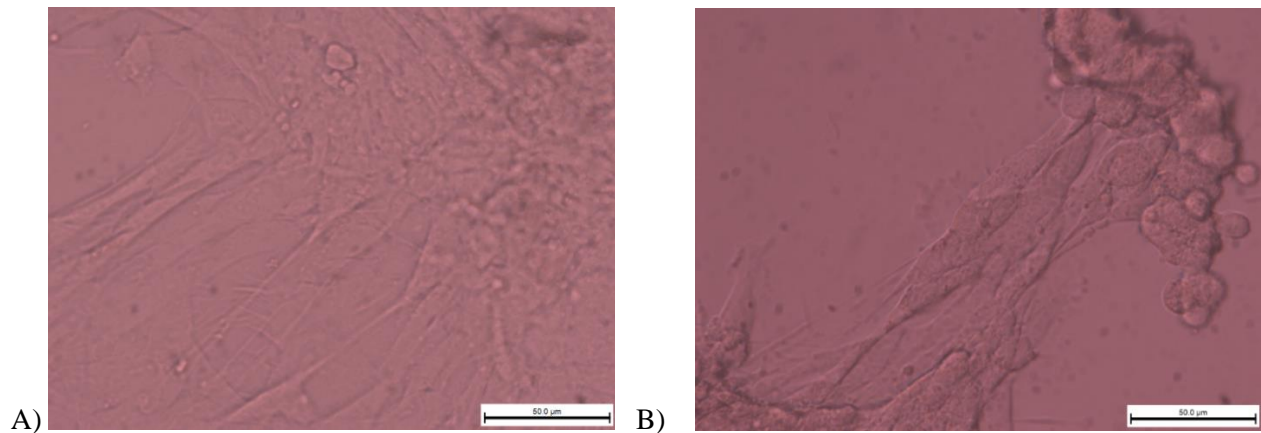


Figura 3.5. ADSCs tratadas con 5-Azacytidina, complejos tipo bola unidos propagación de citoplasma, semana 3. En A) Se observa la conexión celular a través de citoplasmas propagados; en B) Formaciones típicas del cultivo, aglomeraciones de células unidas por citoplasmas extendidos. Escalas: 50  $\mu$ m.

A pesar de tratarse del mismo modelo animal y concentraciones de trabajo (Rangappa *et al.* [39]), durante nuestras pruebas sólo se observó la propagación citoplasmática de las ADSCs, formación de complejos tipo bola y algunas células binucleadas. No se observaron células marcapasos o contracción espontánea por parte de algún complejo formado. Esto pudo deberse a que las condiciones de aislamiento, cultivo y tratamiento de las ADSCs con el agente desmetilante 5-Azacytidina fueron diferentes; el trabajo de Rangappa *et al.* [39] maneja esas concentraciones del fármaco y tiempo de incubación, pero se hizo con medio RPMI 1640 y un protocolo de aislamiento de ADSCs diferente al utilizado en nuestro laboratorio. Las células madre aisladas con el protocolo

reportado en esta tesis ya fueron previamente caracterizadas por inmunotinción con citometría de flujo, por lo que la población de estudio está claramente identificada como ADSCs.

Para nuestros fines prácticos, la obtención de células musculares cardíacas, la expresión de las proteínas analizadas son indicios suficientes y deseables del proceso de diferenciación; pues no requerimos células con actividad marcapasos autónoma. De hecho, no es deseable que las células obtenidas muestren contractibilidad automática, sin un estímulo previo, pues eso pondría en riesgo su implantación como tejido autólogo dentro de tejido cardíaco con células del fascículo atrioventricular independientes. El patrón de conducción del tejido nativo cardíaco no debe ser perturbado o limitado por las células implantadas, esto podría producir un infarto al miocardio por la disrupción del equilibrio del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular de músculo cardíaco [47-48].

En cuanto a la expresión de los marcadores musculares y cardíacos específicos analizados, las ADSCs tratadas expresaron los tres marcadores cardíacos en que se centró este estudio (dando positivo también para desmina, lo que lo diferenció del grupo control de ADSCs sin tratamiento); sin embargo, durante las revisiones no se observó actividad de células marcapasos ni contracciones esporádicas. Se observaron durante 6 semanas sin poder registrar actividad contráctil. Las células no fueron monitoreadas (grabadas) durante todo el periodo de experimentación o periodo de observación después de finalizado el tratamiento; tampoco se sometieron las células a alguna prueba de estimulación electrofisiológica que nos permita establecer o rechazar su capacidad contráctil.

A continuación, se muestran las microscopías de las tinciones con anticuerpos musculares y cardíacos específicos para el grupo de ADSCs tratadas con 5-Azacitidina, comparando con las ADSCs sin tratamiento. NOTA: La barra en la parte inferior derecha de cada imagen corresponde a la escala micrométrica de las imágenes.



### 3.1.1. Inmunocitoquímica ADSCs y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina

**Marcador: Anti-actina** (Mono mouse anti-human smooth muscle Actin Clone 1A4), **Figura 3.6.**

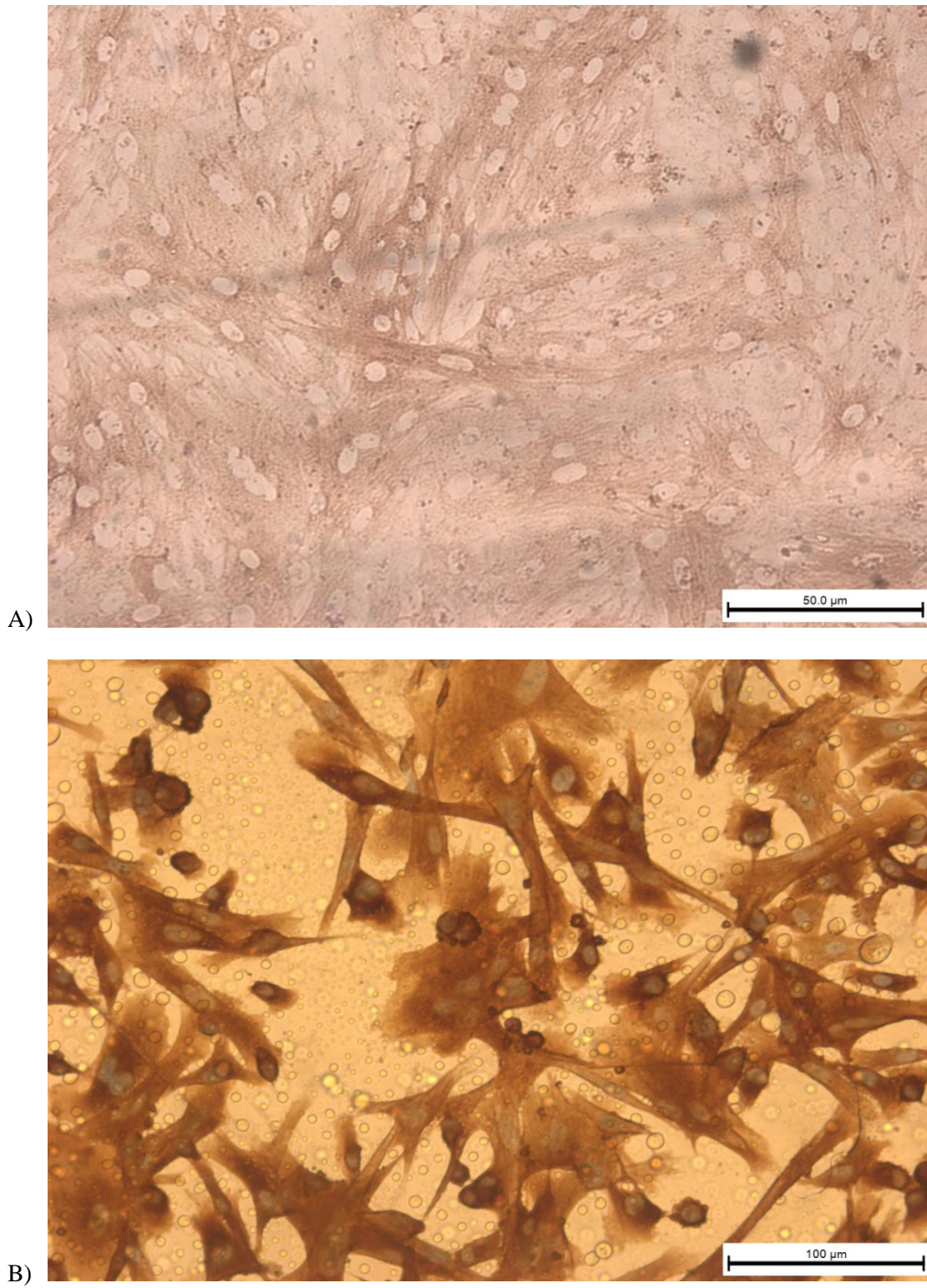
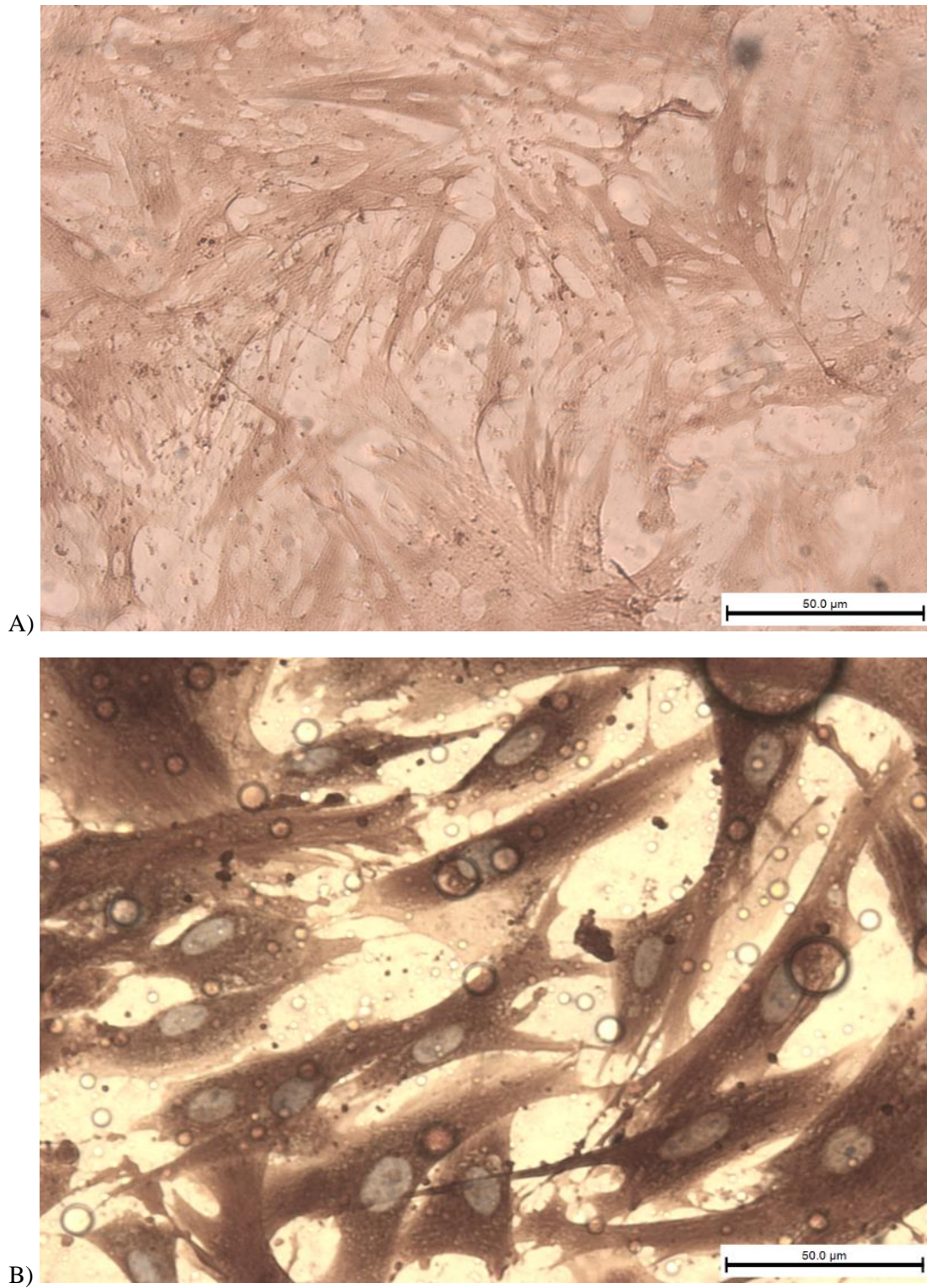


Figura 3.6. Inmunocitoquímica positiva para actina en ADSCs (A) y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (B). Escalas: 50  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

**Marcador: Anti-actina** (Mono mouse anti-human smooth muscle Actin Clone 1A4), **Figura 3.7.**



*Figura 3.7. Inmunocitoquímica positiva para actina en ADSCs (A) y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (B). Escalas: 50 µm.*

### 3.1.2. Inmunocitoquímica ADSCs y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina

**Marcador: Anti-miosina** (Mono mouse anti-human smooth muscle Myosin heavy chain Clone SSMS-1), **Figura 3.7.**

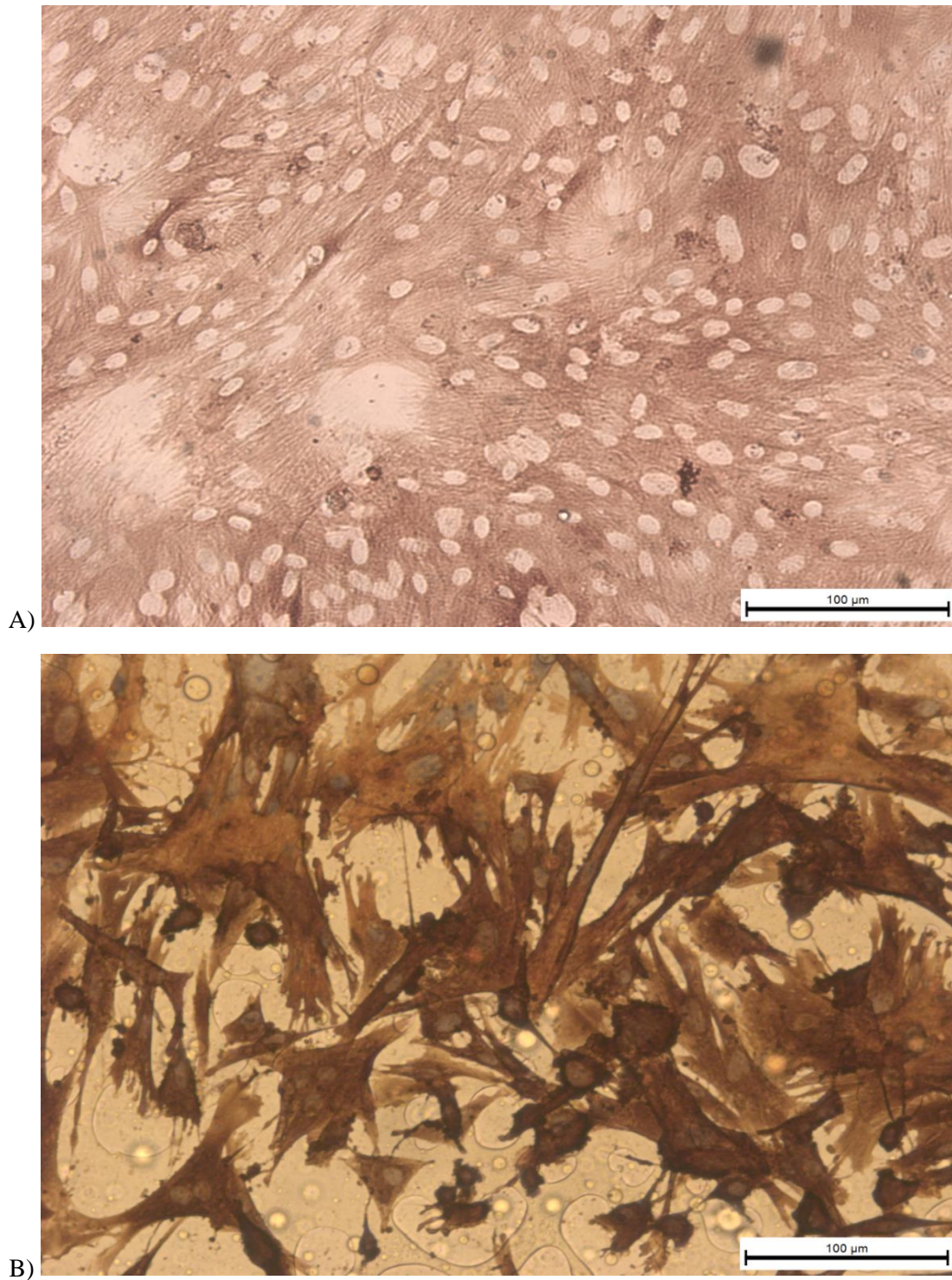
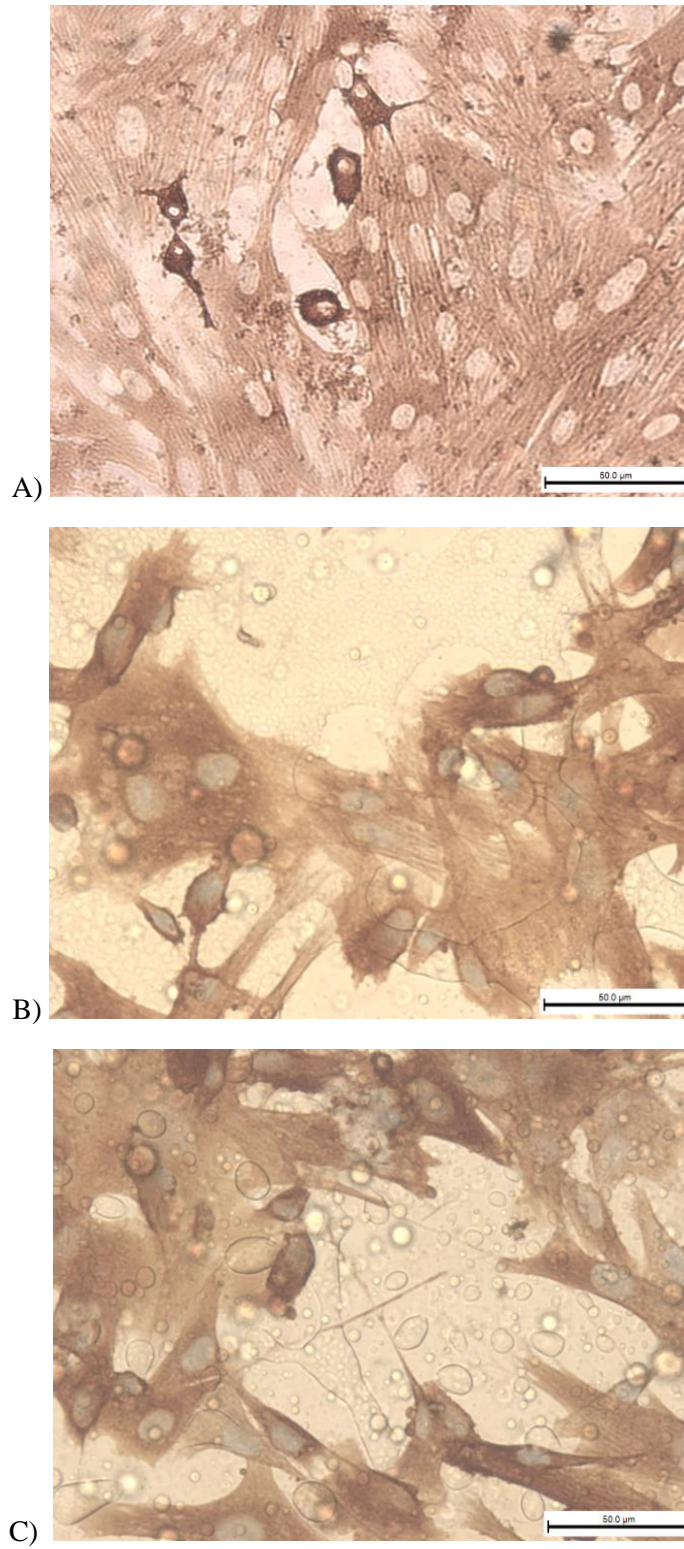


Figura 3.7. Inmunocitoquímica positiva para miosina en ADSCs (A) y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (B). Escalas: 100  $\mu\text{m}$ .

**Marcador: Anti-miosina** (Mono mouse anti-human smooth muscle Myosin heavy chain Clone SSMS-1), **Figura 3.8.**



*Figura 3.8. Inmunocitoquímica positiva para miosina en ADSCs (A) y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (B y C). Escalas: 50 µm.*

### 3.1.3. Inmunocitoquímica ADSCs y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina

**Marcador: Anti-desmina** (Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin Clone D33), **Figura 3.9.**

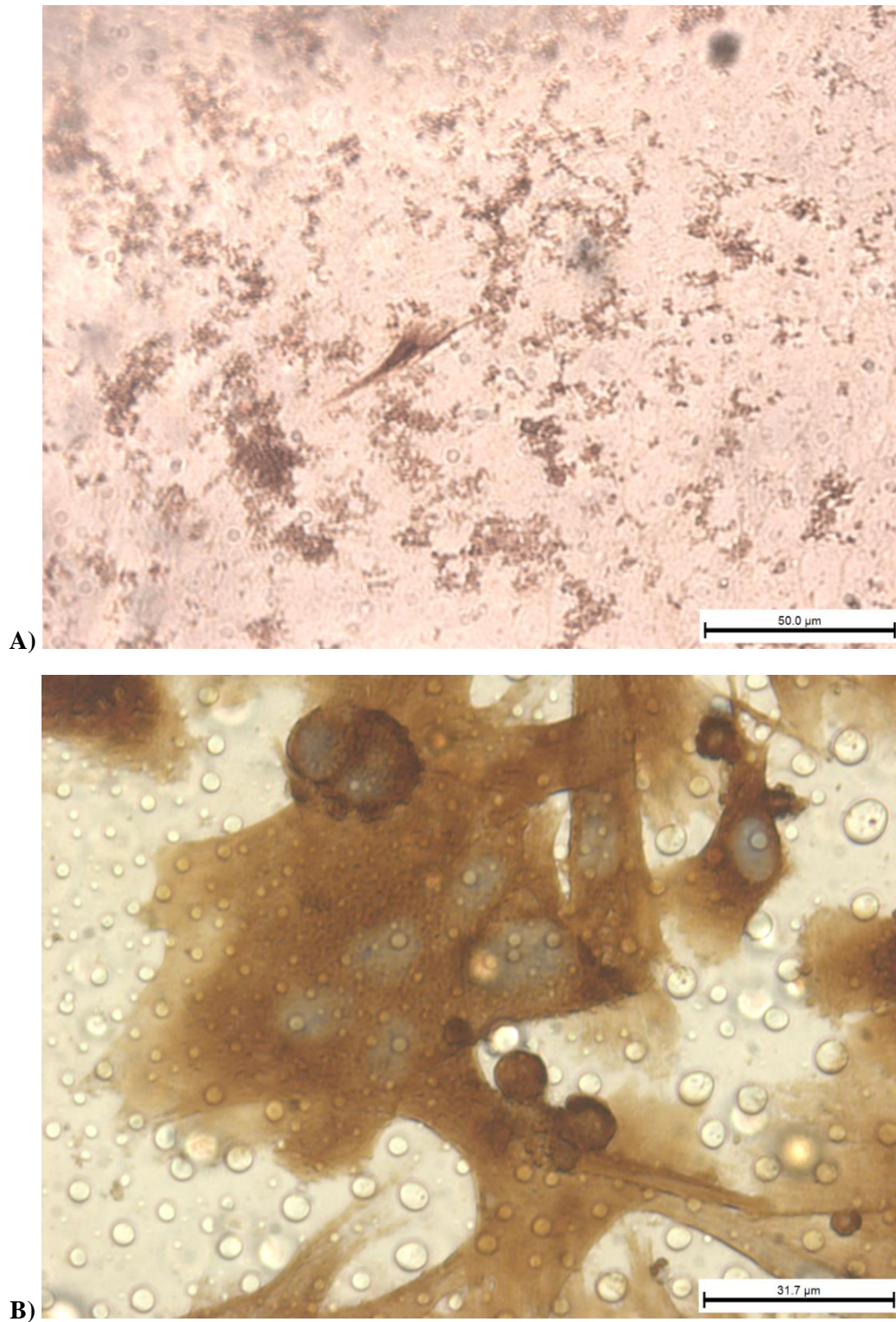
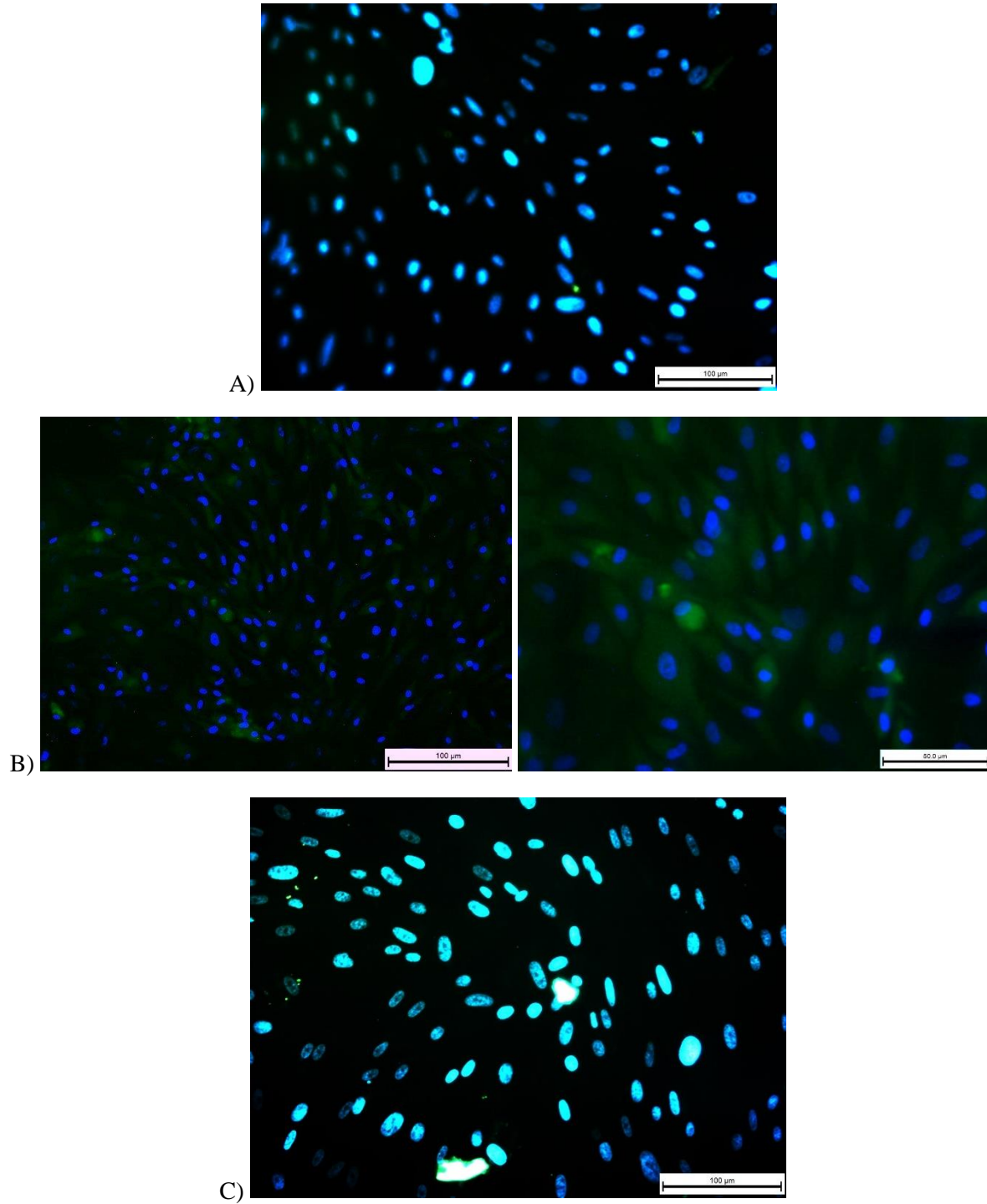


Figura 3.9. Inmunocitoquímica positiva para desmina en ADSCs (A) y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (B). Escalas: 50 µm y 31.7 µm, respectivamente.

### 3.1.4. Inmunofluorescencia ADSCs, tejido nativo cardíaco y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina

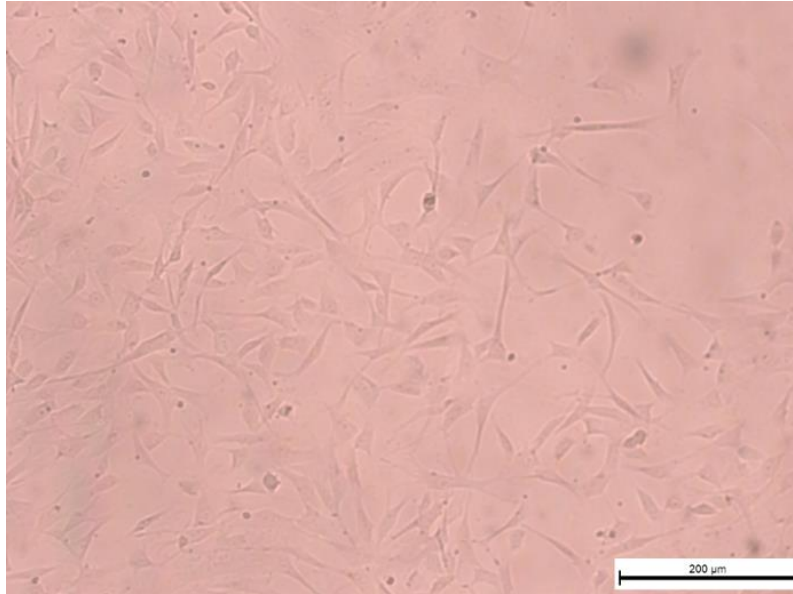
**Marcador: Anti-Troponina cardíaca T** (Rabbit Anti-Cardiac Troponin T ab45932; secundario Goat Anti-Rabbit IgG H&L ab150077), **Figura 3.10.**



*Figura 3.10. Inmunofluorescencia para Troponina cardíaca T: ADSCs (control negativo, A), Tejido nativo (control positivo, B) y ADSCs tratadas con 5-Azacitidina (C). Escalas: A y C, 100 μm; B izq., 100 μm, B derc. 50 μm.*

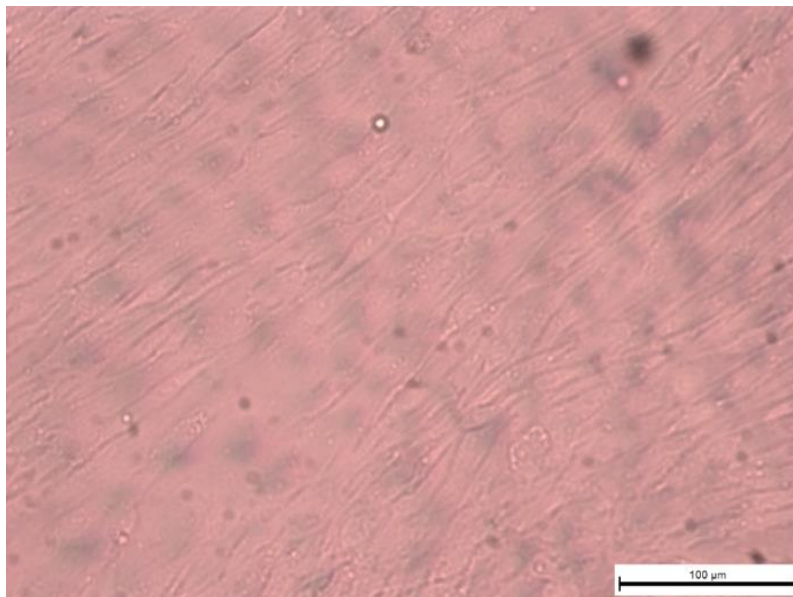
### 3.2. ADSCs en Co-Cultivo indirecto

Las ADSCs se cultivaron por 3-4 semanas con medio condicionante de cultivo primario de cardiomiocitos de conejo. No hubo cambios morfológicos apreciables durante el tiempo de Co-Cultivo indirecto (no hubo propagación de citoplasma), las células alcanzaron confluencia completa entre la tercera y cuarta semana. Para la semana 2-3 se observó una forma típica de huso, no se registró ningún cambio morfológico ni conformación de estructuras tipo bola (**Figura 3.11**).



*Figura 3.11. Co-Cultivo de ADSCs en Co-Cultivo indirecto, morfología común a las ADSCs sin tratamiento. Semana 2-3. Escala: 200 μm.*

Para la semana 4 las células estaban confluentes, no se observó alguna actividad contráctil (células marcapasos), **Figura 3.12**.



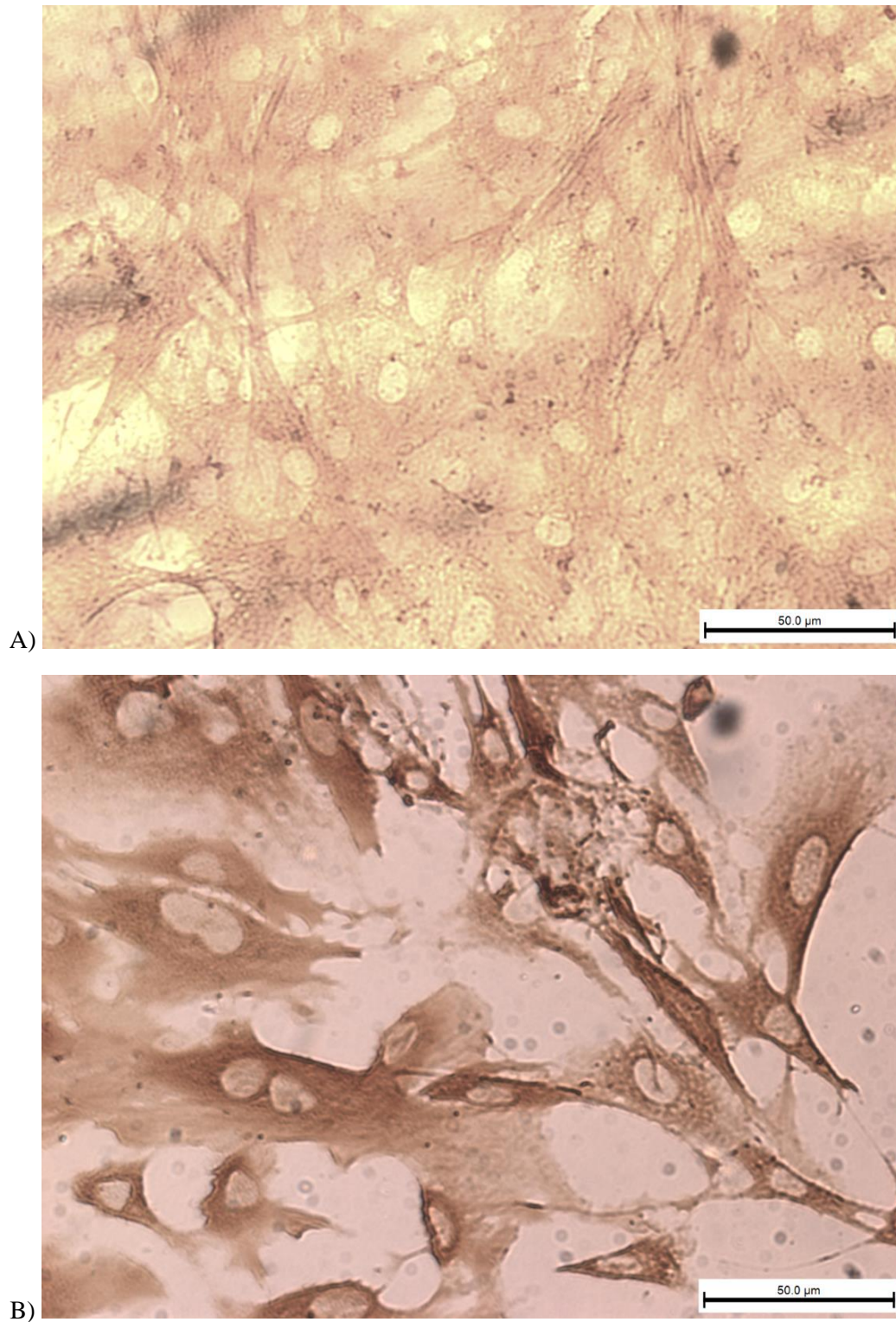
*Figura 3.12. Co-Cultivo de ADSCs en Co-Cultivo indirecto, morfología común a las ADSCs sin tratamiento. Semana 4. Escala: 100 μm.*

A pesar de no ser considerado como la mejor opción de inducción de transformación de ADSCs en células musculares cardíacas, el método de Co-Cultivo indirecto nos permitió observar la expresión de los tres marcadores musculares y Troponina T (mediante inmunocitoquímica e inmunofluorescencia), a diferencia de lo reportado respecto al Co-Cultivo indirecto sobre ADSCs humanas utilizando membranas de cultivo separado por pozo y a diferencia de las ADSCs tratadas con 5-Azacitidina [43]. A continuación, se muestran las microscopías de las tinciones con anticuerpos musculares y cardíacos específicos para el grupo de ADSCs tratadas por Co-Cultivo indirecto. Comparando células de tejido cardíaco nativo (control positivo).



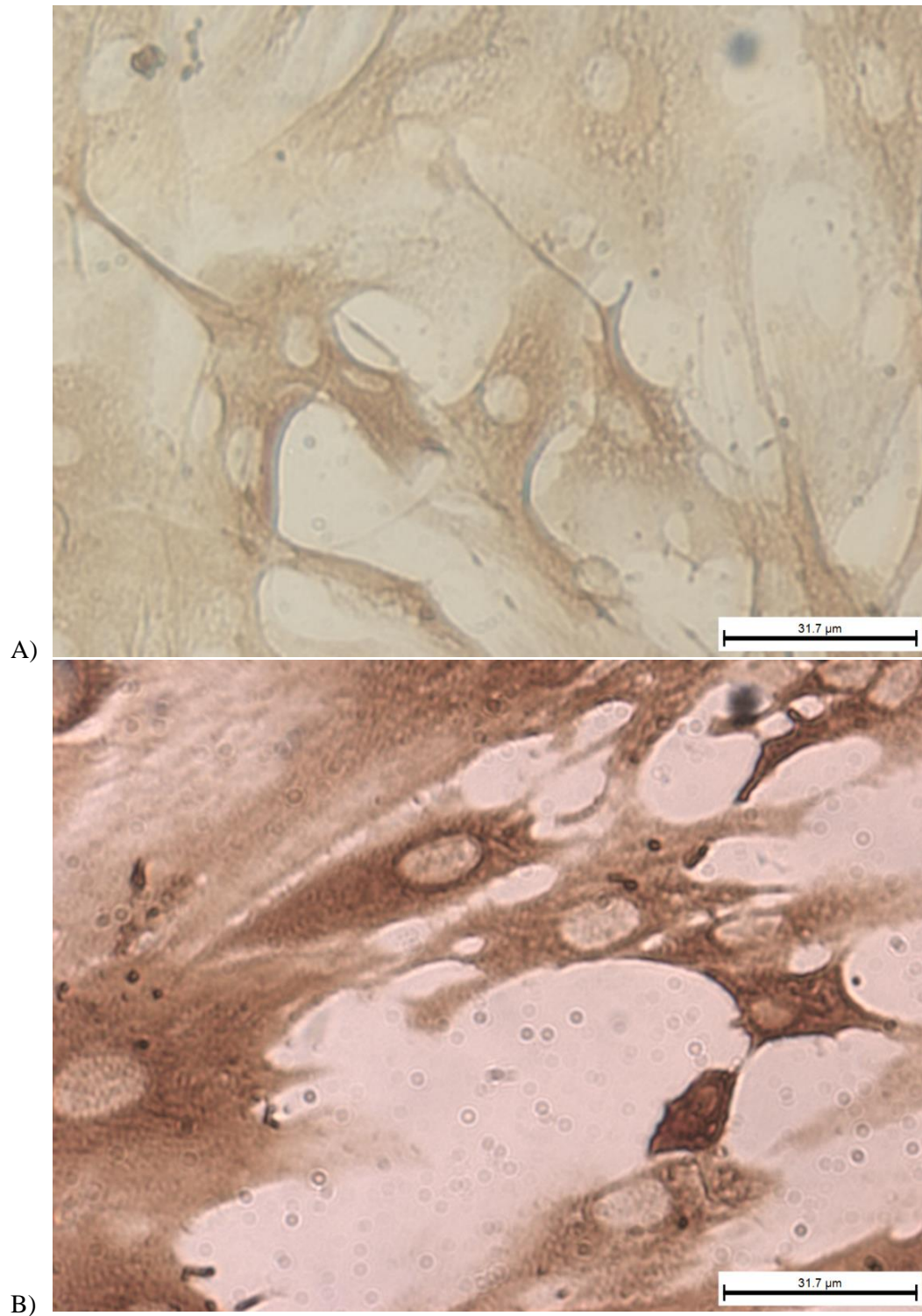
*3.2.1. Inmunocitoquímica tejido nativo cardíaco y ADSCs en Co-Cultivo indirecto*

**Marcador: Anti-actina** (Mono mouse anti-human smooth muscle Actin Clone 1A4), **Figura 3.13.**



*Figura 3.13. Inmunocitoquímica positiva para actina en ADSCs (A) y ADSCs tratadas en Co-Cultivo indirecto (B). Escalas: 50 µm.*

**Marcador: Anti-actina** (Mono mouse anti-human smooth muscle Actin Clone 1A4), **Figura 3.14.**



*Figura 3.14. Inmunocitoquímica positiva para miosina en Tejido nativo (A) y ADSCs tratadas en Co-Cultivo indirecto (B). Escalas: 37.1 µm.*

### 3.2.2. Inmunocitoquímica tejido nativo cardíaco y ADSCs en Co-Cultivo indirecto

**Marcador: Anti-miosina** (Mono mouse anti-human smooth muscle Myosin heavy chain Clone SSMS-1), **Figura 3.15.**

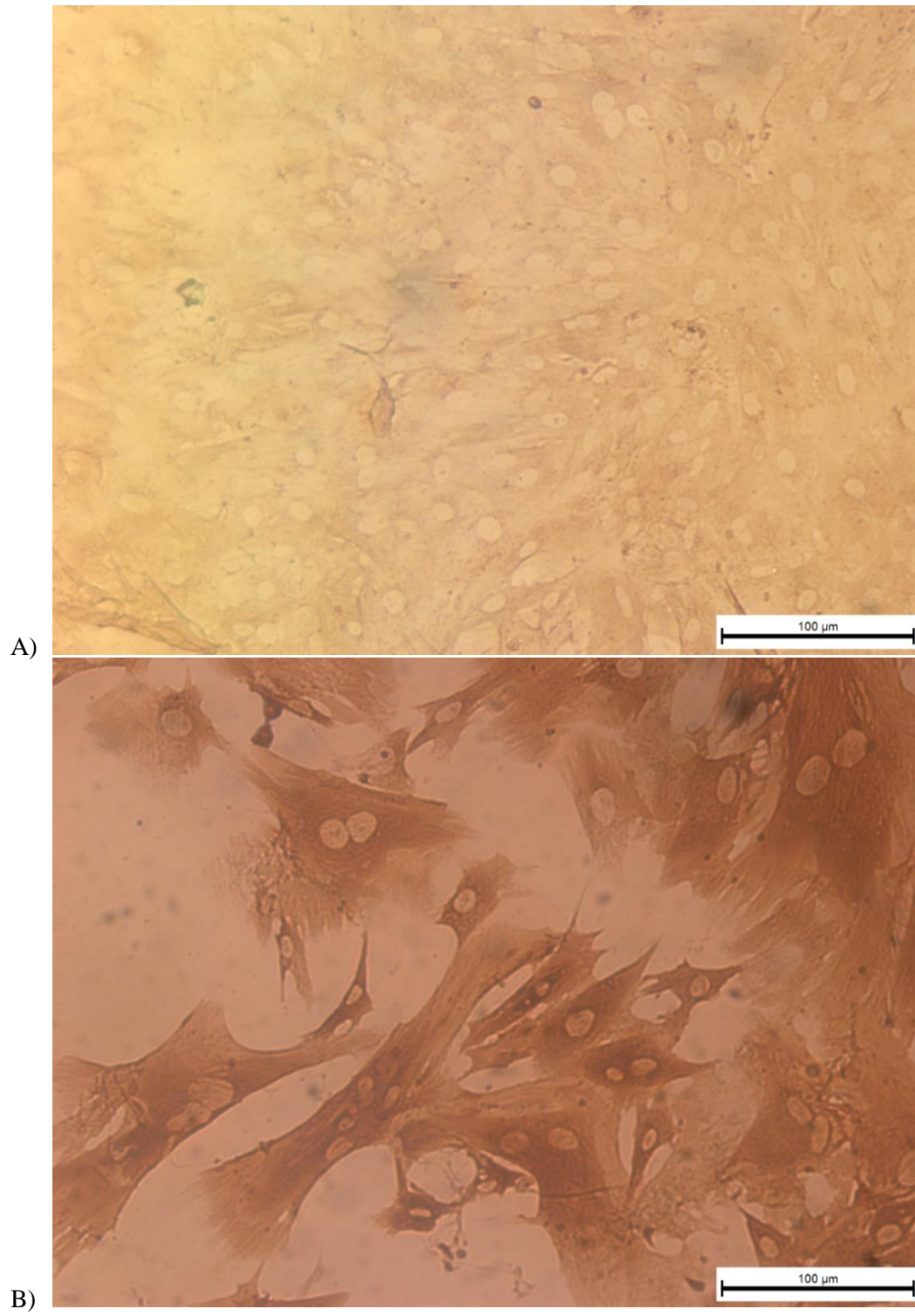
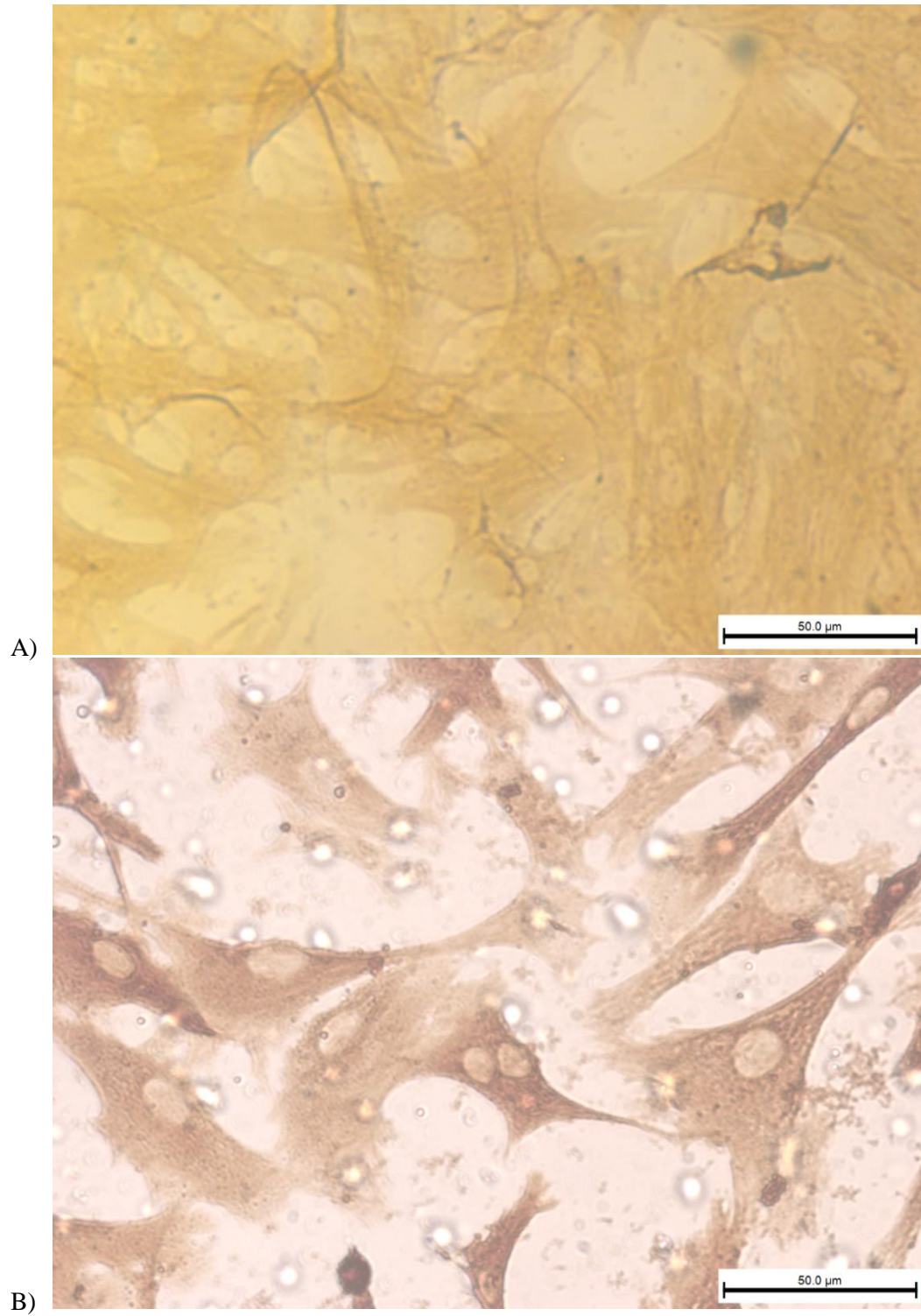


Figura 3.15. Inmunocitoquímica positiva para miosina en Tejido nativo (A) y ADSCs tratadas en Co-Cultivo indirecto (B). Escalas: 100 µm.

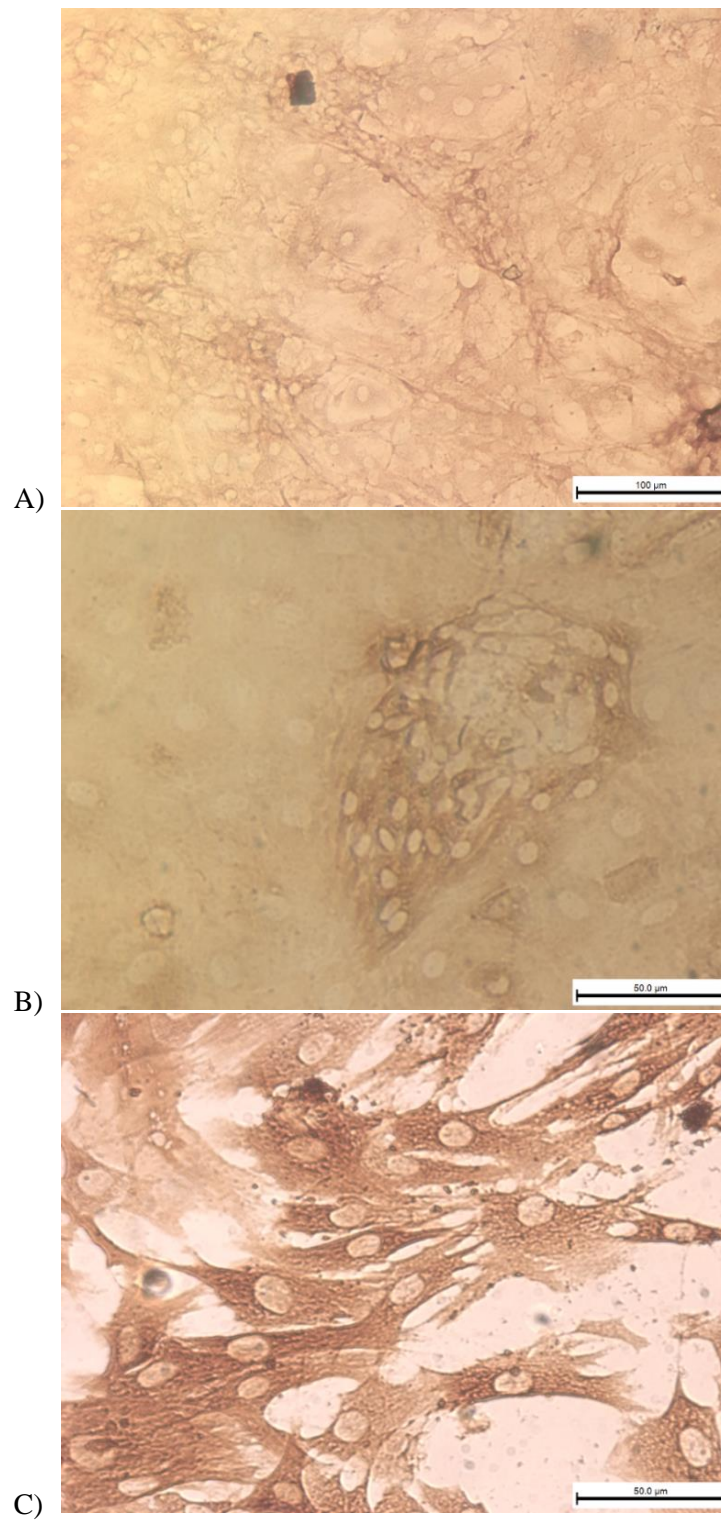
**Marcador: Anti-miosina** (Mono mouse anti-human smooth muscle Myosin heavy chain Clone SSMS-1). **Figura 3.16.**



*Figura 3.16. Inmunocitoquímica positiva para miosina en Tejido nativo (A) y ADSCs tratadas en Co-Cultivo indirecto (B). Escalas: 100 µm.*

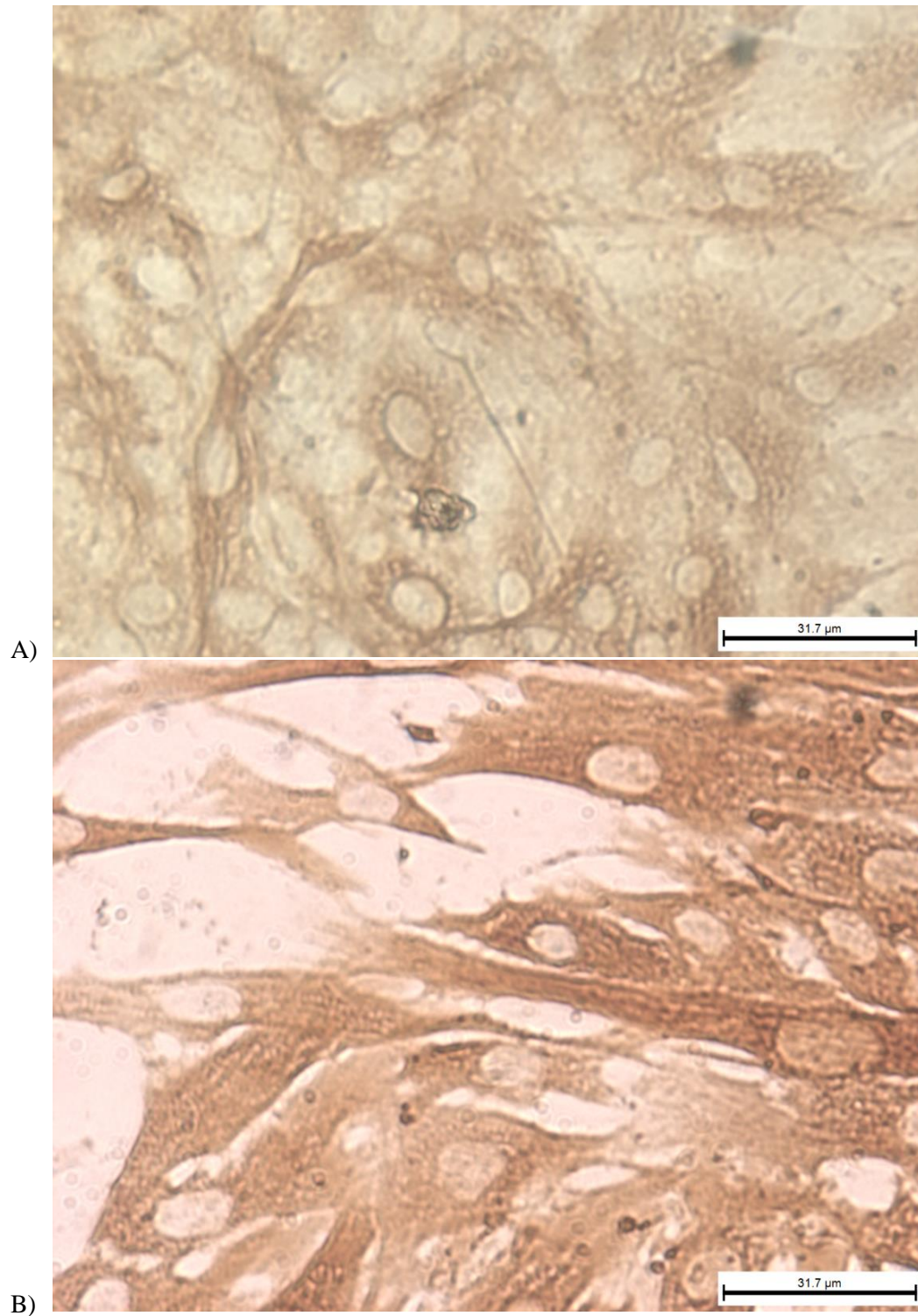
### 3.2.3. Inmunocitoquímica tejido nativo cardíaco y ADSCs en Co-Cultivo indirecto

**Marcador: Anti-desmina** (Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin Clone D33), **Figura 3.17.**



*Figura 3.17. Inmunocitoquímica positiva para desmina en Tejido nativo (A y B) y ADSCs tratadas en Co-Cultivo indirecto (C). Escalas: A, 100 µm; B y C, 50 µm.*

**Marcador: Anti-desmina** (Monoclonal Mouse Anti-Human Desmin Clone D33), **Figura 3.18.**



*Figura 3.18. Inmunocitoquímica positiva para desmina en Tejido nativo (A) y ADSCs tratadas en Co-Cultivo indirecto (B). Escalas: 37.1 µm.*

### 3.2.4. Inmunofluorescencia ADSCs en Co-Cultivo indirecto. Tejido nativo y ADSCs en Co-Cultivo indirecto

**Marcador: Anti-Troponina cardíaca T** (Rabbit Anti-Cardiac Troponin T ab45932; anticuerpo secundario Goat Anti-Rabbit IgG H&L ab150077), **Figura 3.19.**

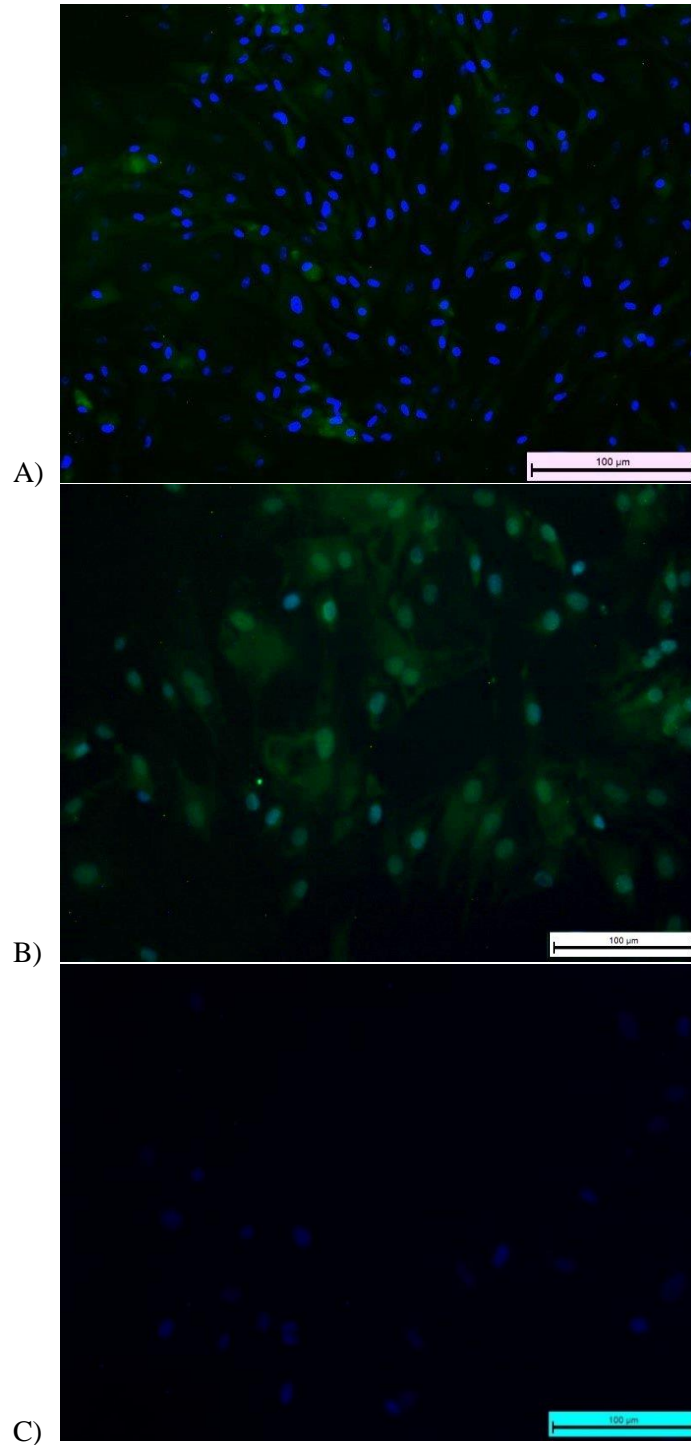


Figura 3.19. Inmunofluorescencia para Troponina cardíaca T: Tejido nativo (control positivo, A), ADSCs tratadas en Co-Cultivo (B) y control negativo (C). Escalas: 100 μm.

Al igual que con las ADSCs tratadas con el agente desmetilante, las células madre tratadas por Co-Cultivo indirecto fueron positivas para la tinción de  $\alpha$ -actina, miosina de cadena pesada, desmina y troponina cardíaca T. No se observó actividad contráctil espontánea a lo largo de las revisiones del cultivo. Tampoco se tiene un registro (grabación) de las ADSCs a lo largo del tratamiento, ni se sometieron estas a estimulación electrofisiológica específica para verificar su capacidad contráctil.

### 3.3. Citometría de flujo para la detección de células presentando marcadores cardíacos.

Se realizó una medición a través de citometría de flujo para Conexina 43:

**Anti-Conexina 43** (Gráfico 1):

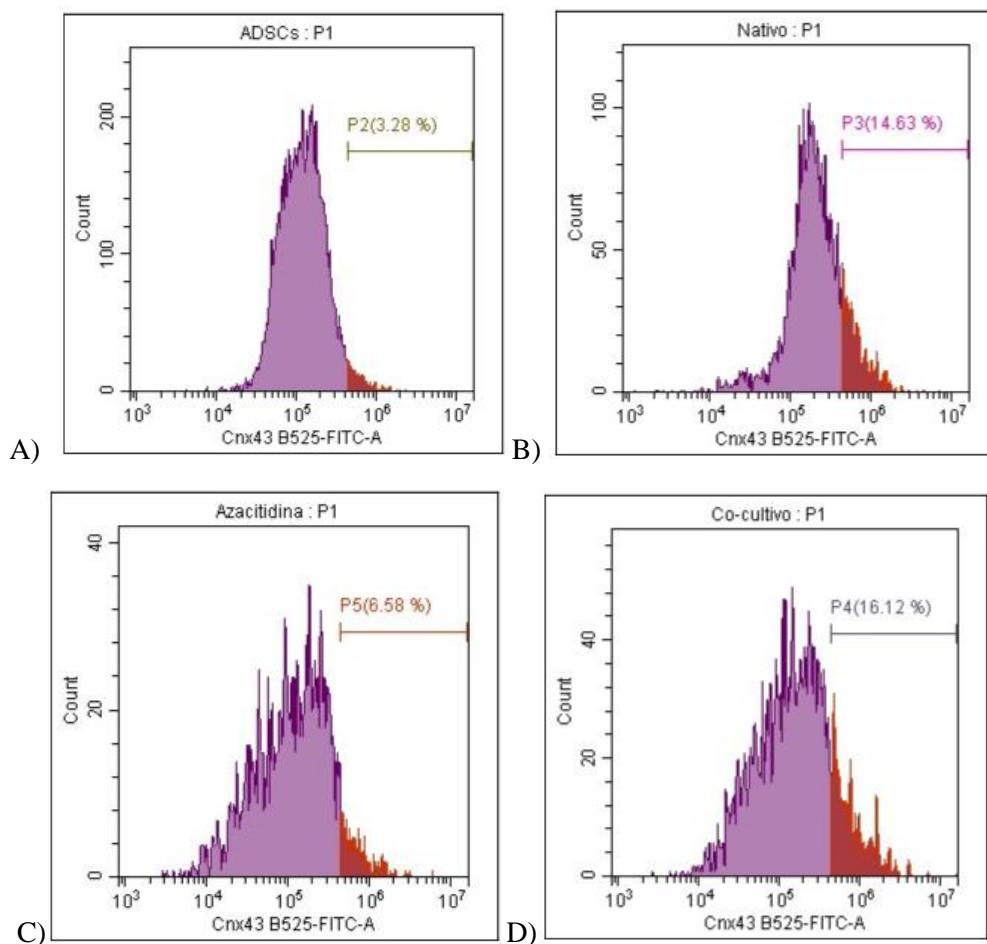


Gráfico 1. Citometría de flujo para Conexina 43. A) ADSCs sin tratamiento, B) Tejido cardíaco nativo, C) ADSCs tratadas con 5-Azacitidina y D) ADSCs en Co-Cultivo indirecto. Donde se observan los porcentajes de expresión total de la proteína sobre la población evaluada.

En el caso del marcador para Conexina 43, mediante esta técnica, sí se pudo detectar la proteína en los grupos de interés. Siendo las ADSCs sin tratamiento negativas (con un porcentaje de expresión menor al 4%). El tejido nativo obtuvo un porcentaje de 14 por ciento, semejante a la expresión de la



proteína para las ADSC en Co-Cultivo (16%). Contrariamente a la expresión de Troponina T cardíaca, el grupo de ADSCs-Azacitidina tuvo una expresión marginalmente positiva para Conexina 43, con apenas un 6% de expresión sobre la población de estudio. Si bien, ambos tratamientos sobre las ADSCs están induciendo un incremento en la expresión de la proteína, las ADSCs tratadas con 5-Azacitidina expresan un porcentaje considerablemente menor en comparación al tejido nativo y las ADSCs en Co-Cultivo indirecto.

El control negativo, las ADSCs sin tratamientos para diferenciación obtuvieron un porcentaje inferior a 4% de expresión, por lo que se considera negativo para la población; lo que coincide con la carencia de proteínas especializadas en transmitir señales eléctricas que se espera en las ADSCs.

### ***3.4. Relación de detección para marcadores de superficie detectados por inmunotinción.***

A continuación, se muestra en la Tabla 2 el resultado de los marcapos con anticuerpos sobre los diferentes grupos experimentales. Controles (ADSCs y tejido cardíaco nativo) y experimentales.

Tabla 2.

<b>Marcador</b>	<b>ADSCs</b>	<b>Tejido cardíaco nativo</b>	<b>ADSCs tratadas con 5-Azacitidina</b>	<b>ADSCs en Co-Cultivo indirecto</b>	<b>Reportado para cardiomiocitos</b>
<b>Actina</b>	+	+	+	+	+
<b>Miosina</b>	+	+	+	+	+
<b>Desmina</b>	-	+	+	+	+
<b>Troponina T cardíaca</b>	-	+	-	+	+
<b>Conexina 43*</b>	3 %	14 %	6 %	16 %	+

Tabla 2. Resumen de los resultados para la expresión de anticuerpos musculares y cardíacos (Inmunocitoquímica, inmunofluorescencia y citometría de flujo).

### 3.5. Viabilidad celular de grupos experimentales

Para determinar la proliferación y viabilidad celular de las células ADSCs sometidas a ambos tratamientos experimentales, se realizaron ensayos MTT a 24, 48 y 72 h de cultivo. Los datos fueron analizados utilizando ANOVA de 1 Vía, en el software OriginPro8, Tukey test. Los porcentajes de viabilidad celular se normalizaron considerando el promedio de densidad óptica de las ADSCs sin tratamiento (control) como el 100% de viabilidad celular.

Los resultados para los dos grupos y cada periodo de incubación se muestran en el siguiente gráfico (2). Los grupos se abreviaron de la siguiente forma: 'A' corresponde a las ADSCs tratadas con 5-Azacitidina; 'CC' corresponde a los grupos de ADSCs en Co-Cultivo indirecto. Los números que acompañan a cada grupo representan el periodo de cultivo celular (horas).

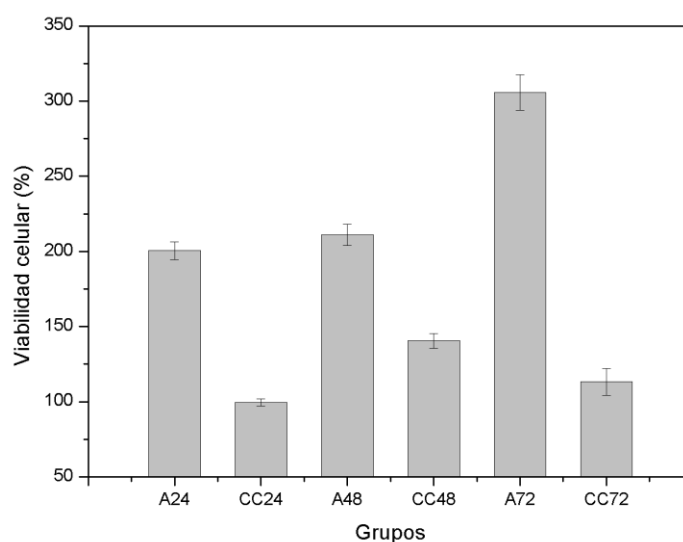


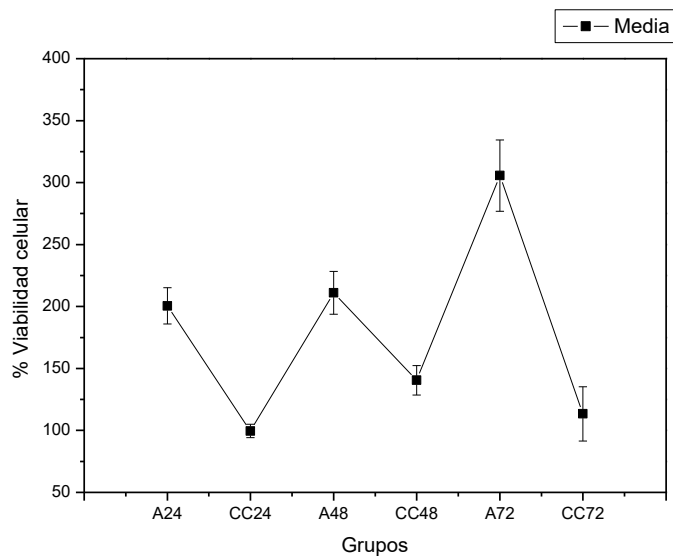
Gráfico 2: Porcentajes de viabilidad celular para ADSCs tratadas con Azacitidina y ADSCs en Co-Cultivo indirecto. 'A': ADSCs tratadas con 5-Azacitidina; 'CC': ADSCs tratadas en Co-Cultivo indirecto. Los números junto a las abreviaturas designan los periodos de crecimiento: 24, 48 y 72 h, respectivamente. (Longitud de la medición: 492 nm)

La prueba de normalidad Shapiro-Wilcoxon arrojó que la mayoría de los grupos tienen una distribución normal, excepto el de Co-Cultivo 72 h, por lo que se consideró utilizar ANOVA de 1 Vía para el análisis.

El análisis estadístico mostró diferencias significativas, con una  $p < 0.05$  ( $3.28232e^{-18}$ ), para la mayoría de los grupos, excepto para las medias de ADSCs tratadas con 5-Azacitidina de 24 y 48 h; y las medias de ADSCs tratadas por Co-Cultivo indirecto de 24 y 72 h y los grupos sembrados a 48 y 72 h. Es decir, no hubo diferencias significativas que permitieran diferenciar A24 de A48; CC24 de CC72 y CC48 de CC72.

El ensayo de viabilidad también nos permitió describir el comportamiento por grupo de cada tratamiento. Después de un nuevo pase, las ADSCs tratadas con 5-Azacitidina no proliferaron significativamente en las primeras 48 h; después exhibieron un crecimiento considerable (triplicando el crecimiento del grupo control). Por otra parte, las ADSCs en Co-Cultivo indirecto mostraron un crecimiento comparable a las ADSCs control (100%) en las primeras 24 h. De 24 a 48 h mostraron

un crecimiento moderado, incrementando tan sólo entre 25-50% la población total. A pesar de que en el gráfico podría mostrar un descenso de la población a 72 h, el análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre estos grupos (Co-Cultivo a 24, 48 y 72 h), como se aprecia en la siguiente gráfica, donde se muestran las medias y desviaciones estándar para cada grupo. **Gráfico 3.**



*Gráfico 3. Medias y desviación estándar para grupos experimentales para ADSCs tratadas con Azacitidina y ADSCs en Co-Cultivo indirecto. 'A': ADSCs tratadas con 5-Azacitidina; 'CC': ADSCs tratadas en Co-Cultivo indirecto. Los números junto a las abreviaturas designan los periodos de crecimiento: 24, 48 y 72 h, respectivamente. (Longitud de la medición: 492 nm)*

### 3.6. Binucleación

Las pocas células binucleadas observadas no pueden considerarse producto propiamente de los tratamientos y la diferenciación, puesto que no hay manera de saber, con el tipo de análisis realizado hasta el momento, si esas células simplemente fueron fijadas durante su proceso natural de mitosis.

#### 3.6.1. ADSCs tratadas con 5-Azacidina.

En general, las ADSCs no presenta binucleación. Sin embargo, bajo el tratamiento con el agente desmetilante fueron detectadas algunas células con doble núcleo. A pesar de que algunas muestras se procesaron con Oregon Green que tiñe filamentos de actina (Invitrogen, Cat. 07466), la resolución y distribución de las células no permite diferenciar claramente si se trata o no de una doble nucleación. La binucleación se pudo apreciar mejor mediante ensayos de inmunocitoquímica (para actina o miosina); sin embargo, ésta sólo se observó en casos aislados, como lo reportaron Rangappa y Planat-Bénard [38-40], **Figura 3.22 y 3.23.**

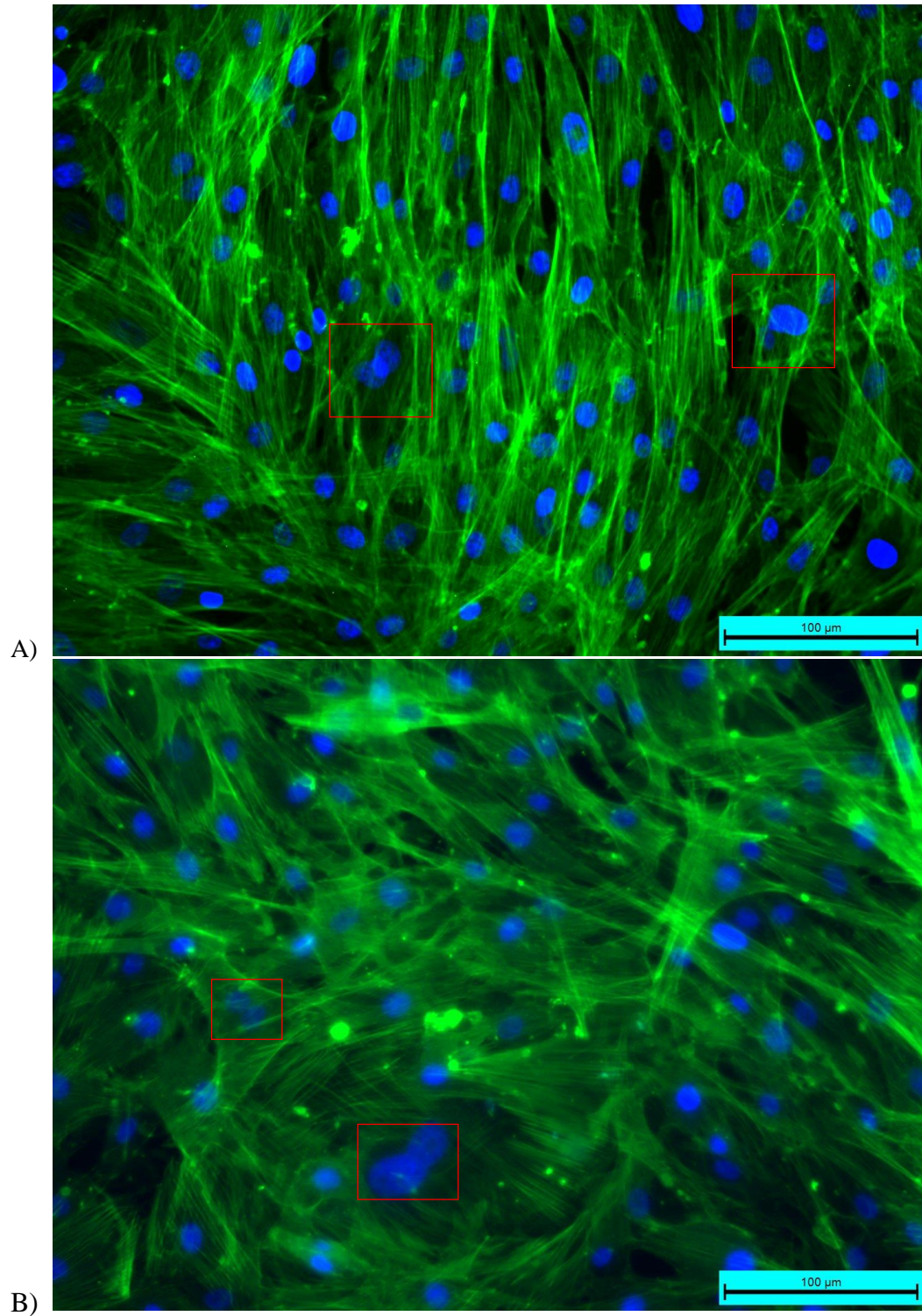
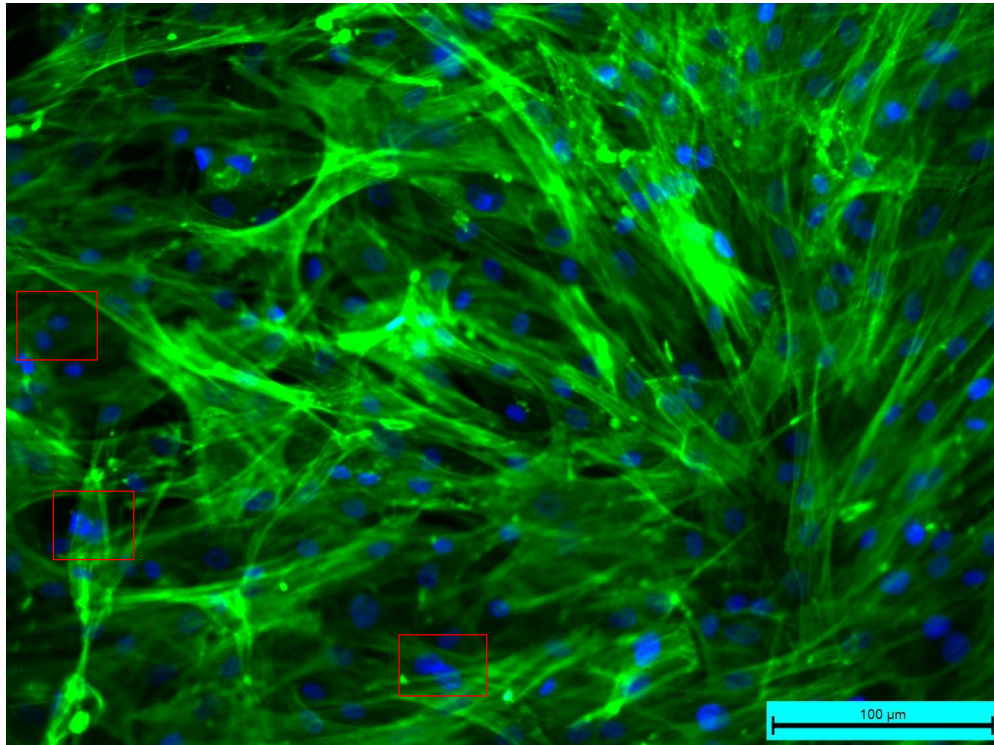


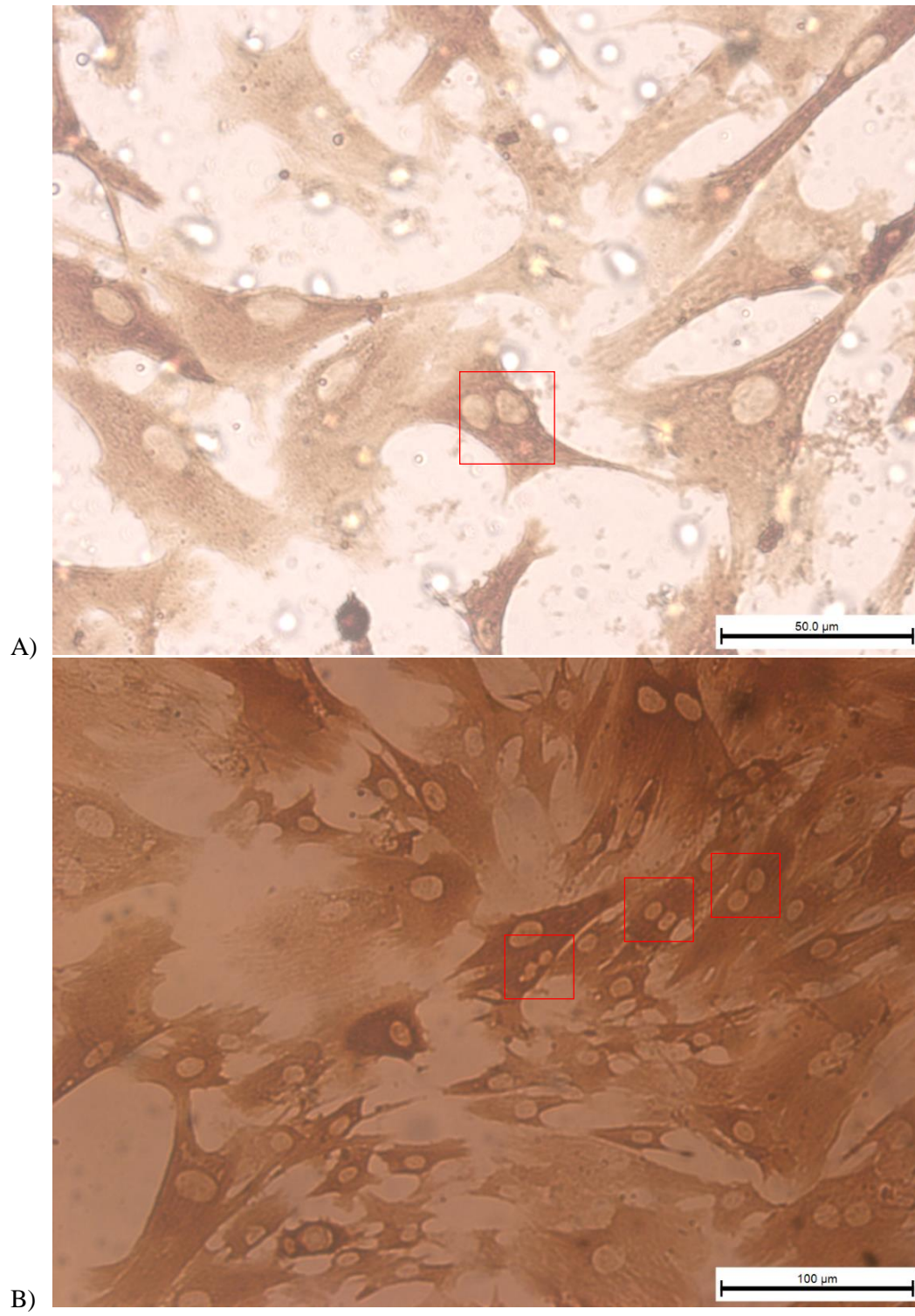
Figura 3.22. Marcaje de filamentos de actina y núcleos de ADSCs tratadas con 5-Azacitidina. Donde se observan posibles células binucleadas, señaladas en el recuadro rojo (A y B). Escalas: 100  $\mu\text{m}$ .



*Figura 3.23. Marcaje de filamentos de actina y núcleos de ADSCs tratadas con 5-Azacitidina. Donde se observan posibles células binucleadas. Recuadro rojo. Escala: 100 μm.*

### 3.6.2 ADSCs en Co-Cultivo indirecto

En las células mantenidas en condiciones de co-cultivo indirecto y analizadas por inmunohistoquímica se observaron casos aislados de células binucleadas, **Figura 3.24** y **3.25**.



*Figura 3.24. ADSCs en Co-Cultivo indirecto: Donde se aprecian posibles células binucleadas (A y B), recuadros rojos. Escalas: 50 µm y 100 µm, respectivamente.*

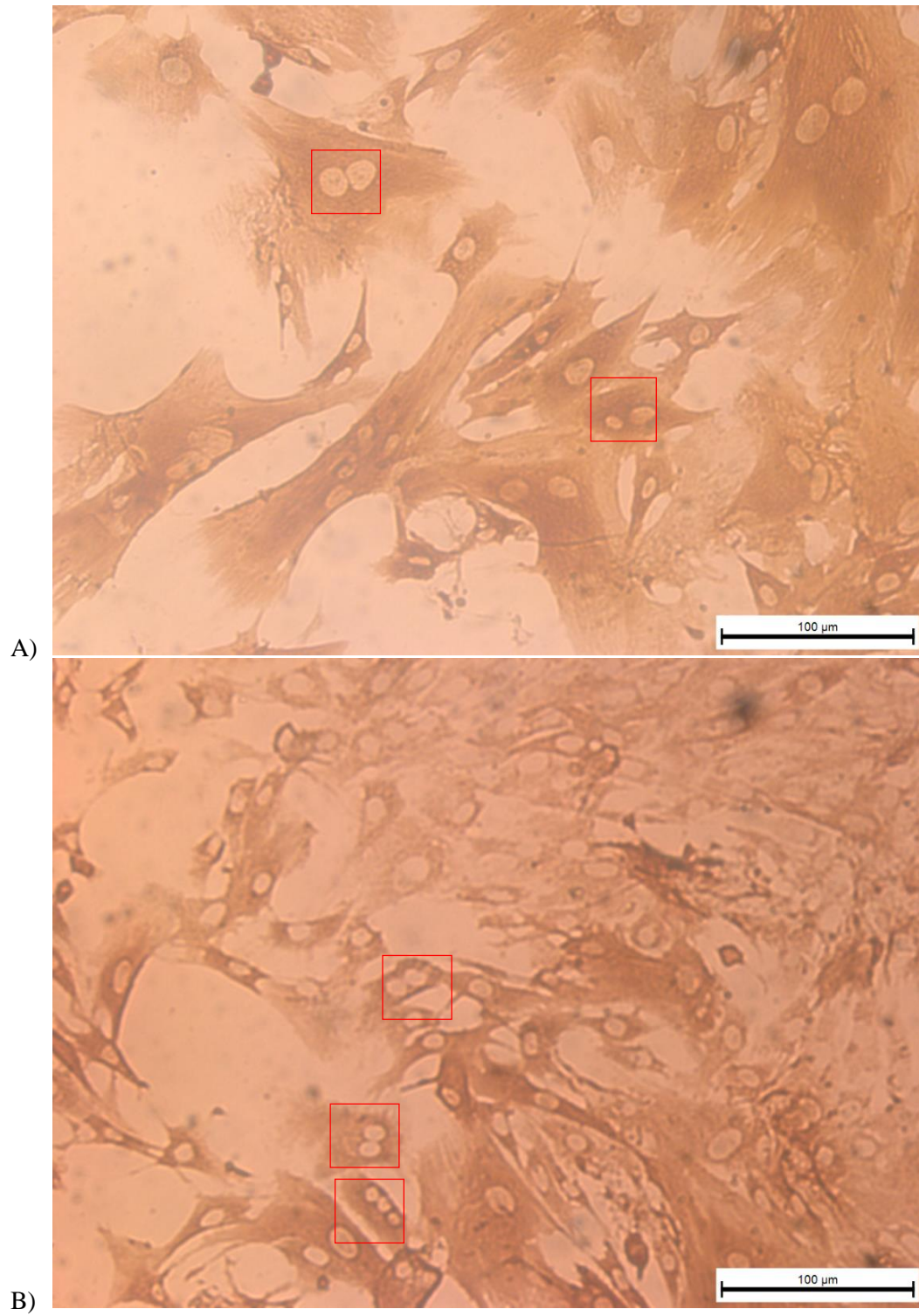


Figura 3.25. ADSCs en Co-Cultivo indirecto: Donde se aprecian posibles células binucleadas (A y B), recuadros rojos. Escalas: 100 µm.

Por los resultados de tinción mediante inmunocitoquímica, inmunofluorescencia, citometría de flujo y el crecimiento moderado de su población, se podría considerar al tratamiento de Co-Cultivo indirecto como una alternativa para la inducción inicial de ADSCs a musculares cardíacas con características similares al tejido cardíaco nativo.

Dado que no se logró registrar una actividad contráctil a lo largo de las siguientes tres semanas al término del tratamiento, podemos considerar a la expresión de los 5 marcadores evaluados como señales de una etapa inicial de diferenciación la cual fue favorecida por el tratamiento de Co-Cultivo indirecto, y resultó ser mejor que aquella observada en las ADSCs tratadas con 5-Azacidina.



## 4. Conclusiones

- Ambos tratamientos de diferenciación de ADSCs en células musculares cardíacas, el de 5-Azacitidina y el Co-Cultivo indirecto, demostraron inducir una diferencia en la expresión de proteínas en comparación con las ADSCs del grupo control sin tratamiento. Tanto en la expresión de proteínas musculares,  $\alpha$ -actina, miosina y desmina; como cardíacas, troponina T y conexina 43.
- El método de Co-Cultivo indirecto demostró ser una alternativa viable para la obtención de células musculares cardíacas a partir de células madre derivadas de tejido adiposo (ADSC), en comparación con la inducción a través del agente desmetilante de ADN 5-Azacitidina en el modelo de conejo. La técnica de Co-Cultivo indirecto se considera mejor para la diferenciación porque favorece la expresión de marcadores musculares y cardíacos (Actina, Miosina de cadena pesada, Desmina, Troponina cardíaca T y Conexina 43); así como también porque este tratamiento indujo el mayor porcentaje de expresión de Conexina 43 en ADSCs.
- Se pudieron establecer las condiciones mínimas de cultivo celular para inducir la expresión de dos marcadores cardíacos (Troponina cardíaca T y Conexina 43) sobre una población de ADSCs. Estas condiciones pueden llevarnos a establecer una fuente constante y segura para la obtención de células de tipo cardiomiocito, disponibles para constituir tejido cardíaco autólogo.
- Aun cuando faltan algunas pruebas, el método de Co-Cultivo indirecto al parecer no generó fragmentación celular u otras anomalías celulares durante los periodos de observación reportados.

### Perspectivas.

- Realizar la medición por citometría de flujo para el marcador de Troponina cardíaca T en todos los grupos.
- Realizar pruebas para determinar si las ADSCs tratadas con 5-Azacitidina no está activando algún proto-oncogén, debido a su tasa de crecimiento acelerado.
- Llevar a cabo la detección de anomalías cromosómicas entre ADSCs, ADSCs tratadas con 5-Azacitidina y ADSCs en Co-Cultivo indirecto: mediante cariotipo.
- Verificar que no haya presencia de material genético entre células de diferentes individuos. A pesar de que no es un cultivo donde haya contacto célula donante-célula receptor, es importante descartar la transferencia de material genético del cultivo primario de cardiomiocitos a las células ADSCs en generación. Así como monitorear la transmisión de agentes patógenos entre las muestras, para ello se debe restringir la elección de sujetos experimentales certificadamente sanos. Esta verificación se puede llevar a cabo mediante PCR.
- Llevar a cabo ensayos utilizando ADSCs humanas en Co-Cultivo indirecto con medio condicionante de cultivo primario de cardiomiocitos de conejo.
- Realizar pruebas de estimulación eléctrica, para determinar si las células transformadas presentan capacidad contráctil.

- Una vez diferenciadas, se diseñará un modelo *in vivo* para evaluar el comportamiento de las células transformadas implantadas en un tejido cardíaco.

# *Bibliografía*

- [1] Tissue-engineered autologous urethras for patients who need reconstruction: an observational study. Raya-Rivera A, Esquiliano DR, Yoo JJ, Lopez-Bayqhen E, Soker S, Atala A. *Lancet*. 2011 Vol. 2;377(9772). Pp.1175-82. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62354-9.
- [2] Regenerative Bladder Augmentation Using Autologous Tissues When Will We Get There? Atala A. *The Journal of Urology*. 2014 Vol. 191, Issue 5, Pp. 1204-1205. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.juro.2014.02.086>
- [3] Transplantation of tissue-engineered cell sheets for structure prevention after endoscopic submucosal dissection of the oesophagus. Jonas E, Sjöqvist S, Elbe P, Kanai N, Enger J, Haas S, Mohkles-Barakat A, Okano T, Takagi R, Ohki T, Yamamoto M, Kondo M, Markland K, Ling M, Yamamoto M, Nilsson M, Perment J, Blomberg P, Löhr JM. *United European Gastroenterology Journal*. 2016. Vol 0(0). Pp. 1-13.
- [4] Recent progresses in plastic surgery using adiposederived stem cells, biomaterials and growth factors. Zarei F & Negahdari B. *Journal of Microencapsulation*. 2017. DOI: 10.1080/02652048.2017.1370027
- [5] <http://www.transplant-observatory.org/>
- [6] [http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante\\_estadisticas.html](http://www.cenatra.salud.gob.mx/interior/trasplante_estadisticas.html) Centro Nacional de Trasplantes, 2017.
- [7] Joffre et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory lymphocytes. *Nature Medicine* 14, 88-92 (2008).
- [8] Picascia et al. Current concepts in histocompatibility during heart transplant. *Experimental and Clinical Transplantation: Official Journal of the Middle East Society for Organ Transplantation*. 2012, 10(3):209-218.
- [9] Lehner et al. Need for optimized immunosuppression in elderly kidney transplant recipients. *Transplantation Reviews* (2015). DOI: 10.1016/j.trre.2015.08.001
- [10] Personett et al. Review of Infectious Disease Prophylaxis in Solid Organ Transplantation. *Critical care nursing quarterly*, Vol. 40, No. 4 (2017), pp. 383-398.
- [11] Martiu et al. Acute rejection and humoral sensibilization in lung transplant recipients. *Proceedings of the American Thoracic Society*, Vol. 6, No. 1 (2009), pp. 54-65.
- [12] South et al. Persistent C4d and antibody-mediated rejection in pediatric renal transplant patients. *Pediatric transplantation* (2017), e13035. DOI: 10.1111/petr.13035
- [13] Ryan et al. Airway plaque presenting after alteration of immunosuppression in a pediatric patient remote from heart transplantation, *Pediatric Transplantation* (2017), e13046. DOI: 10.1111/petr.13046
- [14] Rajan et al. Structural, electrical, and optical studies of plasma-polymerized and iodine-doped poly pyrrole, *Journal of Applied Polymer Science* (2001). DOI: **10.1002/app.2312**

- [15] Kirschnin et al. Chemical functionalization of polysaccharides –towards biocompatible hydrogels for biomedical applications, *Chem. Eur.* (2017), J. 10.1002/chem.201701906
- [16] Solid organ fabrication: comparison of decellularization to 3D bioprinting. Jung J, Bhuiyan D, Ogle B. *Biomaterials Research*. 2016. DOI 10.1186/s40824-016-0074-2
- [17] Reardon. New life for pig-to-human transplants. *Nature* 527, 152–154 (12 November 2015)
- [18] Puga Young et al. Xenotransplantation: where do we stand in 2016? Review Article: Biomedical Intelligence. *Swiss Medical Weeckly*. 2017;147:w14403.
- [19] Preparation of Decellularized Liver Scaffolds and Recellularized Liver Grafts. Chen Y, Geerts S, Jaramillo M, Uygun B. *Methods in Molecular Biology*. 2017. DOI 10.1007/7651\_2017\_56
- [20] Repopulation of porcine kidney scaffold using porcine primary renal cells. Abolbashari M, Agcaoili S, Lee M, Ko I, Aboushwareb T, Jackson J, Yoo J, Atala A. *Acta Biomaterialia*. 2015. Pp. 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.026>
- [21] Transplantation of bioengineered rat lungs recellularized with endothelial and adipose-derived stromal cells. Doi R, Tsuchiya T, Mitsutake N, Nishimura S, Matsuu-Matsuyama M, Nakazawa Y, Ogi T, Akita S, Yukawa H, Baba Y, Yamasaki N, Matsumoto K, Miyazaki T, Kamohara R, Hatachi G, Sengyoku H, Watanabe H, Obata T, Niklason E, Nagayasu T. *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7: 8447. DOI:10.1038/s41598-017-09115-2
- [22] Decellularization of Liver and Organogenesis in Rats. Shirakigawa N, Ijima H. *Methods in Molecular Biology*. 2017. DOI 10.1007/7651\_2017\_63
- [23] Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. Ott H, Matthiesen T, Goh S, Black L, Kren S, Netoff T, Taylor D. *Nature Medicine*. 2008. Vol. 14. No. 2. Pp. 213-221. doi:10.1038/nm1684
- [24] Bioengineering Hearts: Simple yet Complex. Taylor D, Parikh R, Sampaio L. *Current Stem Cell Rep*. 2017. Vol 3. Pp. 35-44. DOI 10.1007/s40778-017-0075-7
- [25] Gyongyosi M, Wojakowski W, Lemarchand P, Lunde K, Tendera M, Bartunek J. Meta-Analysis of Cell-based Cardiac studies (ACCRUE) in patients with acute myocardial infarction based on individual patient data. *Circulation Research*. 2015. Vol.116(8). Pp. 1346–60. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.304346.
- [26] Application of Adipose-Derived Stem Cells in Heart Disease. Chen L, Qin F, Shu Q, Xu J. *Journal of Cardiovascular Transplantation Research*. 2014. doi:10.1007/s12265-014-9585-1
- [27] Weymann A, Patil NP, Sabashnikov A, Jungebluth P, Korkmaz S, Li Setal. Bioartificial heart: a human-sized porcine model—the way ahead. (1932–6203 (Electronic)). doi:D - NLM: PMC4218780 EDAT- 2014/11/05 06:00 MHDA- 2015/08/19 06:00 CRDT2014/11/0406:00PHST-2014 [ecollection]PHST-2014/09/04[received] PHST- 2014/09/28 [accepted] PHST- 2014/11/03 [epublish] AID - 10.1371/journal.pone.0111591 [doi] AID PONE-D-14-39790 [pii] PST- epubliish.
- [28] Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix. Guyette J, Charest J, Jank B, Moser P, Gilpin S, Gershlak J, Okamoto T, Gonzalez G, Milan D, Gaudette G, Ott H. *Cirulation Research*. 2015. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306874

- [29] Mollova M, Bersellk Fau-Walsh S, Walshs Fau-Savla J, Savlaj Fau - Das LT, Das Lt Fau - Park S-Y, Park Sy Fau - Silberstein. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. (1091–6490 (Electronic)). doi:D - NLM: PMC3557060 EDAT- 2013/01/11 06:00 MHDA-2013/03/22 06: 00 CRDT- 2013/01/11 06:00 AID - 1214608110 [pii] AID 10.1073/pnas.1214608110[doi]PST-publish.
- [30] Meruane *et al.* Células Troncales Derivadas de Tejido Adiposo, International Journal of Morphology (2010), Vol. 28(3): 879-889.
- [31] Derubeis *et al.* Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) in Bone Engineering: Limitations and Recent Advances, Annals of Biomedical Engineering (2004), Vol. 32, No. 1
- [32] Gun-Il *et al.* Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal cells: their comparative efficacies and synergistic effects. Dongguk University Ilsan Hospital (2017), DOI: 10.1002/jbm.a.36089
- [33] Gimble *et al.* Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine, Circulation Research: Pathobiology of Obesity (2007), DOI: 10.1161/01.RES.0000265074.83288.09
- [34] Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. Fraser J, Schreiber R, Strem B, Zhu M, Alfonso Z, Wulur I, Hedrik H. Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine. 2006. Vol 3, Sup. 1. Pp. S33-S37.
- [35] Patterson *et al.* Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration, Nature Genetics (2017), doi:10.1038/ng.3929.
- [36] Woodcock *et al.* Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies, The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 37(2005):1746-1741.
- [37] Al-Hadi *et al.* Cardiac Markers in the Early Diagnosis and Management of Patients with Acute Coronary Syndrome, SQU Medical Journal (2009), Vol. 9, Issue 3., pp. 231-246.
- [38] Szaraz *et al.* *In Vitro* Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Functional Cardiomyocyte-like Cells, Journal of Visualized Experiments (2017), e55757, doi:10.3791/55757 (2017).
- [39] Transformation of Adult Mesenchymal Stem Cells Isolated from the Fatty Tissue Into Cardiomyocytes. Rangappa S, Fen C, Lee E, Bongso A, Wei E. Ann Thorac Surg. 2003. Vol. 75. Pp. 775-779.
- [40] Spontaneous Cardiomyocyte Differentiation From Adipose Tissue Stroma Cells. Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Perez A, García J, Pénicaud L, Casteilla L. Circulation Research. 2004. Vol. 94. Pp. 223-229. DOI: 10.1161/01.RES.0000109792.43271.47
- [41] VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. Song Y, Gehmert S, Sadat S, Pinkernell K, Bai X, Matthias N, Alt E. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2007. Vol. 354. Pp. 99-1003. doi:10.1016/j.bbrc.2007.01.095
- [42] Icariin-mediated differentiation of mouse adipose-derived stem cells into cardiomyocytes. Jin M, Shi S, Zhang Y, Yan Y, Sun X, Liu W, Liu H. Mol Cell Biochem. 2010. Vol. 344. Pp. 1-9. DOI 10.1007/s11010-010-0523-5

[43] Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. Choi Y, Disting G, Stubbs S, Arunothayaraj S, Han X, Collas P, Morrison W, Dille R. *J. Cell. Mol. Med.* 2010. Vol. 14, No. 4. Pp. 878-889.

[44] Zhu et al. ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment. *Mol Cell Biochem* 2009 324: 117-129. DOI 10.1007/s11010-008-9990-3

[45] Gobergs et al. Hypoplastic left heart syndrome: a review. *Acta Med Litu.* 2016; 23(2): 86–98. doi: [10.6001/actamedica.v23i2.3325](https://doi.org/10.6001/actamedica.v23i2.3325)

[46] Sitta Sittampalam et al. *Assay Guidance Manual* 2017. Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

[47] Hoydal et al. Human cardiomyocyte calcium handling and transverse tubules in mid-stage of post-myocardial-infarction heart failure. *Esc Heart Failure.* 2018: 1-11. DOI: 10.1002/ehf2.12271

[48] Jastrzebski et al. Atrioventricular block with 4:2 conduction pattern: what is the mechanism? *Journal of Electrocardiology.* 2009; 42: 684-686. doi:10.1016/j.jelectrocard.2009.06.001

# Anexo

## Ensayo MTT

*Protocolo para ensayo de viabilidad celular:*

Materiales:

- Cajas de cultivo de 12 pozos
- PBS 1X caliente
- Sales de MTT [Invitrogen, Cat. M6494]
- DMSO [Sigma, Cat. D5879-1L]

Procedimiento:

1. Una vez sembradas y adheridas las células en las cajas de 12 pozos: 50,000 células/pozo. Se cambia de medio la caja, agregando los microlitros necesarios de sales de MTT para tener 1 ml de medio (1 mg/ml).
2. Se incuba la caja 4 h, a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>.
3. Se retira el medio, se debe observar un precipitado azul al interior de las células.
4. Se lava con PBS 1X cada pozo.
5. Se disuelven los cristales de sales de formazán utilizando 200-300 µl de DMSO.
6. Se toman alícuotas de 50 µl por cada pozo, para hacer la lectura de densidad óptica con un lector de placas, en cajas de 96 pocillos.

## Inmunocitoquímica e inmunofluorescencia

*Protocolo para tinción inmunocitoquímica:*

Materiales:

- Laminilla Lab-Tek de 8 pozos
- PBS 1X caliente y frío
- Disolución etanol-acetona 1:1, volumen, fría
- Kit inmunocitoquímica DAKO [Cat. K4007]
- Disolución A: Tritrón 100X [Bio-Rad, Cat. 1610407] al 0.1 % con PBS 1X pH 7.2
- Anticuerpos primarios anti-ratón

Procedimiento:

1. Se siembra el cultivo celular previamente en la laminilla Lab-Tek, 40-50 mil células por pozo. Confirmar visualmente la adherencia de las células en la laminilla.
2. Retirar el medio de cultivo de la laminilla, lavar con PBS 1X caliente. Retirar.
3. Fijar con etanol-acetona frío, por 5 minutos. Retirar.
4. Lavar con PBS 1X frío. Retirar.
5. Añadir dos gotas de peroxidasa block por pozo, por 10 minutos.
6. Lavar dos veces con Disolución A, eliminando exceso de líquido.

7. Agregar anticuerpo primario o control negativo, cubriendo la monocapa en su totalidad (utilizar la concentración inicial sugerida por el fabricante, 60 µl por pozo).
8. Incubar 30 minutos a 37 °C.
9. Lavar con disolución A, eliminando exceso de líquido.
10. Aplicar suficiente Labelled polymer-HRP anti-mouse, cubriendo la monocapa.
11. Incubar por 30 minutos a 37 °C.
12. Lavar con Disolución A.
13. Agregar DAB+ Sustrato, cubriendo la monocapa (1 ml buffer con DAB+1 gota DAB-cromógeno; preparado al momento de utilizarse, manteniéndose resguardado de la luz). Incubar por 5-10 minutos a temperatura ambiente.
14. Lavar con agua destilada, eliminando exceso de líquido.
15. Añadir suficiente hematoxilina para cubrir monocapa y de sobra, por 1 minuto.
16. Lavar con agua destilada.
17. Agregar agua amoniaca al 0.037 mol/l, por 2 segundos.
18. Lavar con agua destilada por 2-5 minutos.
19. Deshidratar con preparaciones de alcohol en diferentes porcentajes, 5 minutos con cada lavado: 50, 70, 80 y 90 %; luego con Etanol absoluto.
20. Retirar la separación plástica de la laminilla.
21. Montar permanentemente la placa con resina y xilol, con cubreobjetos.
22. Revisar al microscopio.

*Protocolo para tinción por Inmunofluorescencia (con tinción de cadenas de actina):*

**Materiales:**

- Disolución F: Formaldehído al 4% en PBS 1X pH 7.2
- Oregon Green [Invitrogen, Cat. 07466]
- Disolución A: Albúmina al 1% en PBS 1X pH 7.2
- Disolución T: Tritrón 100X al 0.1 % con PBS 1X pH 7.2
- DAPI [Molecular Probes, Cat. S36939]
- PBS 1X caliente y frío

**Procedimiento:**

1. Lavar el medio de la laminilla Lab-Tek sembrada (40-50 mil células por pozo, adheridas) con PBS 1X.
2. Agregar 200 µl de PBS 1X frío + 200 µl de disolución F, por dos minutos. Retirar.
3. Agregar 400 µl de disolución F, por 15 minutos. Retirar.
4. Agregar 200 µl de disolución T, por 30 minutos. Retirar.
5. Lavar con PBS 1X dos veces, retirando exceso de líquido.
6. Agregar solución A, por 30 minutos. Retirar.
7. Agregar anticuerpo con fluorocromo acoplado (diluido en albúmina; 200 µl de albúmina por pozo, más el anticuerpo), incubar por el periodo y concentración recomendados por fabricante. Incubación a temperatura ambiente. Retirar.
8. Lavar con PBS 1X tres veces.
9. Agregar fabidina (diluida en PBS 1X; 200 µl de PBS 1X por pozo, más la fabidina), 1:100; la fabidina se centrifuga antes de utilizarse y se toman los microlitros superficiales. Incubar a temperatura ambiente por 1 h.
10. Lavar con PBS 1X tres veces.



11. Desmontar la placa divisoria de la laminilla, agregar 1 gota de DAPI por pozo.
12. Colocar cubreobjetos cuidando que no se formen burbujas. Sellar la laminilla y cubreobjetos con barniz transparente.
13. Observar al microscopio. La laminilla se conserva a 4 °C, envuelta en papel aluminio para preservar los fluorocromos por más tiempo.

### **Citometría de flujo**

#### *Protocolo para citometría de flujo:*

##### Materiales:

- FACS Flow: Un buffer salino (con azida sódica) altamente purificado. [Invitrogen; Cat. PB001]
- Anticuerpos (preferentemente acoplados a fluoróforo, o primario y secundario acoplado a fluoróforo).

#### *Procedimiento:*

1. Se requieren al menos  $1 \times 10^6$  células por tubo.
2. Lavar el medio de cultivo de la muestra por centrifugación a 2 mil rpm durante 5 minutos; utilizando FACS Flow. Se decanta entre cada lavado.
3. Agregar el anticuerpo(s) a cada tubo con células junto con 200  $\mu$ l de FACS Flow. Se da vortex para homogenizar la muestra y se incuba a temperatura ambiente o en frío, resguardando de la luz los tubos de muestra (sobre todo si es un anticuerpo directo o el secundario con el fluorocromo acoplado). Incubar por 1 h. Si se trata de un anticuerpo primario, una vez terminado el periodo de incubación, se lava la muestra 3 veces con FACS Flow y se agrega el anticuerpo secundario junto con otros 200  $\mu$ l de buffer salino. Se incuba por una segunda hora. NOTA: La cantidad de anticuerpo requerido por tubo depende del número de células a teñir, generalmente, las hojas de datos del proveedor del anticuerpo recomiendan una concentración inicial para la prueba.
4. Terminado el periodo de incubación, lavar 3 veces con 2 ml de FACS Flow para eliminar anticuerpo no adherido. Decantar en su totalidad el buffer entre cada lavado.
5. Agregar 200  $\mu$ l de FACS Flow para la medición.

NOTA: Tener cuidado con muestras donde se quieran probar más de dos anticuerpos, los anticuerpos deben tener fluorocromos que emitan en diferentes longitudes de onda, para poder diferenciar ambas señales.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00115

Matrícula: 215380492

DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (ADSC) EN CARDIOMIOCITOS A PARTIR DE CO-CULTIVO INDIRECTO: PROLIFERACIÓN CELULAR Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS CARDÍACAS.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 10:00 horas del día 6 del mes de abril del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ  
DR. ALEJANDRO MARTINEZ HERRERA  
DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ



*Teresa Gomez Quintero*

TERESA GOMEZ QUINTERO  
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS (INGENIERIA BIOMEDICA)

DE: TERESA GOMEZ QUINTERO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*APROBADO*

REVISÓ

*[Signature]*  
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBI

*[Signature]*  
DR. JOSE GILBERTO CORDOBA HERRERA

PRESIDENTE

*[Signature]*  
DR. ROBERTO OLAYO GONZALEZ

VOCAL

*[Signature]*  
DR. ALEJANDRO MARTINEZ HERRERA

SECRETARIO

*[Signature]*  
DR. JOSE RAFAEL GODINEZ FERNANDEZ