

**Universidad de Valparaíso**

**Carrera de Tecnología Médica**

**Casa Central**

**Mención Morfofisiopatología y citodiagnóstico.**

**“Análisis citológico comparativo del efecto de scaffold microestructurado v/s sin microestructura a distintas concentraciones de células de la línea celular mioblástica C2C12”**

**Seminario de Grado presentado en conformidad a los requisitos para obtener el Grado Académico de “Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico”**

**Autor:**

Dragica Bezjak Carrasco

**Profesor guía:**

Donald Irving Brown González

**Profesor Co-guía:**

Cristian Andrés Acevedo Gutiérrez

2018

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer al profesor Donald Brown por recibirme en su laboratorio, por la buena disposición que siempre ha tenido para enseñar, guiar y corregir, y por el trato tan humano que tiene con sus alumnos, siempre recibiendo a todos con una sonrisa amable.

Al profesor Cristian Acevedo por darme la oportunidad de ser parte de su proyecto FONDECYT 1160311, una gran experiencia de aprendizaje y acercamiento más próximo al mundo de la investigación.

A Karina Pino, por enseñarme el manejo de laboratorio y ayudarme en todo este proceso con sus conocimientos y buena disposición para siempre responder y apoyar en lo que pueda.

Se agradece el financiamiento del Proyecto FONDECYT 1160311.

Finalmente agradecer a mi familia, en especial a mi mamá, sin la cual no hubiese tenido la oportunidad de estudiar esta hermosa carrera, a mis amigos, que me han apoyado durante todo este proceso y a Felipe, por estar en los momentos buenos y difíciles, siempre alentándome y alegrándome con una sonrisa, dándome el ánimo e impulso para seguir adelante.

## **Resumen**

La ingeniería de tejidos es una ciencia que ha estado en expansión desde sus inicios, siendo principalmente utilizada en el área clínica para tratamientos de regeneración de tejidos, pero que actualmente está teniendo aportes en el área de alimentación. Es en este contexto en el que la ingeniería de tejidos puede ser una opción para la generación de carne *in-vitro*, con células de músculo esquelético, lo que tendría un gran impacto en el medio ambiente, siendo una posible respuesta a los problemas que causa la industria ganadera, como la contaminación en sus procesos, deforestación y maltrato animal. Este proyecto está enfocado en la generación de carne *in-vitro*, utilizando scaffolds de materiales no derivados de mamíferos, sembrados con células de la línea celular C2C12, correspondiente a mioblastos. Se utilizó un scaffold microestructurado de superficie acanalada, lo que debería ayudar a las células en su proceso de colonización y diferenciación y se utilizaron dos distintas concentraciones celulares. Para evaluar la efectividad de este scaffold microestructurado y la óptima concentración celular, se utilizó procesamiento histológico de rutina, técnica de tinción histoquímica Tricrómico de Arteta para describir la morfología celular e inmunohistoquímica para identificar distintos estados celulares con marcadores de proliferación, diferenciación y muerte celular, además de un conteo celular y medición del perímetro de grupos celulares. Los resultados obtenidos mostraron similar morfología celular en todas las situaciones y en cuanto a los estados celulares, los resultados de conteo e inmunohistoquímica no fueron concluyentes en todas las situaciones, pero sí demostraron que la mayor cantidad de células en diferenciación y la menor cantidad de células con muerte celular se dio en el scaffold sin microestructura con un millón de células, por lo cual este sería el más adecuado para las células. Esta tesis está inserta en el marco del Proyecto FONDECYT 1160311.

## **Palabras clave**

Ingeniería tisular, scaffold, diferenciación muscular, línea celular C2C12, inmunohistoquímica.

## **Listado de Abreviaciones**

**MRF:** Factores reguladores miogénicos

**IHQ:** Inmunohistoquímica

**ABC:** Complejo Avidina- Biotina

**PCNA:** Antígeno nuclear de proliferación celular

**BrdU:** Bromodesoxiuridina

**S/M.E:** Sin Microestructura

**C/M.E:** Con Microestructura

## Índice

Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1. Scaffold.....	1
1.2. Músculo.....	4
1.3. Línea celular... ..	6
1.4. Inmunohistoquímica .....	8
Capítulo 2: Objetivos.....	11
2.1. Objetivo General.....	11
2.2. Objetivos Específicos .....	11
Capítulo 3: Materiales y métodos.....	12
3.1. Elaboración de Scaffolds .....	12
3.2. Cultivo de células C2C12 .....	13
3.3. Procesamiento, inclusión, corte y adhesión .....	14
3.4. Tricrómico de Arteta.....	14
3.5. Descripción celular, conteo y medición.....	15
3.6 Inmunohistoquímica y H-Score.....	16
3.7. Análisis estadístico .....	17
Capítulo 4: Resultados.....	18
4.1. Descripción de la morfología celular.....	18
4.1.1. Células viables y no viables.....	19
4.1.2. Grupos redondos y parche .....	20
4.2. Identificación de células en los distintos estados .....	23
4.2.1. Proliferación .....	24
4.2.2. Diferenciación.....	30
4.2.3. Muerte celular .....	34
Capítulo 5: Discusión.....	38

5.1.Descripción de la morfología celular.....	38
5.2. Identificación de células en los distintos estados .....	40
5.2.1. Proliferación.....	40
5.2.2. Diferenciación.....	41
5.2.3. Muerte celular.....	42
Capítulo 6: Conclusión.....	44
Capítulo 7: Bibliografía.....	46
Anexos.....	49
Protocolo PCNA .....	49
Protocolo BrdU.....	51
Protocolo Miogenina y Desmina .....	54
Protocolo Caspasa 3.....	56

## Capítulo 1: Introducción

La ingeniería tisular surgió a comienzos de la década de los 90, principalmente para mejorar las limitaciones de los injertos y reparación de tejidos, utilizando un material biodegradable y poroso denominado scaffold, el cual aloja células con la capacidad de proliferar y diferenciarse, como matriz biopolimérica que aporte a la generación de tejidos (1). La ingeniería de tejidos no tiene solamente aplicaciones clínicas, sino que también se está desarrollando dentro del área de alimentación, por ejemplo, con la idea de producir carne *in-vitro*, utilizando células de músculo esquelético. En el área de la alimentación, la cual es el fin de este experimento, la producción de carne *in vitro* a partir de la generación de tejido muscular aun es una idea que está desarrollándose. Esta idea ayudaría a mejorar los problemas ambientales relacionados con la ganadería, la transmisión de enfermedades contagiosas de animales y el sufrimiento animal (2).

En esta investigación se utilizó para la producción de tejido muscular un scaffold fabricado con biomateriales no derivados de mamíferos, en la idea de generar carne *in vitro*, dejando de usar biomateriales derivados de animales para su producción, contribuyendo así al medio ambiente y el bienestar animal. Además, se utilizaron dos distintos tipos de microestructura de scaffold para ver el efecto de la microestructura en el desarrollo de las células, como también dos concentraciones celulares para evaluar la óptima concentración de sembrado. Para poder evaluar el efecto de la microestructura del scaffold y la concentración celular, se describieron la morfología celular y se identificaron los distintos estados de las células, a través de observación microscópica y técnica inmunohistoquímica.

### 1.1. Scaffold

La ingeniería de tejidos tiene tres bases fundamentales: 1) Scaffolds, que proveen estructura para el crecimiento celular; 2) Células, que generarán el tejido deseado; y 3) Moléculas bioactivas, encargadas de la señalización celular, que tendrá efecto sobre el desarrollo y fenotipo de las células. Los scaffolds proveen el sustrato para que las células

puedan crecer y desarrollarse, además al ser cubiertos con moléculas bioactivas, que inducen crecimiento, diferenciación y actividad metabólica en las células, el scaffold actúa como un sistema de administración de estas moléculas (3). Es la interacción de estos tres elementos lo que permite el desarrollo de tejidos.

Los scaffolds significan proporcionar una matriz de cultivo celular en tres dimensiones para generar un tejido. Por el contrario, el tradicional cultivo en dos dimensiones tiene sus limitaciones, ya que no imita o permite las condiciones que ocurren *in vivo*, afectando la morfología y fisiología de células, en cambio. Los cultivos tridimensionales imitan de mejor manera las condiciones del tejido, lo que se traduce en una mejor complejidad estructural, homeostasis y similitud con tejidos y órganos (4)

Los scaffolds son una herramienta ampliamente utilizada en la ingeniería tisular, que dan soporte y estructura a las células, simulando algunas propiedades de la matriz extracelular. Principalmente se utilizan scaffolds en dos situaciones: para dirigir el crecimiento de células que migran de tejidos cercanos, o para permitir el crecimiento de células sembradas en estas estructuras porosas, debiendo facilitar la adhesión, migración, desarrollo, proliferación y diferenciación celular (3). Para ser adecuados en su uso en ingeniería tisular, los scaffolds deben tener características especiales en su microestructura, como por ejemplo alta porosidad y área de superficie, resistencia estructural y formas tridimensionales específicas. Así, el scaffold debiera imitar la estructura y propiedades de un tejido humano, dirigiendo mejor el crecimiento y diferenciación de las células. Además, en muchos casos deben ser fabricados con materiales biodegradables, debido a que el rol de estos scaffolds es temporal (5).

Los materiales más usados en la construcción de scaffolds son los biopolímeros, los cuales poseen características como flexibilidad de diseño, ser biodegradables y se pueden adaptar a necesidades que se requieran. Los biopolímeros más utilizados comúnmente son el colágeno, quitosano, poliglicólicos, polilácticos, policaprolactonas, entre otros. Para el desarrollo de los scaffolds se utilizan normalmente biomateriales compuestos, que permite potenciar las propiedades de los materiales a utilizar, para esto es esencial que los materiales sean biocompatibles (6).

Para el scaffold de este experimento se utilizaron biomateriales no derivados de mamíferos: gelatina de pez, alginato, agarosa y sorbitol. La gelatina se obtiene de la hidrólisis parcial del colágeno, proveniente de huesos, tendones y piel, y se utiliza por ser fácil de procesar, ser biocompatible y poseer la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD), lo que proporciona muchos sitios de unión que permiten la adhesión celular y diferenciación; sin embargo, presenta rápida deformación y baja resistencia a tracción, por lo que suele utilizarse en combinación con otros biopolímeros. El alginato es un polímero lineal derivado de algas, es biodegradable, biocompatible, hidrofílico y no tóxico, se ha utilizado principalmente en scaffolds para regeneración de cartílago, hígado y miocardio (6). La agarosa es un polisacárido extraído de algas, el cual al ser disuelto en agua forma un gel con una red rígida y tridimensional, plástica y porosa, y ha demostrado ser altamente biocompatible (7). Sorbitol es un polialcohol biocompatible que se encuentra principalmente en algas rojas y frutas, se utiliza como un plastificante, para mejorar las propiedades físicas y mecánicas de algunos compuestos más frágiles (8).

Existen distintos tipos de scaffolds: fibrosos, porosos e hidrogeles. Los scaffolds fibrosos se desarrollan con biomateriales fibrilares tales como colágeno, elastina o laminina, donde el diámetro y la estructura de la fibra pueden afectar el comportamiento y la organización celular, pueden imitar una matriz extracelular originaria de algunos tejidos, ya que estas pueden estar compuestas de gran cantidad de proteínas fibrosas. Los scaffolds porosos aportan un área de superficie mayor, que permite mayor adhesión de las células, proliferación y diferenciación, además la interconectividad entre los poros permite la infiltración de células del tejido huésped y neovascularización, por lo que este tipo de scaffold ha sido ampliamente utilizado en el crecimiento celular para generar tejidos funcionales. Por último, los scaffolds de hidrogeles se fabrican mediante la formación de una red de polímeros que se unen de forma covalente, son fáciles de moldear y resistentes mecánicamente, y solo cumplen con la función de ser soportes celulares, ayudando en el crecimiento tridimensional de las células (6).

Para la fabricación de los scaffolds existen diversas técnicas, siendo la utilizada en este experimento la técnica de *Freeze-drying*, que es una de las más usadas. Este método consiste en bajar la temperatura de la solución de biopolímero que se utilizará hasta congelar

la solución, luego se procede a realizar un proceso de liofilización, en el cual se elimina el solvente de la solución por sublimación (paso de estado sólido a gaseoso sin pasar por líquido), para así obtener solo la parte sólida de la solución, la cual mantiene su estructura porosa (6).

## 1.2. Músculo

El tejido muscular corresponde a uno de los cuatro tejidos básicos que componen el organismo humano, forma parte del aparato locomotor, el cual junto con los huesos y articulaciones permite el movimiento y la interacción con el entorno. Las células musculares (también llamadas miocitos, miofibras o fibras musculares), tienen la capacidad de contraerse, lo que permite la locomoción del cuerpo, bombeo cardíaco, y movimientos de muchos órganos (9).

Las células musculares que forman parte de la musculatura esquelética forman un sincicio alargado y multinucleado, denominado miotubo, que se origina de la fusión de mioblastos procedentes del mesodermo durante la etapa embrionaria (5). Este miotubo mide entre 10 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro, pudiendo alcanzar varios centímetros de longitud (9). Para que los mioblastos puedan dar origen a estos tubos multinucleados, tienen que ocurrir dos eventos controlados por factores reguladores miogénicos (MRF): el primero es la pérdida de la capacidad de proliferación de la célula precursora (mioblasto), debido al aumento de factores reguladores miogénicos (Myf5 y MyoD) y la disminución del factor transcripcional Pax 7. El segundo evento es la diferenciación terminal de los mioblastos que ocurre por acción de otros factores reguladores miogénicos: Miogenina y MRF4 (10).

Los cuatro MRF, anteriormente mencionados, han sido ampliamente estudiados, y hoy se tiene un mayor entendimiento de su función gracias a los experimentos de diferenciación muscular en modelos de cultivo tisular. Estos factores tienen la capacidad de convertir en músculo muchos tipos celulares que no son musculares. Los factores MyoD y Myf5 son genéticamente redundantes, pero tienen funciones reguladoras distintas en la miogénesis; sin embargo, ambos se expresan en mioblastos desde la etapa de proliferación y

su expresión se mantiene estable hasta la etapa de diferenciación. Mientras que Miogenina y MRF4 se expresan en la etapa de diferenciación junto con MyoD y Myf5, son factores reguladores de transcripción para la activación de genes codificadores de proteínas musculares contráctiles (11).

Existen tres tipos de musculatura: esquelética, cardíaca y lisa. Todos estos tipos de músculos están formados por células alargadas, que comparten la capacidad de contracción, pero que a su vez varían en morfología, función y ubicación. El músculo esquelético y cardíaco son estriados porque presentan un patrón de bandas claras y oscuras que son producto de la disposición de las fibras de actina y miosina (responsables de la contracción muscular). En cambio, la musculatura lisa no presenta este patrón de bandas. Unas características en común que comparten el músculo cardíaco y liso es que ambos presentan un único núcleo central, a diferencia del músculo esquelético, que presenta varios núcleos en disposición periférica. Los músculos cardíaco y liso son de contracción involuntaria, pero el músculo esquelético tiene contracción voluntaria. El músculo esquelético se encuentra unido a los huesos y permite los movimientos voluntarios del cuerpo. El músculo cardíaco se encuentra exclusivamente en el corazón y sus movimientos permiten bombear la sangre para que llegue a todos los tejidos del organismo. El músculo liso se encuentra en distintas partes del cuerpo, como en las paredes de los vasos sanguíneos, tubo digestivo y vísceras, siendo su contracción involuntaria (10).

El músculo esquelético está rodeado por capas de tejido conectivo, que en sus extremos forman los tendones, que permiten la inserción de los músculos a los huesos. Cada una de las miofibras del músculo esquelético, están cubiertas por una capa de fibras reticulares y matriz extracelular, denominada endomisio. Las miofibras se agrupan en fascículos, los que a su vez son revestidos por el perimisio. Finalmente, los fascículos se agrupan para formar el músculo propiamente tal, que está revestido por el epimisio, que es una capa de tejido conectivo denso. Estas vainas de tejido conectivo que rodean las fibras musculares permiten que los capilares y nervios puedan alcanzar hasta el interior del músculo, así se garantiza que todas las células musculares estén irrigadas e inervadas (10).

Existe una población de células ubicadas bajo el endomisio que están en un estado mitóticamente quiescente (G0), estas células son denominadas células satélite. Las

células satélite participan en el proceso de regeneración muscular en caso de daño o injuria. Para que ocurra la regeneración muscular son necesarios tres procesos: debe haber una respuesta inflamatoria en el músculo; la activación, diferenciación y fusión de células satélite; y finalmente la maduración y remodelamiento de las nuevas miofibras formadas. Las células satélite en su estado quiescente expresan los factores Pax 7 y Myf5, pero no MyoD o Miogenina. Al ser activadas las células satélite por las señales de inflamación en el medio que las rodea, éstas salen de su estado quiescente y comienzan la etapa de proliferación. Para el proceso de regeneración las células satélite migran desde toda la miofibra hacia el lugar donde ocurrió la injuria (12).

Las células satélite en proliferación y su progenie reciben el nombre de células precursoras musculares o mioblastos adultos, los cuales expresan los factores MyoD y Myf5. Luego los mioblastos adultos comienzan la etapa inicial de diferenciación, por la disminución del factor Pax 7, mientras que la etapa terminal de diferenciación ocurre por el aumento de la expresión de Miogenina, que permite la fusión de los mioblastos adultos para formar los miotubos, finalizando con la activación de las proteínas contráctiles. Durante este proceso de regeneración las células satélite activadas tienen la capacidad para volver al estado quiescente y así mantener una población de células satélite que permita la integridad del músculo (12).

### **1.3. Línea celular**

La línea celular C2C12 corresponde a mioblastos de *Mus musculus* (ratón común), derivadas de células satélites y su comportamiento es de células progenitoras de linaje. Estas células son un subclon de mioblastos C2 y tiene la propiedad de diferenciarse rápidamente cuando se cambia su medio de cultivo, formando miotubos con propiedad contráctil y produciendo las proteínas musculares características de este tejido. Es por esto que se utiliza esta línea celular para estudiar el proceso de miogénesis y metabolismo de las células musculares (13)-(14).

Cuando estas células son cultivadas, aun sin diferenciación, presentan forma estrellada o fusiforme, midiendo entre 20-80  $\mu\text{m}$ , con un núcleo central y numerosos

nucléolos, y presentan filamentos de actina y miosina, distribuidos en el citoplasma y alrededor del núcleo, respectivamente. En una etapa intermedia de diferenciación las células comienzan a tomar una forma más alargada y ya aparece una distribución inicial de miofibrillas. Cuando las células ya alcanzaron una alta diferenciación se forman los miofibros, estructuras fusiformes alargadas, que miden entre 100-600  $\mu\text{m}$  de longitud y 30-50  $\mu\text{m}$  de grosor, con numerosos núcleos y que presentan sarcómeros y miofibrillas en su citoplasma (14).

El cultivo de células requiere un ambiente óptimo que depende de 3 factores: temperatura, mezcla de gases y humedad; todos estos controladas por el incubador de  $\text{CO}_2$ , equipo encargado de regular el ambiente del cultivo. La temperatura óptima de cultivo de la mayoría de las células derivadas de mamíferos es de  $36,5^\circ\text{C}$ , pudiendo tener una variación de  $\pm 5^\circ\text{C}$ , ya que esta es la temperatura típica que se encuentra *in vivo* en los mamíferos. En cuanto a la mezcla de gases, el  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$  son los que más influencia tienen sobre el cultivo, siendo la concentración normal de  $\text{O}_2$  de 21% en el aire, la adecuada para el cultivo, mientras que la concentración de  $\text{CO}_2$  tiene que ser de 5% para que se mantenga un pH cercano al neutro en el medio de cultivo. La humedad del cultivo debe ser elevada para evitar que se evapore el agua, lo que causaría un cambio en la presión osmótica del cultivo, para esto el incubador contiene depósitos de agua estéril que mantienen los niveles de humedad estables para el buen desarrollo del cultivo (15).

Para el cultivo de estas células se utilizan soluciones con nutrientes, tales como medio de cultivo y sueros. El medio de cultivo es una solución sintética que permite la supervivencia de las células (pero no la proliferación ni diferenciación de éstas) a través de los nutrientes en su composición, tales como aminoácidos, vitaminas, lípidos, carbohidratos o algún nucleósido. En cambio, los sueros son derivados de animales, a partir de su sangre, de la cual se elimina el componente celular y el fibrinógeno, obteniendo un suero alto en nutrientes, con gran cantidad de sales, carbohidratos, vitaminas, aminoácidos, lípidos, proteínas, hormonas y factores de crecimiento. Sin embargo, la composición específica de los sueros es desconocida y puede ser variable. Los sueros permiten la proliferación y diferenciación de las células, siendo los sueros derivados de animales fetales los que tienen mayor propiedad mitogénica. En el cultivo de las células C2C12 se utiliza Suero Bovino

Fetal durante la etapa de proliferación de las células, mientras que, para inducir diferenciación en las células, este suero debe ser removido y cambiado por Suero de Caballo, antes de que las células alcancen confluencia (15).

#### **1.4. Inmunohistoquímica**

La técnica inmunohistoquímica (IHQ) se utiliza para identificar distintas proteínas específicas, a través de una reacción inmunológica que aprovecha la especificidad de la unión antígeno-anticuerpo. El antígeno corresponde a la molécula que se desea identificar, para la cual se necesita un anticuerpo específico que sea capaz de reconocer dicho antígeno. Para poder visualizar esta reacción, es necesario que el anticuerpo esté conjugado con una enzima, la cual al reaccionar con ciertos sustratos presenta un color específico que nos indica el lugar donde la reacción antígeno-anticuerpo ocurrió (16).

Existen distintos métodos de amplificación de señal que permiten una mejor visualización de la ubicación donde ocurrió la reacción Antígeno-Anticuerpo. En este trabajo se utilizó el método de amplificación Complejo Avidina-Biotina (ABC). Avidina es una proteína de la clara de huevo, que tiene 4 sitios de unión para Biotina, la cual es una vitamina de bajo peso molecular (17). La utilización de Avidina y Biotina se debe a su alta especificidad y fuerte unión entre estas moléculas. El método ABC consiste en la utilización de un anticuerpo primario específico para el antígeno que se quiere reconocer, luego un anticuerpo secundario biotinilado que se unirá al anticuerpo primario, seguido de complejos preformados de Avidina- Biotina conjugados con peroxidasa (16). Finalmente la peroxidasa se une a su sustrato, peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), generando  $H_2O$  y  $O^-$ , este último oxida al cromógeno Diaminobencidina (DAB), lo cual forma un precipitado de color marrón, insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos (18).

Debido a su especificidad y los buenos resultados obtenidos con la técnica de IHQ, esta ha sido utilizada ampliamente tanto en el área clínica; para identificación de distintos tipos de tumores, pronósticos en cáncer, predicción de respuesta ante ciertas terapias, infecciones e identificación de patologías específicas; así como también se utiliza

la técnica IHQ en investigación (19). Para este trabajo se utilizó IHQ para identificar los estados de proliferación, diferenciación y muerte celular, para los cuales se ocuparon distintos anticuerpos que indican dichos estados. Los indicadores de proliferación seleccionados fueron Antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y Bromodesoxiuridina (BrdU), los de diferenciación fueron Miogenina y Desmina, mientras que para identificar muerte celular se utilizó Caspasa 3.

El Antígeno nuclear de proliferación celular es una proteína nuclear de 36 kD que está involucrada en la síntesis de ADN, siendo un cofactor de la ADN polimerasa, por lo cual se asocia a la fase S del ciclo celular. La distribución de PCNA en las células en proliferación es específicamente nuclear, presentando abundante marca en un patrón difuso, granular o mixto, mientras que en las células mitóticas la tinción se puede encontrar difusa en toda la célula, debido a la pérdida de la integridad de la membrana nuclear durante mitosis; en cuanto a las células en diferenciación, estas presentan drásticamente menos marca o muy poca (20).

Bromodesoxiuridina es un nucleótido sintético análogo a la Timidina, que tiene la capacidad de integrarse al ADN de la células en la fase S del ciclo celular, por lo cual es un marcador de síntesis de ADN (21). Para que las células incorporen este nucleótido en su material genético, es necesario que sean cultivadas con un medio que contenga BrdU el cual se incorporará en las células en proliferación (22).

Miogenina es uno de los cuatro factores reguladores de miogénesis, junto con los factores MyoD, Myf5 y MRF4, los cuales comparten la capacidad de inducir células a una diferenciación miogénica. Miogenina tiene la función de inducir en los mioblastos una diferenciación terminal, en la cual salen del ciclo celular y se fusionan para formar las miofibras multinucleadas. Esta proteína presenta una marca celular, y es específica de células de músculo esquelético (23).

Desmina es una proteína citoplasmática de 53 kD, de tipo filamento intermedio, que se encuentra en las células musculares, en el músculo liso se encuentra en los cuerpos densos, mientras que en músculo estriado se encuentra unida a los discos Z de los sarcómeros, otorgando soporte estructural. Esta proteína aparece en la etapa de formación de miotubos en el desarrollo de células de músculo estriado (16).

Caspasa 3 es una de las proteínas de la familia de las Caspasas que son mediadores para la muerte celular programada o apoptosis. Caspasa 3 es esencial para la condensación de la cromatina apoptótica y la fragmentación del ADN, además de participar en el desmantelamiento de la célula y en la formación de cuerpos apoptóticos (24). Es por esto por lo que se usa este marcador, de ubicación citoplasmática como indicador de muerte celular.

En este proyecto se utilizaron células C2C12 sembradas a dos distintas concentraciones, en un scaffold fabricado con biomateriales derivados de no mamíferos, con una microestructura de superficie acanalada. La microestructura de un scaffold puede guiar la organización celular, proliferación celular y producción de matriz, a través de las características como diámetro de la fibra, alineamiento de la fibra y tamaño del scaffold, lo cual tiene efecto sobre la siembra, proliferación, esparcimiento y diferenciación de las células (25). Para evaluar el efecto de este scaffold microestructurado, se utilizó a la vez un scaffold sin microestructura.

Se comparó el desarrollo de las células en ambos scaffolds, que serán sembrados con dos concentraciones de células para establecer la concentración óptima de células para su buen desarrollo. Este desarrollo se evaluó identificando los estados de proliferación, diferenciación y muerte celular, a través de observación y descripción de morfología y de técnica inmunohistoquímica. Este proyecto está contemplado dentro del proyecto FONDECYT 1160311: “Design of novel edible-scaffolds based on non-mammalian biomaterials for in-vitro meat production”.

## **Capítulo 2: Objetivos**

### **2.1. Objetivo General**

Comparar la proliferación y diferenciación de células musculares C2C12 en scaffolds microestructurados y sin microestructura, a distintas concentraciones celulares.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Describir la morfología de las células C2C12 en los scaffolds microestructurados y sin microestructura en las distintas concentraciones celulares.
- Identificar la presencia de células en proliferación, diferenciación y muerte celular en los distintos scaffolds.

## Capítulo 3: Materiales y métodos

El experimento realizado consistió en el análisis de scaffolds con diferentes microestructuras y concentraciones de células de la línea celular C2C12, correspondientes a mioblastos. Los scaffolds son circulares, de aproximadamente un centímetro de diámetro y 3 mm de alto, unos microestructurados con superficie acanalada, que facilite la forma que posteriormente deberán desarrollar las células al diferenciarse, mientras que otros no presentan esta microestructura y en cambio tienen una superficie regular de entramado liso. Estos scaffolds fueron fabricados con gelatina de pez, alginato, agarosa y sorbitol, los cuales son biomateriales derivados de no mamíferos.

El tamaño de la muestra de este experimento es de  $n=16$ , correspondiente a 4 grupos de estudio por triplicado más un control para cada situación. Los grupos de estudio corresponden a scaffolds sembrados con células C2C12, sometidos a 7 días de cultivo con medio de diferenciación, mientras que los controles corresponden a scaffolds con células, cultivados por 7 días sin medio de diferenciación. Las muestras estudiadas fueron las siguientes:

- Scaffold sin microestructura sembrado con 1 millón de células (3 situaciones experimentales y 1 control).
- Scaffold microestructurado sembrado con 1 millón de células (3 situaciones experimentales y 1 control).
- Scaffold sin microestructura sembrado con 2 millones de células (3 situaciones experimentales y 1 control).
- Scaffold microestructurado sembrado con 2 millones de células (3 situaciones experimentales y 1 control).

### 3.1. Elaboración de Scaffolds

Los scaffolds fueron confeccionados en el Centro de Biotecnología de la Universidad Técnica Federico Santa María. Se prepararon soluciones de gelatina de pez,

alginate, agarosa y sorbitol, y se mezclaron de tal manera que quedaron en concentración final 0,9%, 0,4%, 0,2% y 0,1%, respectivamente.

Para moldear los scaffolds se ocuparon placas con y sin microestructura. Para la producción de los scaffolds se ocupó la técnica de *freeze-drying* que comprende sucesivos pasos de congelamiento y una posterior liofilización, en este caso, por un mínimo de 24 horas en equipo LIOBRAS.

Como parte del proceso de acondicionamiento preparatorio para el cultivo de células en los scaffolds, se entrecruzó por una hora con cloruro de calcio 70 mM, y luego de 3 lavados con agua destilada, se agregó etanol 70% por dos horas para esterilizar, se cortaron círculos de aproximadamente 7 mm de diámetro.

### **3.2. Cultivo de células C2C12**

Se utilizaron células C2C12 (línea celular de mioblasto de ratón), Pasaje 5 y se sembraron a dos densidades celulares, un millón y dos millones de células por polímero. Se permitió la adhesión por 2 horas a 37°C y luego se agregó medio completo de cultivo, el cual contiene DMEM alto en glucosa Glutamax (GIBCO), 10% suero bovino fetal (Biological Industries), 1% penicilina/estreptomina (GIBCO), dejando nuevamente en incubadora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Se dejaron creciendo las células en los polímeros durante 48 horas, y los siguientes días se agregó medio diferenciador, que consistió en medio DMEM con suero de caballo 5%, el tiempo de diferenciación fue de 7 días.

Para procesar las muestras, al día 0 de diferenciación y día 7, se agregó Bromodesoxiuridina (Invitrogen), en una dilución 1:100 por pocillo, en placa de 24. Se incubó la placa con el reactivo por 4 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.

Finalmente se retiró el medio con BrdU y se fijaron las células con fijador de Bouin fuerte, por 1 hora. Se lavó con etanol 70% y se dejó cada polímero en 1 ml de Etanol 70%, almacenando la placa a 4°C, sellada con Parafilm.

### **3.3. Procesamiento, inclusión, corte y adhesión**

Las muestras fijadas se procesaron en el Laboratorio de Biología de la Reproducción y del Desarrollo, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Valparaíso,

Las muestras fueron lavadas en tres baños de etanol de 70° para quitar el exceso de fijador y fueron embebidas en Histogel para facilitar su manipulación y se pasaron a cassettes rotulados que entraron al procesador de tejidos Leica TP 1020 (Alemania) para su deshidratación en baños de concentración creciente de etanol, aclaramiento en butanol (26), e impregnación de Paraplast Plus.

Las muestras fueron incluidas en un centro de inclusión Leica EG 1150H y una vez solidificadas, fueron cortadas en un micrótomo rotatorio Leica RM 2155. Se obtuvieron cortes seriados de todo el espesor del polímero, separados en cintas de 15 cortes cada una, con un grosor de 5 µm.

La adhesión de los cortes a los portaobjetos se realizó en baños de flotación a 40°C. Se montó el primer corte de cada cinta para técnica histoquímica (tricrómico de Arteta), utilizando albúmina de Mayer como medio de adhesión al portaobjetos.

Los cortes siguientes de cada set para inmunohistoquímica se montaron utilizando polilisina como medio de adhesión. Finalmente, los cortes se dejaron durante toda la noche en estufa a 40°C para su secado.

### **3.4. Tricrómico de Arteta**

Luego de desparafinar en xilol, los cortes se hidrataron en una batería de alcohol etílico en concentraciones descendentes hasta agua destilada; las preparaciones se tiñeron con el método tricrómico de Arteta (27).

Brevemente, tinción con Hematoxilina de Harris por 75 segundos y viraje en agua corriente durante 10 min, seguido de un baño en agua destilada.

Luego se tiñó con Eritrosina-Orange G durante 30 minutos y lavado en agua destilada. Se continuó con ácido fosfotúngstico por 10 minutos, finalizando con Azul de Anilina por 75 segundos. Los cortes fueron 8deshidratados, en alcohol etílico de 95° y absoluto, y aclarados en xilol.

Finalmente, las preparaciones se cubrieron con cubreobjetos utilizando Entellán como medio de montaje.

### **3.5. Descripción celular, conteo y medición**

Se realizó una descripción morfológica de las características celulares, identificando células viables y no viables, alargadas y redondas, en mitosis, picnosis y cariorrexis, se describió también la morfología de grupos redondos y en parche de células observados en los distintos scaffolds.

Además, se realizó un conteo del número de células totales para todas las variables mencionadas anteriormente, el cual consideró entre 6 a 9 portaobjetos por situación, con 3 cortes cada portaobjetos. Siendo cada situación por triplicado, se promediaron los valores de conteo y se obtuvo el valor de cada variable por situación.

Para determinar el tamaño de los grupos celulares se usó un microscopio Leitz DMRBE con una cámara fotográfica digital Leica DFC290. Para los grupos redondos se fotografiaron 100 grupos por situación, con excepción de 3 situaciones que no tenían la cantidad mencionada de grupos, lo que significó un total de 1520 grupos que fueron medidos, mientras que para los grupos parche se midieron todos los encontrados, correspondientes a 313 grupos parche. En las imágenes digitalizadas y usando el programa de procesamiento de imagen digital Image J de acceso universal, se midió el perímetro de los grupos celulares que se formaron, expresado en micrones, haciendo la distinción entre grupos redondos y en parche.

### 3.6. Inmunohistoquímica y H-Score

Para la técnica inmunohistoquímica se utilizaron anticuerpos contra antígenos de proliferación celular (PCNA y BrdU), diferenciación muscular (Desmina y Miogenina) y apoptosis (Caspasa 3).

Se realizó inmunohistoquímica solo a 3 cortes representativos por situación, los que fueron adheridos a portaobjetos con polilisina, obteniendo 8 portaobjetos con tres cortes cada uno, más un control positivo para cada anticuerpo realizado.

Después de la desparafinación e hidratación de rutina, algunos procedimientos de inmunohistoquímica variaron según protocolo para cada anticuerpo, pero todos constaron de una recuperación antigénica (para anti PCNA, Desmina y Miogenina en buffer Tris a pH 7,6 con calor y en vaporera, para anti Caspasa 3 en buffer Citrato a pH 6,0, y para anti BrdU enzimática con Tripsina), bloqueo de peroxidasa endógena, bloqueo inespecífico con el suero respectivo, incubación con anticuerpo primario, anticuerpo secundario correspondiente biotinilado, sistema de amplificación ABC, revelado con DAB, contraste nuclear con Hematoxilina de Harris, deshidratación, aclaración y montaje con Entellán.

Para el H-Score se realizó un conteo de las células que presentaron marcación luego de realizadas las inmunohistoquímicas anti marcadores de proliferación celular, diferenciación muscular y apoptosis. Para esto se establecieron 3 niveles de intensidad de marcación, asignándose como 0 sin marcación, +1 marca leve, +2 marca moderada y +3 marca intensa. Una vez contadas las células se procedió a calcular el valor de H-Score. Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{H-Score} = (\% \text{ de } 0) \times 0 + (\% \text{ de } +1) \times 1 + (\% \text{ de } +2) \times 2 + (\% \text{ de } +3) \times 3$$

El score final, que tiene un rango entre 0 y 300, se puede interpretar de la siguiente manera:

- 0: Sin tinción

- 0-100: Tinción débil
- 100-200: Tinción moderada
- 200-300: Tinción fuerte

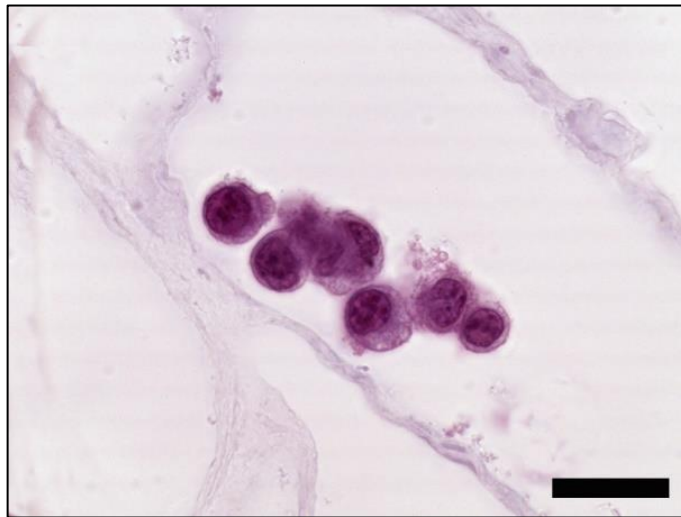
### **3.7. Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico se realizó el test ANOVA de dos factores, el cual evaluó las variables de resultado del experimento: proliferación (conteo de mitosis), diferenciación (células alargadas) y muerte celular (picnosis y cariorrexis); en las dos variables de exposición del experimento: estructura del scaffold y concentración celular. Con este test se buscó demostrar si hubo o no sinergia entre los dos factores del experimento (estructura de scaffold y concentración celular). El test se realizó en el programa Excel.

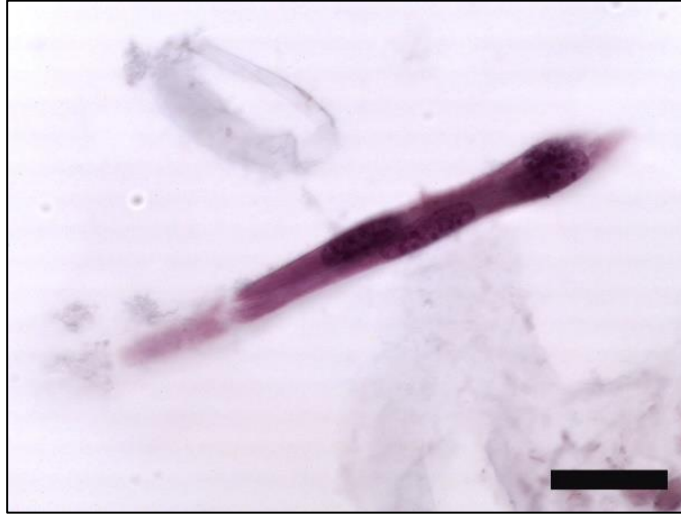
## Capítulo 4: Resultados

### 4.1. Descripción de la morfología celular

La morfología de las células encontradas en el scaffold se puede clasificar principalmente en dos: células redondas y alargadas, cuyas características varían según el estado celular en que se encuentran. Las células redondas (Figura 1) corresponden a células de entre 10 y 15  $\mu\text{m}$ , con núcleos céntricos, uno o dos nucléolos y zonas de heterocromatina, mientras que las células alargadas (Figura 2), como su nombre lo indica, tienen un citoplasma alargado, miden entre 30 y 60  $\mu\text{m}$ , con un núcleo central y alargado con cromatina granular y uno o dos nucléolos. Según su estado celular, las células se clasifican en viables y no viables. Además, las células se encontraron agrupadas en dos distintos tipos de grupos: redondos, que presentan forma redonda u ovalada; y grupos en parche, que presentan formas irregulares.



*Figura 1: Fotomicrografía de células redondas. Tricómico de Arteta, 1000X, Barra de escala= 20  $\mu\text{m}$ .*



*Figura 2: Fotomicrografía de células alargadas. Tricrómico de Arteta, 1000X, Barra de escala= 20  $\mu$ m.*

#### **4.1.1. Células viables y no viables**

Las células viables corresponden a aquellas que presentan características morfológicas tales como un núcleo de tamaño normal, con cromatina granular y citoplasma con bordes bien definidos. Las células no viables son aquellas que están en proceso de muerte celular, que se pueden clasificar según su morfología nuclear, la cual presenta núcleos picnóticos, es decir, pequeños, hipercromáticos y de cromatina condensada; o núcleos cariorréxicos, en los cuales la cromatina se encuentra condensada y fragmentada (28).

La distribución de las células viables en los estratos del scaffold, fue similar en todas las situaciones experimentales: en todos se encontró la mayor cantidad de células viables en el estrato superior del scaffold, luego en el estrato medio, y la menor cantidad de células viables se encontró en el estrato inferior. En el caso de las muestras del grupo control, en ambas situaciones de scaffold microestructurado se encontró la mayor cantidad de células viables en el estrato medio, seguido del estrato superior y finalmente el estrato inferior; en cambio, en las muestras con scaffold sin microestructura, la mayor cantidad de células viables se encontró en el estrato superior, seguido del estrato medio y del inferior (Figura 3).

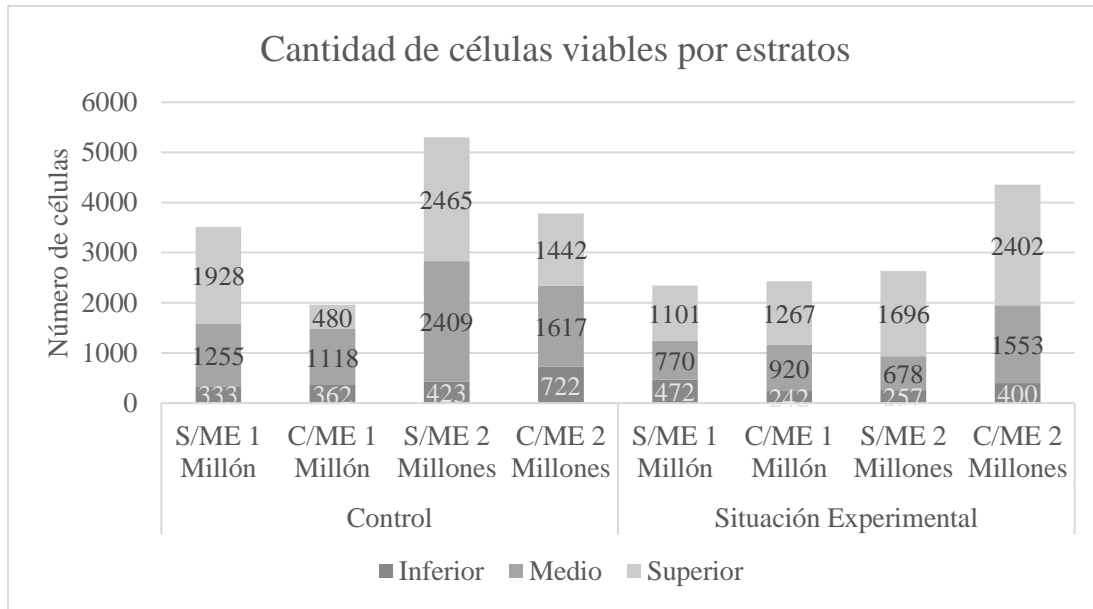
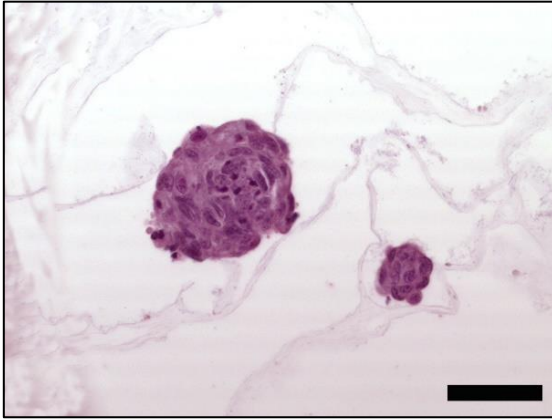


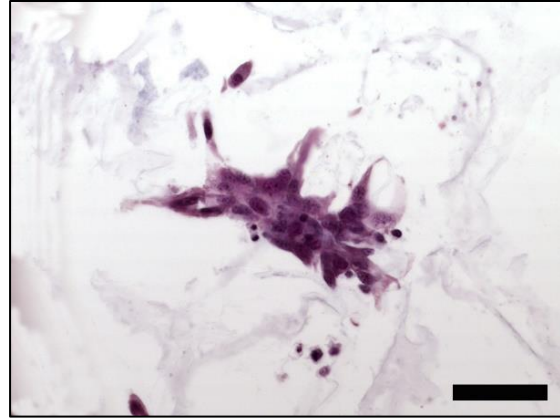
Figura 3: Distribución de células viables en los distintos estratos del scaffold: superior, medio e inferior. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

#### 4.1.2. Grupos redondos y parche

Las células se encontraron agrupadas en dos patrones distintos en las muestras, grupos redondos y grupos en “parche”. Los grupos redondos tienen una forma entre esférica y ovalada, encontrándose en distintos tamaños y distribuidos en todo el scaffold. La mayoría de las células que se encuentran contenidas en estas esferas pierden su forma al agruparse, y presentan distintas formas, como redondas, ovaladas o a veces sin límites citoplasmáticos definidos, pero a medida que se acercan al exterior van adquiriendo una forma más alargada, tanto en su núcleo como en su citoplasma, el cual se adapta a la forma esferoide del grupo (Figura 4). En cambio, los grupos denominados en parche tienen formas irregulares y son muy distintos unos de otros, se encontraron mayoritariamente en la periferia de los scaffolds y están compuestos por células de morfología alargada principalmente en el exterior, y en el centro algunas células de morfología redonda, ovaladas y también alargada (Figura 5).



*Figura 4: Fotomicrografía de Grupos Redondos. Tricómico de Arteta, 400X, Barra de escala= 50  $\mu$ m.*



*Figura 5: Fotomicrografía de un Grupo alargado. Tricómico de Arteta, 400X, Barra de escala= 50  $\mu$ m.*

Los grupos redondos fueron encontrados en mayor cantidad que los grupos en parche en todas las situaciones del experimento, como se observa en la *Figura 6*. Los grupos redondos se encontraron en una cantidad parecida en ambas situaciones con un millón de células y sin microestructura con dos millones de células, mientras que en el scaffold microestructurado con dos millones de células el valor del conteo de grupos redondos fue mayor que en los anteriores. En cuanto a los grupos en parche, se encontraron en muy baja cantidad en todas las situaciones, encontrándose los valores más bajos en las situaciones con un millón de células, mientras que en los grupos con dos millones de células se encontraron más grupos en parche. En cambio, en el control del experimento, los grupos en parche fueron encontrados en una cantidad mayor que en el experimento con 7 días de diferenciación, excepto para el scaffold con microestructura sembrado con 1 millón de células, mientras que los grupos redondos se mantuvieron en una cantidad parecida que en el experimento.

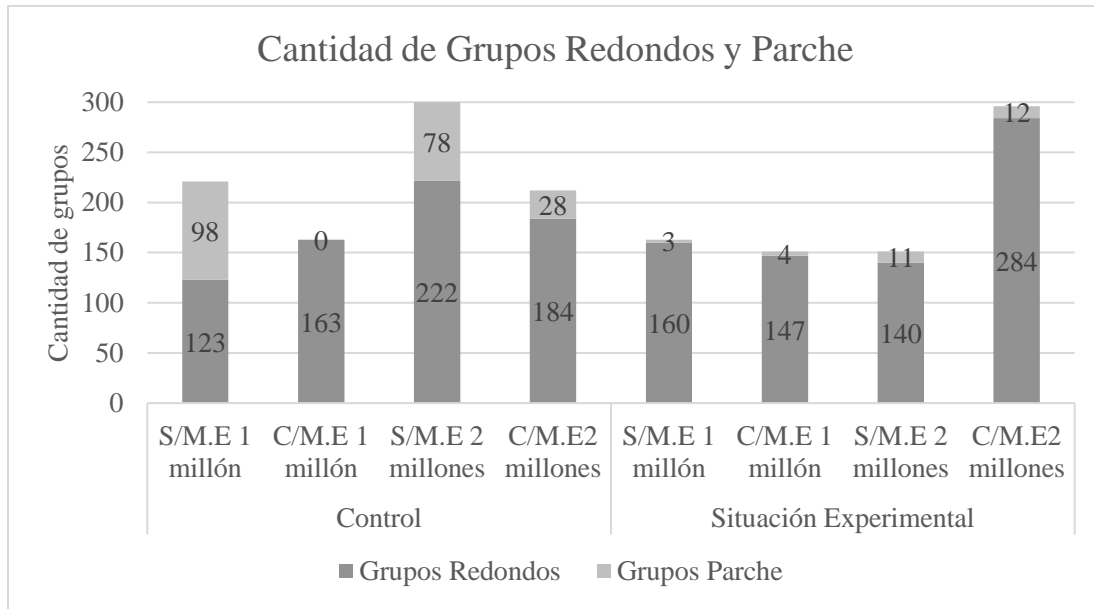


Figura 6: Conteo de grupos redondos y en parche en las distintas situaciones del experimento y el control. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

Se midió el perímetro de los grupos y según estos resultados, se encontró que los grupos redondos son de menor tamaño que los grupos parche, en todas las situaciones experimentales y de control. El perímetro de los grupos redondos se mantuvo entre 112  $\mu\text{m}$  y 166,4  $\mu\text{m}$  y el tamaño de los grupos parche fue entre 159,1  $\mu\text{m}$  y 387,2  $\mu\text{m}$ . En ambas situaciones, grupos redondos y parche, se encontró el menor valor en la situación del experimento S/M.E con un millón de células, mientras que el más alto valor se obtuvo en el control, también en la situación S/M.E con un millón de células (Figura 7).

En cuanto a la distribución de los grupos, estos se encontraron distribuidos en todo el scaffold, los grupos redondos tanto en la periferia como en el centro, pero en mayor cantidad en el centro del scaffold. En cambio, los grupos en parche se encontraron en su gran mayoría en la periferia de los scaffold y muy pocos en el centro de este. Este patrón se mantuvo en todas las situaciones del experimento, tanto con scaffold microestructurado y sin microestructura, ya sea con un millón de células o 2 millones de células.

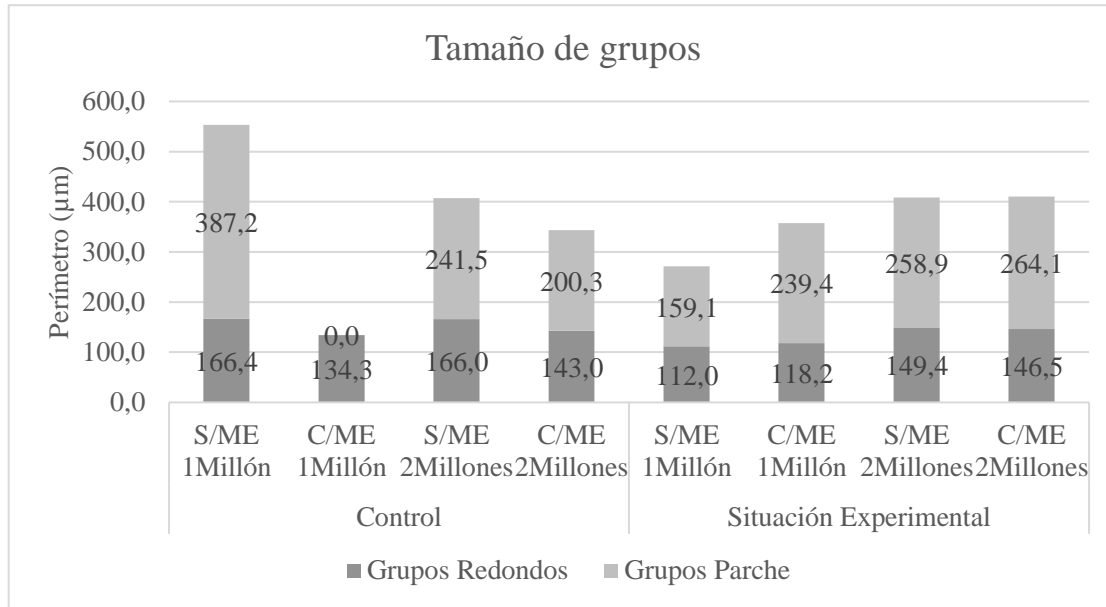


Figura 7: Tamaño de los grupos redondos y en parche, en micrones, en las distintas situaciones del experimento y el control. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

#### 4.2. Identificación de células en los distintos estados

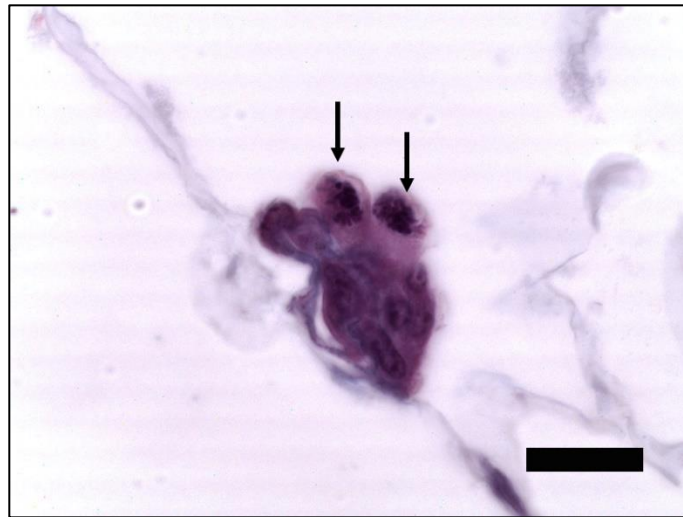
En todos los scaffolds se encontraron células en los siguientes estados: proliferación, diferenciación y con signos de muerte celular. Para la identificación de los tres estados se utilizaron criterios morfológicos complementados con técnica inmunohistoquímica. Las células presentaron un bajo nivel de proliferación, indicado por un bajo índice mitótico y un valor de H-Score de marcadores de proliferación (PCNA y BrdU) no mayor a 52. En cuanto a las células en diferenciación, se encontraron en mayor cantidad células redondas que alargadas, estas últimas representan la morfología de una célula diferenciada, por lo que pocas células estaban en etapa de diferenciación, lo que se complementó con inmunohistoquímica para los marcadores de diferenciación muscular Desmina y Miogenina, que reafirmaron los resultados que indican poca diferenciación. Por último, las células con signos de muerte celular, identificadas por sus características morfológicas como células picnóticas y cariorréxicas, se encontraron entre un 6 y 18% del número total de células, mientras que la inmunohistoquímica de Caspasa 3, realizada para

complementar los resultados de muerte celular, obtuvo su valor más alto de 42, el cual es un valor bajo considerando que los valores de H-Score van desde 0 a 300.

#### 4.2.1. Proliferación

##### Morfología celular: Mitosis

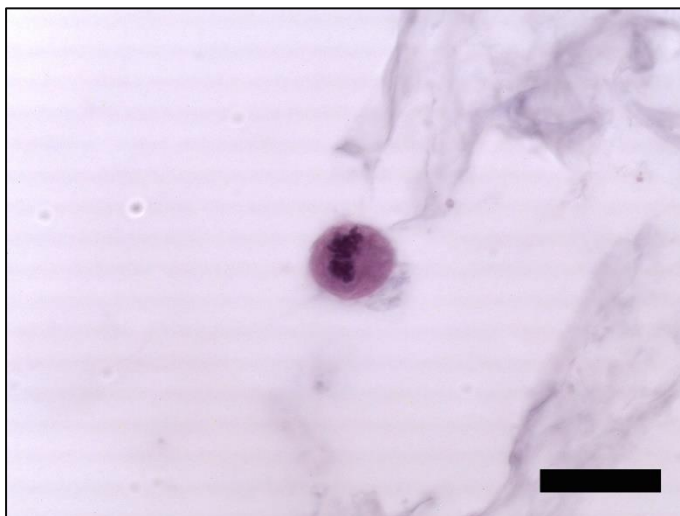
El resultado del conteo celular que nos da una estimación de la proliferación es el conteo de mitosis observadas en las preparaciones, para hacer una estimación del índice mitótico. Se observaron figuras mitóticas en las distintas etapas de mitosis (Figura 8-10) en muy baja cantidad en todas las situaciones del experimento, siendo el porcentaje de células en mitosis, en relación con la cantidad total de células, no mayor a un 0,05%.



*Figura 8: Células en etapa Profase de mitosis, indicadas por flechas negras. Tricrómico de Arteta, 1000X. Barra= 20  $\mu$ m.*



*Figura 9: Célula en etapa Metafase de mitosis, indicada por flecha negra. Tricrómico de Arteta, 1000X. Barra= 20  $\mu$ m.*



*Figura 10: Célula en etapa temprana de Anafase de mitosis. Tricrómico de Arteta, 1000X. Barra= 20  $\mu$ m.*

En la *Figura 11* se muestra el porcentaje de mitosis en relación con el número total de células, encontradas por cada situación experimental y control, donde se puede observar que la mayor cantidad de mitosis se dio en la situación experimental que utilizó un scaffold sin microestructura, sembrado con 1 millón de células. En cambio, en las situaciones control, donde las muestras no habían sido sometidas a diferenciación, se encontró la mayor cantidad de mitosis en el scaffold microestructurado con 1 millón de células. En ambos casos,

situación experimental y el control, se observa que la menor cantidad de mitosis encontrada fue en el scaffold microestructurado sembrado con 2 millones de células.

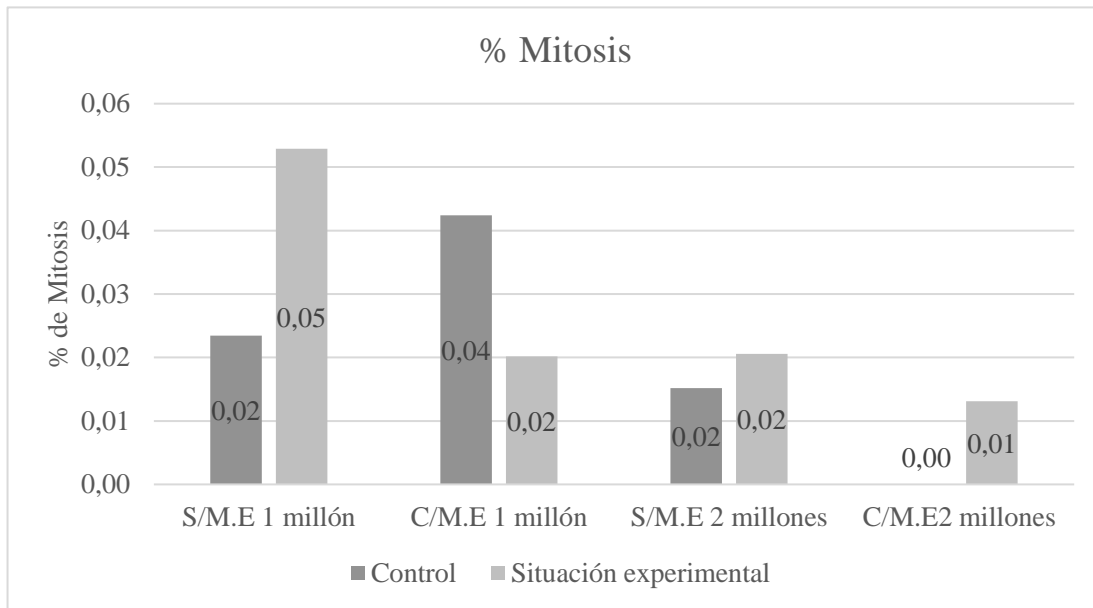
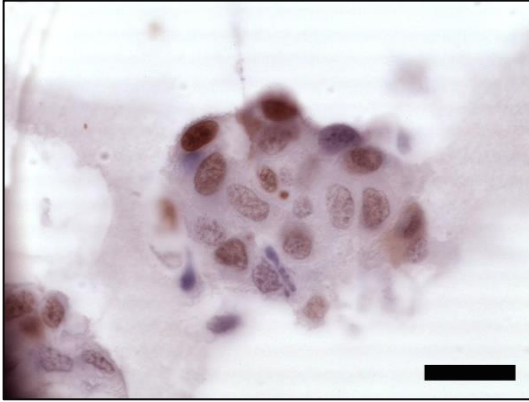


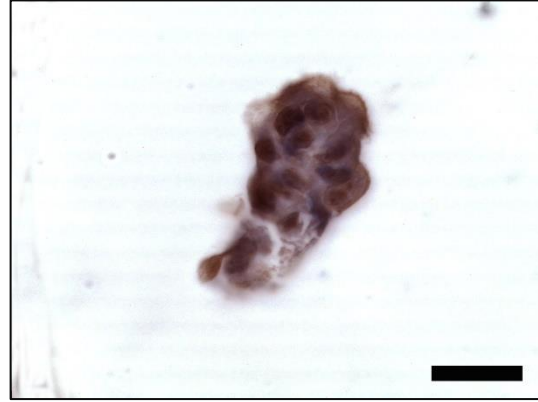
Figura 11: Porcentaje de células en mitosis con relación al número total de células encontrado en las distintas preparaciones. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

### IHQ: Marcadores de proliferación PCNA y BrdU

En cuanto a los resultados obtenidos con inmunohistoquímica, se utilizaron dos marcadores de proliferación, PCNA y BrdU (Figura 12 y 13). Se hizo un conteo de células que presentaban marcación según su intensidad y se calculó su valor de H-Score, el cual tiene un rango de 0 a 300. En la mayoría de los casos se obtuvo un valor más alto de score para los resultados de BrdU, siendo notablemente más alto el valor de BrdU en la situación experimental con scaffold microestructurado y sembrado con 2 millones de células, en cambio el valor más bajo para score de BrdU lo presentó el experimento con scaffold sin microestructura con 1 millón de células. Para los resultados obtenidos con PCNA, la situación experimental que alcanzó el mayor score fue el scaffold microestructurado con 1 millón de células, mientras que el que obtuvo un menor score fue el scaffold sin microestructura con 2 millones de células.



*Figura 12: Marca anti- PCNA en distintas intensidades en grupo redondo de células. Se observa patrón de marcaje nuclear. Aumento 1000X. Barra= 20  $\mu$ m.*



*Figura 13: Marca anti- BrdU en un grupo de células. Se observa patrón de marcaje nuclear. Aumento 1000X. Barra= 20  $\mu$ m.*

Los marcadores de inmunohistoquímica también se realizaron a las muestras control del experimento, donde se mantuvieron los valores más altos de score para BrdU en comparación con PCNA. En contraste con las situaciones experimentales, en el control el valor más alto obtenido en BrdU se dio en scaffold sin microestructura y 2 millones de células, y el valor más bajo se obtuvo en el scaffold microestructurado con 1 millón de células. En los resultados de PCNA el valor más alto lo obtuvo el scaffold sin microestructura y 1 millón de células, y el valor más bajo lo presentó el scaffold con microestructura y 1 millón de células, donde no se encontraron células con marcación para PCNA.

En la Figura 14 se muestran las comparaciones de ambos marcadores, donde se observan los mayores valores en BrdU, pero aun así hay que destacar que los valores son bajos, tomando en cuenta que los valores de H-Score de inmunohistoquímica van de 0 a 300. Además, podemos notar que las muestras control presentan un mayor índice de proliferación en comparación con las muestras del experimento que tenían 7 días de diferenciación.

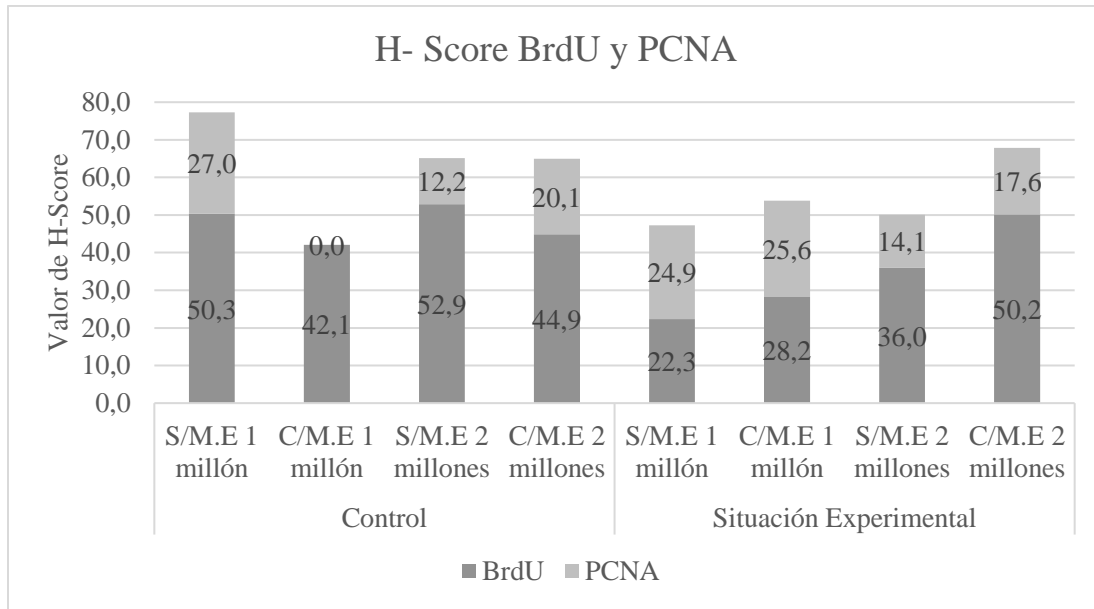


Figura 14: Resultados de H-Score de PCNA y BrdU. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

Además, también se realizó un H-Score con el valor total de células redondas y alargadas que presentaron marca. En cuanto a los resultados de PCNA, en la mayoría de los casos las células redondas presentaron un valor de score mayor que las células alargadas, con excepción de las muestras de scaffold C/M.E con un millón de células, y las muestras de scaffold S/M.E con dos millones de células. En el caso de las muestras del control, en todas las situaciones se encontró un valor más alto de score de células redondas que alargadas. En las muestras de BrdU, solo en la situación S/M.E con dos millones de células se encontró un valor más alto en células alargadas, el resto presentó un score mayor en células redondas. En el caso del control, se obtuvo un valor más alto en las células redondas, con excepción de la situación S/M.E y un millón de células (Figura 15 y 16).

Capítulo 4: Resultados

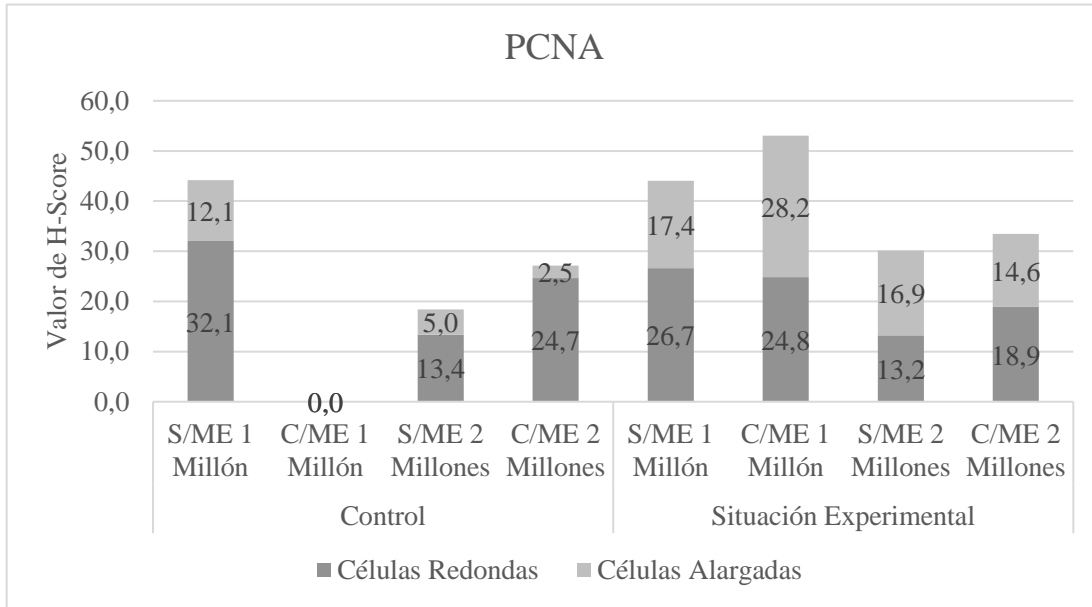


Figura 15: Resultados de H-Score de PCNA del total de células redondas y alargadas. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

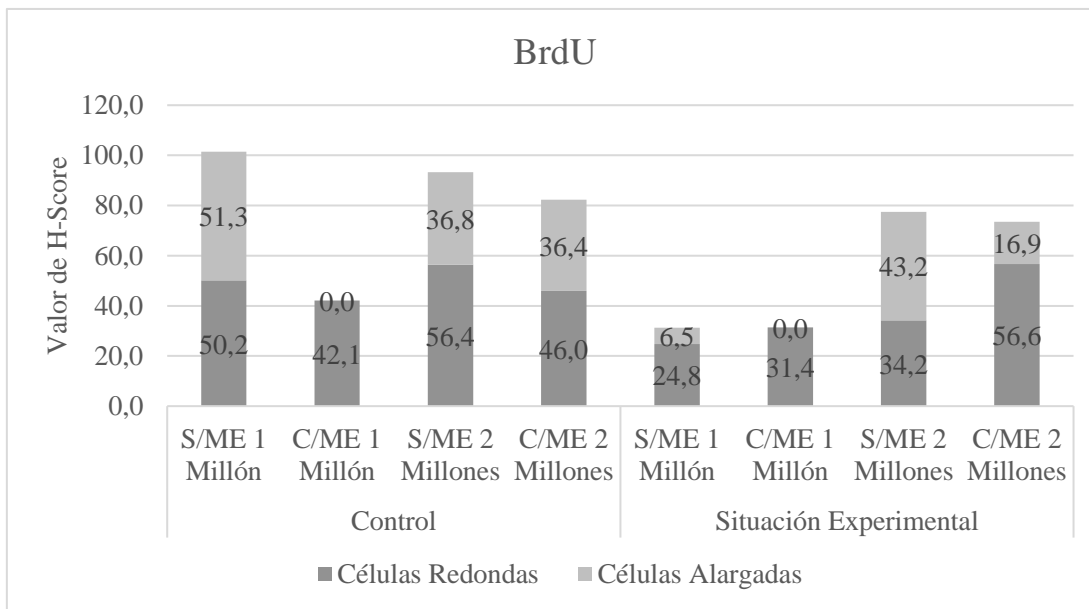


Figura 16: Resultados de H-Score de BrdU del total de células redondas y alargadas. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

### 4.2.2. Diferenciación

#### Morfología celular: Células alargadas

En cuanto a la morfología celular, las células alargadas representarían una etapa de diferenciación más avanzada, ya que sería similar a una célula muscular propiamente tal, por esto se realizó un conteo celular comparando la cantidad de células viables redondas y alargadas que se encontraron en las distintas situaciones del experimento. La cantidad de células redondas fue mayor que la cantidad de células alargadas en todas las situaciones, teniendo porcentajes parecidos en todos los casos. Sin embargo, cabe destacar que el porcentaje mayor de células alargadas encontrado en la situación experimental se dio en el scaffold sin microestructura con células sembradas a cantidad de un millón, alcanzando un 16,2%. En cuanto a la situación control del experimento, los valores no fueron tan similares en todas las situaciones, donde destaca el mayor porcentaje de células alargadas con un 27,2% y el menor porcentaje con 8,2%, en la situación sin microestructura con un millón de células y con microestructura y 2 millones de células respectivamente (Figura 17).

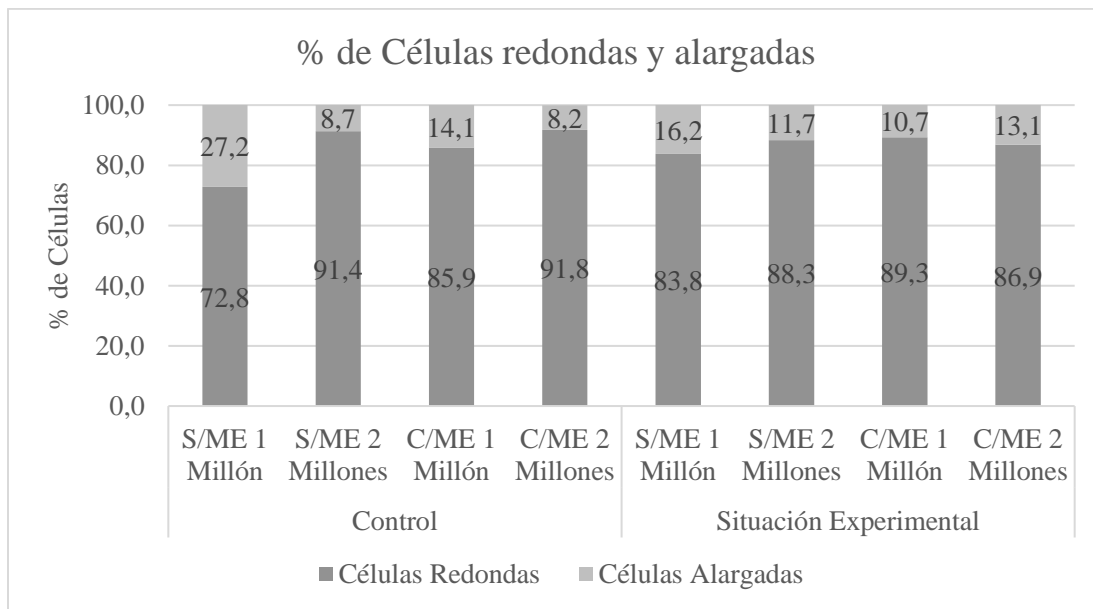
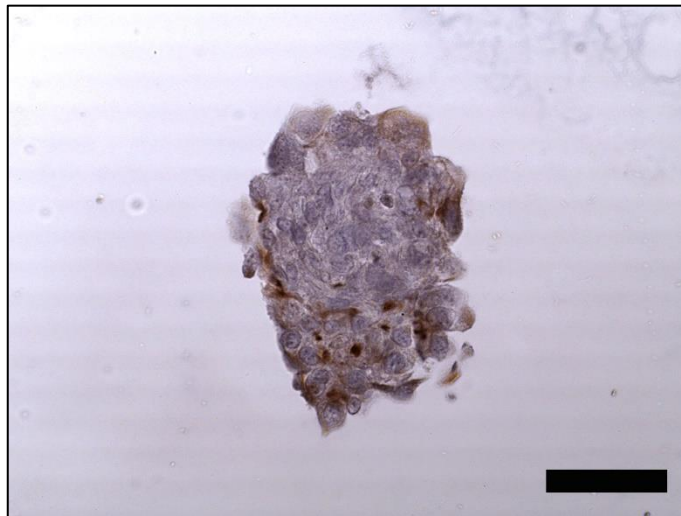


Figura 17: Porcentaje de células redondas y alargadas con relación al número de células viables encontrado en las distintas preparaciones. S/ME: Sin microestructura. C/ME: Con microestructura.

### **IHQ: Marcadores de diferenciación muscular Miogenina y Desmina**

Los resultados de marcadores de diferenciación muscular Miogenina y Desmina (Figura 18 y 19), muestran una concordancia en la expresión, teniendo el mayor valor de score en ambos casos, en la situación sin microestructura con un millón de células, y el menor valor de score en el scaffold sin microestructura y dos millones de células.

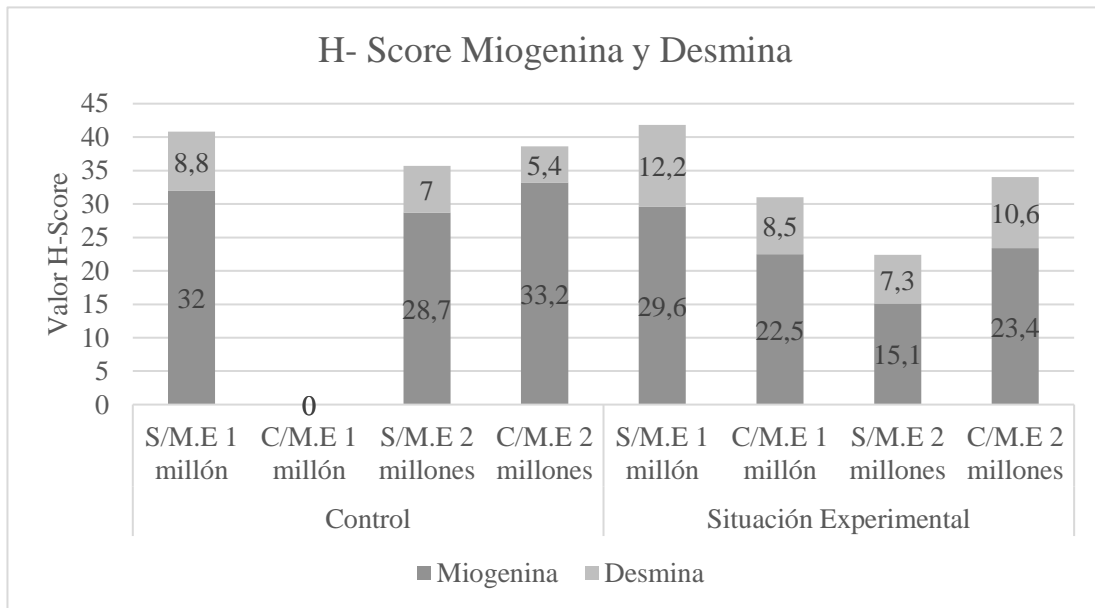


*Figura 18: Marca anti- Desmina en un grupo de células. Se observa patrón de marcaje citoplasmático. Aumento 400X. Barra= 50  $\mu$ m.*



*Figura 19: Marca anti- Miogenina en células de morfología alargada. Se observa patrón de marcaje nuclear. Aumento 400X. Barra= 50  $\mu$ m.*

Hay que destacar que los valores de score obtenidos en Miogenina (entre 15,1 y 29,6) fueron más altos que los valores obtenidos con Desmina (entre 7,3 y 12,2). A los controles del experimento también se le aplicaron los marcadores de diferenciación muscular, observando en Desmina la mayor expresión en el scaffold sin microestructura con un millón de células, y la menor expresión en el scaffold con microestructura y 2 millones de células, donde no se encontraron células. Distintos fueron los resultados obtenidos en los controles para Miogenina, donde el mayor valor de score se obtuvo en el scaffold microestructurado con dos millones de células, y el menor valor en el scaffold microestructurado con un millón de células, donde al igual que como ocurrió en desmina, no se encontraron células. Comparando los resultados obtenidos en la situación experimental con 7 días de diferenciación, y en el control con 0 días de diferenciación, se obtuvieron valores más altos de score para Miogenina en los casos control del experimento, mientras que para Desmina los valores más altos se obtuvieron en la situación experimental, como se observa en la *Figura 20*.



*Figura 20: Resultados de H-Score de Miogenina y Desmina. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.*

En el score por separado del total de células redondas y alargadas, se obtuvo un valor más alto en células alargadas por sobre las redondas, tanto en las muestras de desmina

y Miogenina, con la única excepción de desmina, donde en la muestra del experimento C/M.E y dos millones de células, el valor más alto de score lo obtuvo las células redondas (Figura 21 y 22).

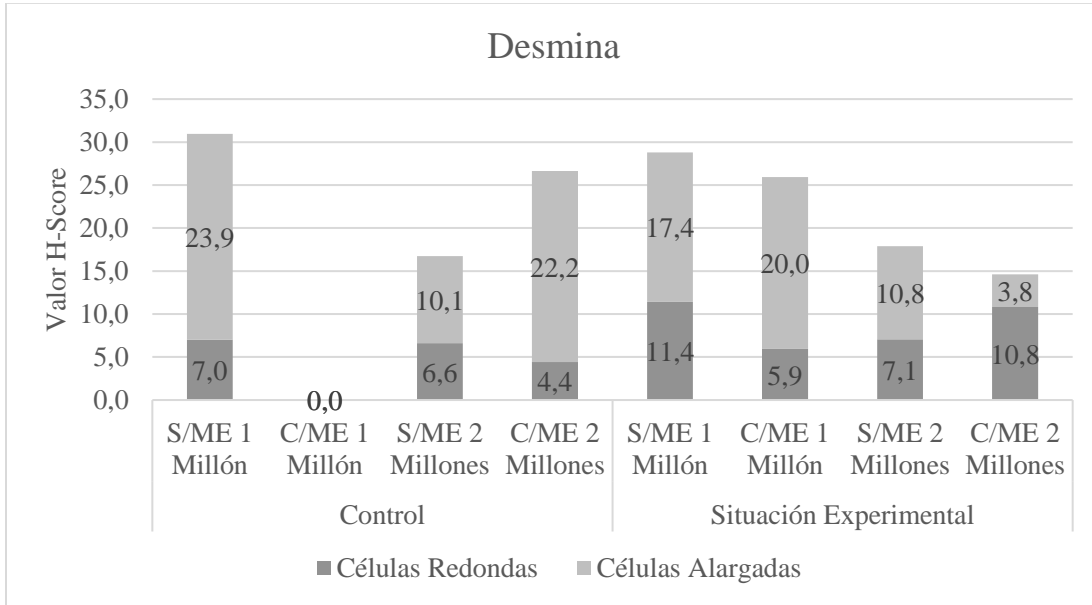


Figura 21: Resultados de H-Score de Desmina del total de células redondas y alargadas. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

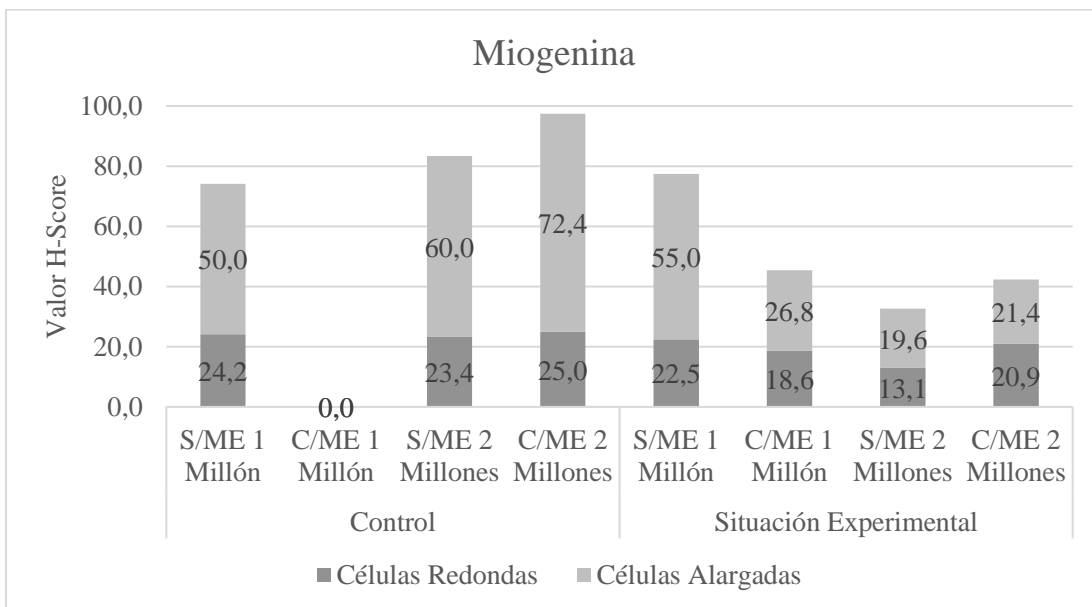


Figura 22: Resultados de H-Score de Miogenina del total de células redondas y alargadas. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

### 4.2.3. Muerte celular

#### Morfología celular: Picnosis y Cariorrhexis

Para la identificación de muerte celular se contaron las células que presentaban núcleos picnóticos y cariorréxicos, con una morfología característica, mostrando los núcleos picnóticos una marcada hipercromacia, con retracción de núcleo y condensación de cromatina (Figura 23), y en el caso de las células cariorréxicas, se pudo observar la fragmentación del núcleo (Figura 24).

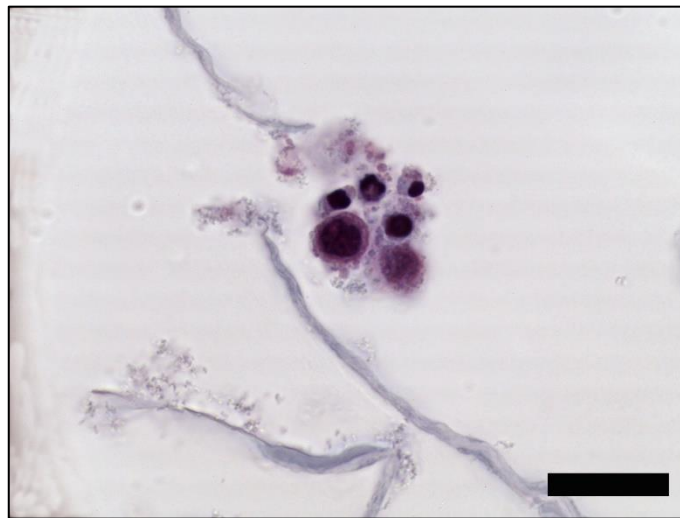


Figura 23: Células con núcleos picnóticos. Tricrómico de Artera. Aumento 1000X. Barra= 20  $\mu$ m

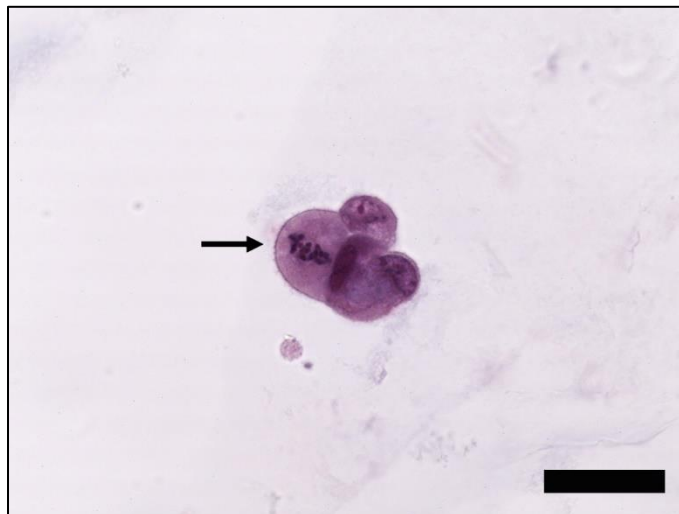


Figura 24: Célula con núcleo cariorréxico, indicada por flecha negra. Tricrómico de Artera. Aumento 1000X. Barra= 20  $\mu$ m.

Tanto las muestras de la situación experimental como las del control presentaron en mayor cantidad núcleos picnóticos que cariorréxicos, estos últimos no alcanzando el 1% del total de las células. En el caso de la situación experimental, las muestras con 2 millones de células obtuvieron el mayor porcentaje de picnosis. En el control el mayor porcentaje de picnosis lo mostró la situación con 2 millones de células y scaffold sin microestructura, en cambio, el menor porcentaje de picnosis lo obtuvo el control de 2 millones de células con scaffold microestructurado (Figura 25).

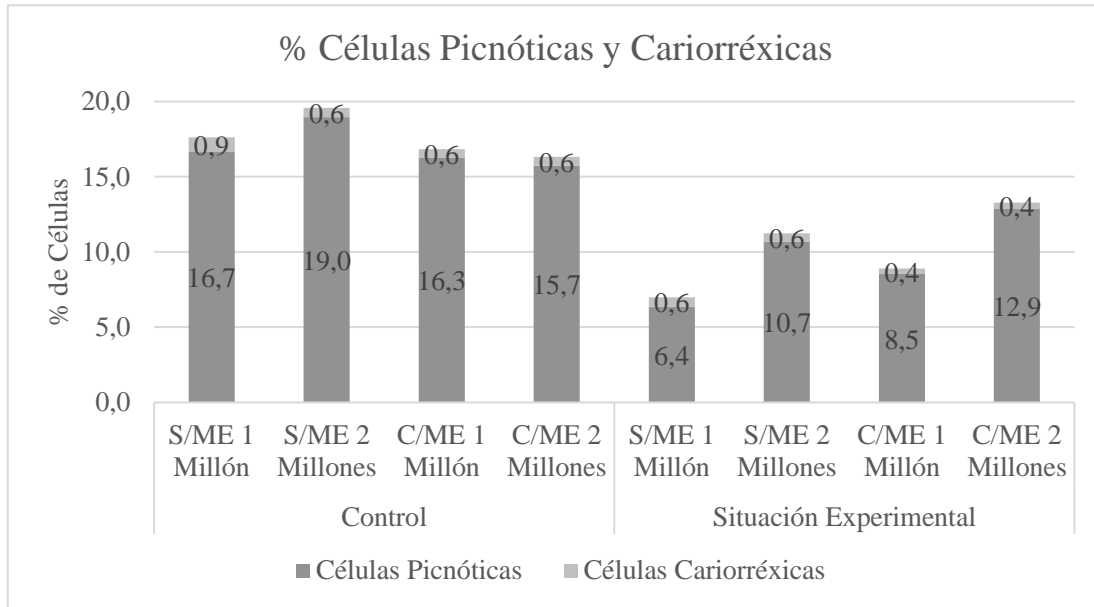


Figura 25: Porcentaje de células picnóticas y cariorréxicas en las distintas preparaciones del experimento y control. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

### IHQ: Marcador de apoptosis Caspasa 3

A las muestras se le realizó inmunohistoquímica con el marcador de Caspasa 3, el cual es un indicador de apoptosis. Como se observa en la Figura 26, los valores más altos de score se obtuvieron en las muestras con 7 días de diferenciación, en comparación con las muestras de control, sin diferenciación, que obtuvieron valores más bajos de score. En ambos casos, situación experimental y control, el valor más bajo de score se obtuvo en las muestras con un millón de células y un scaffold sin microestructura. El valor más alto de score para el experimento lo mostró el scaffold con microestructura sembrado con 1 millón de células,

mientras que en el control el valor más alto lo obtuvo el scaffold sin microestructura con 2 millones de células.

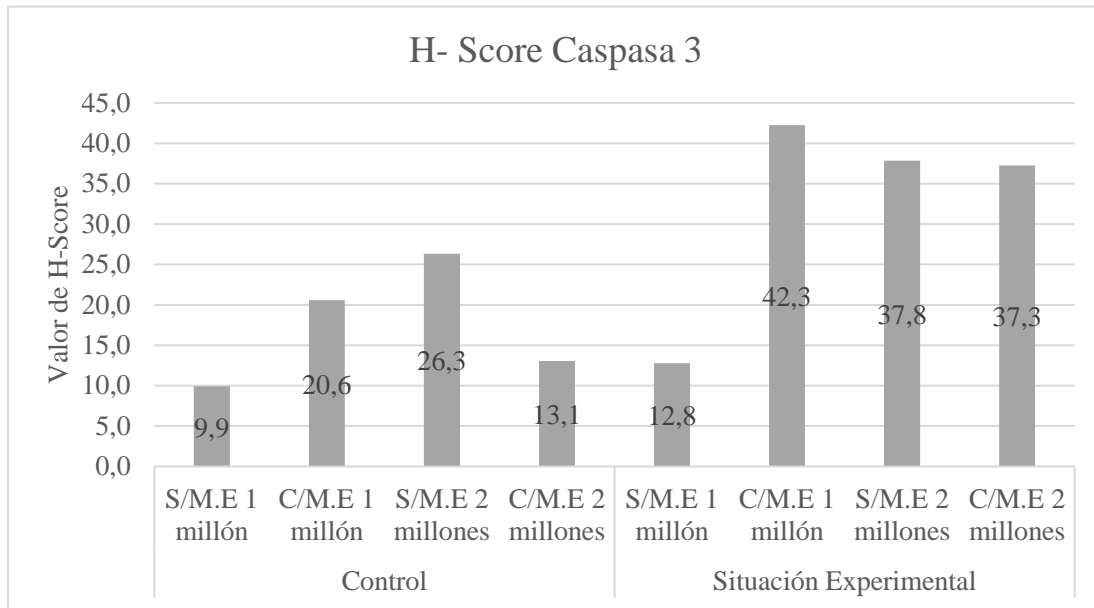


Figura 26: Resultados de H-Score de Caspasa 3. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

El score de Caspasa 3 aplicado por separado a células redondas y alargadas mostró en todas las situaciones el valor más alto en células redondas, siendo el valor de score de células alargadas muy pequeño, entre 0 y 8.3 (Figura 27).

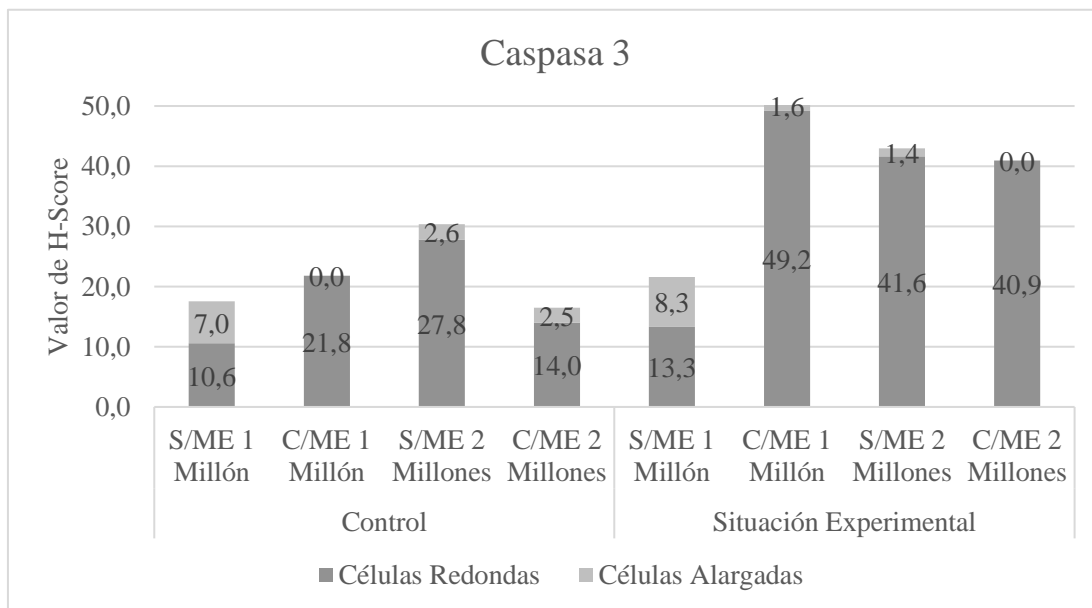


Figura 27: Resultados de H-Score de Caspasa 3 en células redondas y alargadas. S/M.E: Sin Microestructura. C/M.E: Con Microestructura.

#### Capítulo 4: Resultados

Cabe destacar que la mayoría de los grupos redondos encontrados en estas preparaciones mostraron mayor marca en las células de la parte central de los grupos, mientras que las células periféricas de los grupos mostraron menor marca (Figura 28).

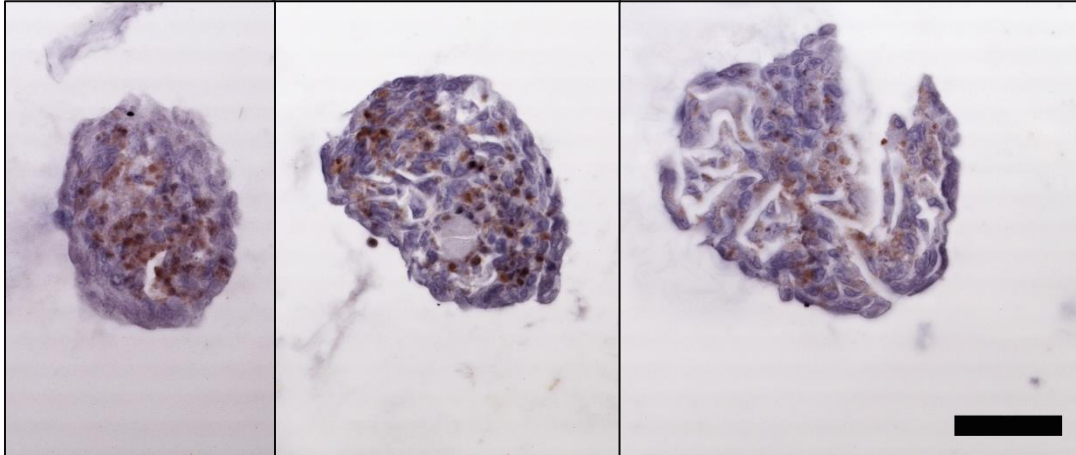


Figura 28: Marca anti- Caspasa 3 en grupos de células. Aumento 400X. Barra= 50  $\mu$ m.

Todas las variables de resultado de este experimento (mitosis, células viables, alargadas y redondas, núcleos picnóticos y cariorréxicos) fueron sometidas al test de ANOVA de dos factores, en el cual se evalúa el efecto de las variables de exposición, es decir, microestructura y concentración celular, sobre las variables de resultado mencionadas anteriormente. Los resultados obtenidos se muestran en la *Tabla 1*, la cual indica que en ninguno de los casos hubo interacción entre las variables de exposición del experimento, que influenciara las variables de resultado de este, ya que para que haya interacción el valor P debe ser menor a 0,05, lo cual no se dio en ningún caso.

*Tabla 1: Resultados del test ANOVA de dos factores, aplicado a las variables de resultado del experimento, con relación a las variables de exposición.*

<b>Variable</b>	<b>Valor P</b>	<b>Interacción</b>
% Mitosis	0,46	No
% Células Viables	0,96	No
% Células Alargadas	0,11	No
% Células Redondas	0,22	No
% Núcleos Picnóticos	1,00	No
% Núcleos Cariorréxicos	0,76	No

## Capítulo 5: Discusión

### 5.1. Descripción de la morfología celular

La morfología de las células C2C12 encontradas en los scaffold mostraron un cambio notable en comparación a cómo deberían crecer las células en un cultivo normal en monocapa, sin ser sometidas a un biopolímero que les de soporte. Las células en etapa de proliferación en un cultivo en monocapa presentan una forma estrellada, mientras que creciendo en el scaffold la forma que tomaron las células fue más bien circular u oval (14). En el caso de las células que ya entraron a una etapa de diferenciación, en cultivos en monocapa se ha visto que adquieren una forma más alargada y pasan a ser multinucleadas, formando miotubos (14), en cambio en las células que crecieron en scaffold no ocurrieron grandes cambios celulares, primando las células redondas y ovales en todas las situaciones del experimento, siendo las células alargadas, que podríamos considerar como diferenciadas, un porcentaje muy pequeño del total de células.

Debido a que lo que difiere en un cultivo en monocapa de células C2C12, con respecto a este experimento es el scaffold, que entrega un medio de soporte a las células, podemos deducir que es el scaffold o alguno de sus componentes, lo que interfirió en el crecimiento y la diferenciación de las células, ya que la morfología observada en las células fue muy distinta a la esperada en cultivo en monocapa.

Referente a la distribución de las células viables, estas fueron encontradas en todos los casos del experimento en mayor cantidad en el estrato superior del scaffold, luego en el estrato medio y finalmente la menor cantidad de células viables se encontró en el estrato inferior. Estos resultados se pueden explicar debido a que la parte superior del scaffold tuvo un contacto más directo con el medio de cultivo y pudo recibir de mejor manera los factores para el desarrollo de las células, en cambio a los estratos medios e inferior puede que no les haya llegado el suficiente medio, por lo que no se encontraron tantas células viables. En cambio, en las muestras del control, se encontraron la mayor cantidad de células viables en las muestras que presentaron un scaffold C/M.E se encontraron en el estrato medio, seguido

del estrato superior y finalmente el estrato inferior, y las muestras con scaffold S/M.E presentaron resultados similares a los del experimento.

En cuanto a la formación de grupos redondos y en parche, estos solo se han encontrado en este experimento, no se observan cuando las células C2C12 crecen en cultivo de monocapa (14). No es de esperarse que las células se agrupen en estos grupos redondos, ya que la forma de estos mismos sería perjudicial para las células, debido a que evita la diferenciación de las células para formar miotubos y eventualmente músculo. En cambio, la forma de agrupación en parche de las células permitiría que estas tengan más espacio y una direccionalidad más acorde con lo que se esperaría para la diferenciación de células musculares.

Los resultados de la medición del perímetro de los grupos redondos y parches muestran que los grupos parche son de mayor tamaño que los grupos redondos, esto porque las células se encuentran organizadas de una forma más favorable para la proliferación y diferenciación, lo que permite que el tamaño de estos grupos sea mayor, en cambio al adquirir esta forma redonda los grupos, sus células no siguen proliferando, por lo que el tamaño es menor.

Con respecto a la distribución de estos grupos, podemos pensar que el scaffold interfirió también en ese aspecto ya que los grupos redondos se encontraron en todo el scaffold, en la periferia y en mayor cantidad en el centro, mientras que los grupos en parche se encontraron principalmente en la periferia del scaffold. Debido a que los grupos en parche representan un resultado más favorable para el experimento, por su morfología más similar a la morfología muscular, podemos deducir que las células se diferencian mejor en la periferia del scaffold, ya que no se hallaron grupos parche en el centro del scaffold. Esto podría ser debido a que la periferia del scaffold está en contacto más directo con el medio de cultivo, que permite que las células crezcan correctamente, mientras que en el centro del scaffold puede que el medio de cultivo no haya llegado de manera adecuada, por lo que las células no crecieron de la manera esperada y formaron estos esferoides.

## **5.2. Identificación de células en los distintos estados**

### **5.2.1. Proliferación**

En células que han entrado en un período de diferenciación, es de esperarse que baje la tasa de proliferación (20), por lo que los resultados obtenidos para el marcador de proliferación BrdU son concordantes con lo esperado, ya que obtuvieron el valor de score más alto en las muestras con 0 días de diferenciación (recién terminado el proceso de proliferación), que las de 7 días de diferenciación, mientras que los resultados obtenidos con PCNA fueron similares para los casos del experimento y control.

Los resultados obtenidos en cada situación permiten concluir que los scaffold con microestructura mostraron el valor más alto de expresión de marcadores de proliferación, tanto en BrdU como en PCNA. Sin embargo, no hubo consenso en cuanto a la concentración celular, ya que en BrdU los mayores valores de score se obtuvieron en scaffold con dos millones de células, mientras que en PCNA se obtuvieron con un millón de células. En cambio, en los casos control los resultados obtenidos fueron distintos, estos muestran que las situaciones con más alta tasa de proliferación se obtuvieron en los scaffold sin microestructura, donde en BrdU esto ocurrió a concentración de 2 millones, y en PCNA a concentración de un millón de células.

Al ser poco concordantes los resultados obtenidos para los marcadores de proliferación, no se puede identificar qué microestructura es más adecuada para la proliferación, ni cuál concentración celular sea la óptima. Sin embargo, los valores obtenidos en los casos son bajos, considerando que el valor de score va desde 0 a 300, y no varían tanto entre sí, ya que los valores de BrdU van desde 22,35 a 50,20; y los valores de PCNA desde 14,07 a 25,63. Según esto, no habría una gran diferencia entre scaffold con las distintas estructuras y distintas concentraciones celulares.

Los resultados de score para PCNA y BrdU para células redondas y alargadas, muestran que en su mayoría se encontró el valor más alto en células redondas, esto se puede explicar debido a que las células al entrar en una etapa de diferenciación dejan de proliferar,

por lo que las células alargadas, que están más diferenciadas, no presentaron un alto valor de score para marcadores de proliferación, lo cual sería concordante con los resultados esperados para los marcadores de proliferación celular.

### 5.2.2. Diferenciación

Según la morfología celular, en este experimento las células se clasificaron en alargadas y redondas, siendo las primeras las que nos dan una aproximación de que las células están en una etapa de diferenciación. En general en todas las situaciones del experimento y el control, la cantidad de células redondas corresponde entre un 72,8-91,8% del total de células viables, mientras que las células alargadas solo alcanzan entre el 8,2-27,2% del total de células, lo que nos podría indicar que la mayoría de las células no se están diferenciando.

Con la inmunohistoquímica se respaldan los datos entregados por morfología, ya que se encontró un valor bajo de score para los marcadores de diferenciación muscular Desmina y Miogenina

Miogenina se expresa en la etapa terminal de diferenciación muscular, es esencial para la fusión de miocitos y formación de miotubos (10). De acuerdo con lo anterior, los resultados de inmunohistoquímica para este marcador no deberían ser positivos en las muestras de control, ya que tienen 0 días de diferenciación, y deberían ser positivos para las muestras con 7 días de diferenciación. Sin embargo, los controles fueron los que obtuvieron el valor más alto de score para Miogenina (entre 28,7 y 33,2) en comparación con las muestras con 7 días de diferenciación, donde el valor más alto obtenido fue 29,6 en el scaffold sin microestructura sembrado con 1 millón de células. Con lo anterior se puede inferir que las células no habrían entrado a una etapa terminal de diferenciación, al haber poca presencia de Miogenina, razón por la cual tampoco se encontraron estructuras similares a miotubos (10-11).

Los resultados de Desmina obtuvieron un valor menor en comparación a los resultados de Miogenina, ya que Desmina comienza el desarrollo de su expresión en la etapa terminal de la diferenciación celular, pero se mantiene en las células musculares ya

diferenciadas (16), por lo que se piensa que no se encontraron células musculares propiamente diferenciadas, ya que la expresión de Desmina fue muy baja.

Las células alargadas presentaron un alto valor para Miogenina y Desmina, en comparación con las células redondas, lo que indica que efectivamente las células alargadas que se hallaron en el experimento entraron en una etapa de diferenciación. Por el contrario, las células redondas del experimento presentaron un bajo valor de Miogenina y Desmina en todas las situaciones, lo que sería concordante con los resultados esperados, debido a que no han entrado a una etapa de diferenciación aún.

### **5.2.3. Muerte celular**

La muerte celular se puede presentar en dos formas, necrosis (muerte por una noxa o injuria) y apoptosis (muerte celular programada) (28). Los resultados obtenidos mostraron ambos tipos de muerte celular en este experimento.

De los resultados obtenidos de picnosis y cariorrexis (signos morfológicos celulares de necrosis), se encontró que fue mucho más predominante la picnosis sobre la cariorrexis. En el experimento con 7 días de diferenciación, la picnosis se encontró en mayor cantidad en aquellas muestras sembradas con dos millones de células, no habiendo mucha diferencia entre scaffold microestructurado y sin microestructura. De esto se puede inferir que la forma del scaffold no influye en si las células mueren o no, pero lo que sí influye es la cantidad de células con las que se siembran, ya que aquellas muestras sembradas con dos millones de células tuvieron el más alto valor de picnosis, esto podría significar que al haber mayor cantidad de células, hay menos recursos disponibles para estas, por lo que una siembra con un millón de células resulta con menos muerte celular. En el caso control, con las células en cero días de diferenciación, los valores de picnosis fueron similares en las situaciones comparando la microestructura y concentración celular. Sin embargo, en este caso, la picnosis fue mayor que en los casos con 7 días de diferenciación.

Caspasa 3, que es un marcador de apoptosis, obtuvo valores más altos de score en las muestras con 7 días de diferenciación que en las muestras con 0 días. En las muestras

de este experimento, los valores obtenidos no varían mucho entre los distintos scaffolds y concentraciones, exceptuando el scaffold sin microestructura con un millón de células, donde el valor obtenido fue mucho más bajo tanto en la situación experimental como en el control. Por lo anterior los resultados de Caspasa 3 nos indican que la situación en la que menos muerte celular se presentó fue en la situación S/M.E con un millón de células.

Los grupos redondos encontrados en las muestras de Caspasa 3 presentaron marca en el centro de los grupos, esto nos podría indicar que las células centrales de los grupos entraron a un proceso de muerte celular, posiblemente porque no recibieron la cantidad necesaria de nutrientes, al estar muy compactas y próximas unas con otras (15).

Los resultados de Score dividido por células redondas y alargadas demostraron que las células redondas presentaron los valores más altos del Score, en cambio las células alargadas casi no presentaron marca, por lo que la muerte celular está mayormente concentrada en las células redondas.

En cuanto a los resultados del test ANOVA de dos factores, estos no mostraron que hubo sinergia entre los factores de microestructura del scaffold y la concentración celular a la que fueron sembradas las células. Esto es concordante con la mayoría de los resultados expuestos anteriormente, ya que no se pudo establecer una tendencia que identifique que la estructura del scaffold tenga influencia con la proliferación, diferenciación o muerte celular, lo mismo para la concentración celular. Por lo mismo no se pudo establecer qué situación fue la mejor para el correcto desarrollo en cuanto a proliferación y diferenciación de las células, por lo cual también se podría decir que la microestructura no tuvo mayor efecto sobre las células.

## Capítulo 6: Conclusión

- No hay mayor diferencia en la morfología celular, esta es similar en las células que crecieron a distintas concentraciones en los dos tipos de scaffolds.
- La microestructura del scaffold no influyó en la distribución celular, sin embargo, el scaffold tal vez no fue tan permeable para permitir el acceso de medio de cultivo a todos los niveles del scaffold.
- Hubo diferencia en la forma en que interactuaron las células unas con otras, evidenciada en los grupos que formaron, donde la mayor cantidad de grupos redondos y alargados se encontró en la situación C/M.E y dos millones de células.
- Para proliferación celular no se puede concluir cuál fue la mejor o peor microestructura ni concentración celular que permita la proliferación de las células, ya que los resultados no fueron concordantes.
- Los resultados de diferenciación demostraron que la situación S/M.E con un millón de células presentó la mayor cantidad de células alargadas y el mayor score de Miogenina y Desmina, por lo que esta sería la más adecuada para la diferenciación.
- Para muerte celular, en picnosis y el marcador Caspasa 3 se encontró el menor valor de recuento y score respectivamente, en la situación S/M.E con un millón de células, por lo tanto en esta situación las células mostraron menor muerte celular.
- El scaffold S/M.E con un millón de células presentó la mayor cantidad de células diferenciadas y la menor cantidad de células en muerte celular, por lo que sería el más indicada para el correcto crecimiento de las células.
- En general los resultados obtenidos no fueron los esperados, ya que la cantidad de células alargadas o que presentaron marcadores de diferenciación fue muy baja,

## Capítulo 6: Conclusión

además se encontraron en todas las situaciones del experimento grupos redondos, los que no se asemejan a la morfología esperada que podrían tener las células.

## Capítulo 7: Bibliografía

1. Hollister SJ. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* [Internet]. 2005;4(7):518–24. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nmat1421>
2. Langelaan MLP, Boonen KJM, Polak RB, Baaijens FPT, Post MJ, van der Schaft DWJ. Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends Food Sci Technol* [Internet]. 2010;21(2):59–66. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2009.11.001>
3. Smith BD, Grande DA. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2015;11(4):213–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2015.27>
4. Hess MW, Pfaller K, Ebner HL, Beer B, Hekl D, Seppi T. 3D versus 2D cell culture. Implications for electron microscopy [Internet]. Vol. 96, *Methods in Cell Biology*. Elsevier Inc.; 2010. 649-670 p. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96027-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96027-5)
5. Lanza R. *Principles of Tissue Engineering*. Second. Estados Unidos; 2000.
6. Roldán S, Vargas C, Mejías M, Zapata J MM. *Ingeniería de Tejidos y Aplicaciones*. Primera Ed. Medellín; 2016.
7. Varoni E, Tschon M, Palazzo B, Nitti P, Martini L, Rimondini L. Agarose gel as biomaterial or scaffold for implantation surgery: Characterization, histological and histomorphometric study on soft tissue response. *Connect Tissue Res*. 2012;53(6):548–54.
8. Campos MGN, Mei LHI, Jr ARS. Sorbitol-Plasticized and Neutralized Chitosan Membranes as Skin Substitutes. *Mater Res*. 2015;18(4):781–90.
9. Gartner L HJ. *Texto Atlas Histología*. Tercera Ed. México: McGraw Hill Interamericana; 2008.
10. Kierszenbaum A. *Histología y Biología Celular*. Segunda Ed. Madrid: Elsevier; 2008.

11. Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP. Myogenic Regulatory Factors and the Specification of Muscle Progenitors in Vertebrate Embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* [Internet]. 2002;18(1):747–83. Disponible en: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.cellbio.18.012502.105758>
12. Yin H, Price F, Rudnicki MA. Satellite Cells and the Muscle Stem Cell Niche. *Physiol Rev* [Internet]. 2013;93(1):23–67. Disponible en: <http://physrev.physiology.org/cgi/doi/10.1152/physrev.00043.2011>
13. ATCC. Product Sheet C2C12 (Atcc ® Crl-1772™). 2017;12:2414846. Disponible en: [https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1772.aspx?geo\\_country=dk#characteristics](https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-1772.aspx?geo_country=dk#characteristics)
14. Burattini S, Ferri R, Battistelli M, Curci R, Luchetti F, Falcieri E. C2C12 murine myoblasts as a model of skeletal muscle development: Morpho-functional characterization. *Eur J Histochem*. 2004;48(3):223–33.
15. Gil Loyzaga P. Cultivo de Células Animales y Humanas: Aplicaciones en Medicina Regenerativa. Primera Ed. Madrid: Editorial Vision Libros; 2011.
16. Dabbs D. Diagnostic immunohistochemistry. Cuarta Edi. Elsevier; 2013.
17. Hsu S, Raine L, Fanger H. A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am J Clin Pathol*. 1981;75(5):734–8.
18. Boenisch T. Immunochemical Staining Methods. Tercera. California: DAKO Corporation; 2001.
19. Kaliyappan K, Palanisamy M, Duraiyan J, Govindarajan R. Applications of immunohistochemistry. *J Pharm Bioallied Sci* [Internet]. 2012;4(6):307. Disponible en: <http://www.jpbonline.org/text.asp?2012/4/6/307/100281>
20. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC-, Kellock DB, Watkins JA, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some, neoplasms. *J Pathol*. 1990;162(4):285–94.

## Capítulo 7: Bibliografía

21. Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: Paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev.* 2007;53(1):198–214.
22. Cell Signalling Technology. BrdU Cell Proliferation Assay Kit. 2012; Disponible en: <https://media.cellsignal.com/pdf/6813.pdf>
23. Zammit PS. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2017;72:19–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.11.011>
24. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999;6(2):99–104.
25. Ragety GR, Griffon DJ, Lee HB, Fredericks LP, Gordon-Evans W, Chung YS. Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cell chondrogenesis. *Acta Biomater* [Internet]. 2010;6(4):1430–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.040>
26. Gabe M. *Techniques histologiques*. Primera Ed. Paris: Masson et C Editerurs; 1968.
27. Lopez M, Leyton C, Graf M. *Técnicas de Histología y Citología*. Primera. Santiago: Universidad de Chile; 1982.
28. Stevens A, Lowe J. *Texto Y Atlas De Anatomía Patológica*. Harcourt; 1994. 541 p.

## Anexos

### Protocolo PCNA

#### Día 1

##### Desparafinación:

Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	5'
Alcohol 100 I	5'
Alcohol 100 II	5'
Alcohol 100 III	5'
Alcohol 95 I	5'
Alcohol 95 II	5'
Alcohol 80	5'
Alcohol 70 con $\text{Li}_2\text{CO}_3$	5'
Alcohol 70	5'
Agua destilada I	5'
Agua destilada I	5'
Tris buffer	5'

##### Recuperación Antigénica:

Buffer tris (T° ambiente)	5'
Microondas	3'
<b>Vaporera</b>	5'
Enfriamiento de preparaciones en agitador	20'
Agua destilada I(en agitador)	10'
Agua destilada II (en agitador)	10'
Agua destilada III (en agitador)	10'

##### Bloqueo Peroxidasa Endógena:

* <b>Peróxido de hidrogeno</b> (2% en metanol) (en agitador)	30'
Agua destilada I (en agitador)	5'

**TRASLADAR LAS PREPARACIONES A LA BANDEJA Y MARCARLAS CON LÁPIZ HIDÓFOBO**

<b>Incubación (en agitador)</b>	
Tris buffer I (T° ambiente)	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Suero de cabra 2% en Tris buffer (200 µL/porta)	30'
Anticuerpo primario (4 ° C)(200 µL/porta) <b>PCNA (mouse monoclonal) 1:500 en Buffer Tris</b>	<b>Over night</b>

## Día 2<sup>1</sup>

Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra 1:500 <sup>2</sup>	1h
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
<b>*Complejo ABC</b> (200 µL/porta) <sup>3</sup>	90'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
<b>*Diaminobencidina</b> (200 µL/porta) <sup>4</sup>	10'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
<b>TRANSFERIR LAS PREPARACIONES AL CANASTILLO</b>	

## Tinción (Opcional):

Agua destilada I	5'
Agua destilada II	5'
Hematoxilina	10''
Agua corriente	10'
Agua destilada I	Enjuague rápido

<sup>1</sup> Al comenzar el día 2 de trabajo, se traspasa la bandeja con las preparaciones al agitador. **Antes de comenzar los lavados con Buffer Tris se prepara el anticuerpo secundario.**

<sup>2</sup> 1:500; i.e., por cada 1 µL de anticuerpo se agregan 500 µL de buffer.

<sup>3</sup> Preparar al menos 30 minutos antes de usar.

<sup>4</sup> Debe prepararse aproximadamente después del segundo lavado con Buffer, ya que debe utilizarse casi inmediatamente; si se prepara antes debe ser guardado en oscuridad.

## Capítulo 7: Bibliografía

Agua destilada II	5'
Agua destilada III	5'

### **Deshidratación:**

Agua destilada (solo si no se hace contraste)	5'
Alcohol 50	5'
Alcohol 70	5'
Alcohol 80	5'
Alcohol 95 I	5'
Alcohol 95 II	5'
Alcohol 100 I	5'
Alcohol 100 II	5'
Alcohol 100 III	5'
Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	5'

### **Montar con Entellán**

## **Protocolo BrdU**

### **Día 1**

### **Desparafinación:**

Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	5'
Alcohol 100 I	5'
Alcohol 100 II	5'
Alcohol 100 III	5'
Alcohol 95 I	5'
Alcohol 95 II	5'
Alcohol 80	5'
Alcohol 70 con $\text{Li}_2\text{CO}_3$	5'
Alcohol 70	5'
Agua destilada I	5'
Agua destilada I	5'
Tris buffer	5'

**Bloqueo Peroxidasa Endógena:**

* <b>Peróxido de hidrogeno</b> (2% en metanol) (en agitador)	30'
Agua destilada I	5'
Agua destilada II	5'
Agua destilada II	5'

**Recuperación Antigénica:**

Agua destilada a 37°C	5'
Tripsina a 37°C	1'
Agua destilada I (fría)	5'
Agua destilada II	5'
Agua destilada III	5'
HCl 2N	10-20' (10')
Tetraborato de sodio 0,1 M pH 8,5 (Bórax)	10'
Agua destilada I	Enjuague rápido
Agua destilada II	5'

<b>TRASLADAR LAS PREPARACIONES A LA BANDEJA Y MARCARLAS CON LÁPIZ HIDÓFOBO</b>	
<b>Incubación (en agitador)</b>	
Tris buffer I (T° ambiente)	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Suero de cabra 2% en Tris buffer (200 µL/porta)	30'
Anticuerpo primario (4 ° C) (200 µL/porta) BrdU (rabbit policlonal) (1:500 en buffer Tris)	<b>Over night</b>

**Día 2<sup>5</sup>**

Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'

<sup>5</sup> Al comenzar el día 2 de trabajo, se traspa la bandeja con las preparaciones al agitador. **Antes de comenzar los lavados con Buffer Tris se prepara el anticuerpo secundario.**

Capítulo 7: Bibliografía

Anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra 1:500 <sup>6</sup>	1h
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
*Complejo ABC (200 µL/porta) <sup>7</sup>	90'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
*Diaminobencidina(200 µL/porta) <sup>8</sup>	10'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
<b>TRANSFERIR LAS PREPARACIONES AL CANASTILLO</b>	

**Tinción (Opcional):**

Agua destilada I	5'
Agua destilada II	5'
Hematoxilina	10''
Agua corriente	10'
Agua destilada I	Enjuague rápido
Agua destilada II	5'
Agua destilada III	5'

**Deshidratación:**

Agua destilada (solo si no se hace contraste)	5'
Alcohol 50	5'
Alcohol 70	5'
Alcohol 80	5'
Alcohol 95 I	5'
Alcohol 95 II	5'
Alcohol 100 I	5'
Alcohol 100 II	5'
Alcohol 100 III	5'
Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	5'

<sup>6</sup> 1:500; i.e., por cada 1 □L de anticuerpo se agregan 500 □L de buffer.

<sup>7</sup> Preparar al menos 30 minutos antes de usar.

<sup>8</sup> Debe prepararse aproximadamente después del segundo lavado con Buffer, ya que debe utilizarse casi inmediatamente; si se prepara antes deber ser guardado en oscuridad.

## Protocolo Miogenina y Desmina

### Día 1

#### Desparafinación:

Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	5'
Alcohol 100 I	5'
Alcohol 100 II	5'
Alcohol 100 III	5'
Alcohol 95 I	5'
Alcohol 95 II	5'
Alcohol 80	5'
Alcohol 70 con Li <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	5'
Alcohol 70	5'
Agua destilada I	5'
Agua destilada I	5'
Tris buffer	5'

#### Recuperación Antigénica:

Buffer tris (T° ambiente)	5'
Microondas	3'
<b>Vaporera</b>	30'
Enfriamiento de preparaciones en agitador	20'
Agua destilada I(en agitador)	10'
Agua destilada II (en agitador)	10'
Agua destilada III (en agitador)	10'

#### Bloqueo Peroxidasa Endógena:

* <b>Peróxido de hidrogeno</b> (2% en metanol) (en agitador)	30'
Agua destilada I (en agitador)	5'

**TRASLADAR LAS PREPARACIONES A LA BANDEJA Y MARCARLAS CON LÁPIZ HIDÓFOBO**

**Incubación (en agitador)**

Tris buffer I (T° ambiente)	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Suero de cabra 2% en Tris buffer (200 µL/porta)	30'
Anticuerpo primario (4 ° C)(200 µL/porta) <b>Miogenina 1:100 en buffer tris</b> <b>Desmina 1:250 en buffer tris</b>	<b>Over night</b>

## Día 2<sup>9</sup>

Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra 1:500 <sup>10</sup>	1h
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
<b>*Complejo ABC (200 µL/porta)<sup>11</sup></b>	90'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
<b>*Diaminobencidina (200 µL/porta)<sup>12</sup></b>	10'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
<b>TRANSFERIR LAS PREPARACIONES AL CANASTILLO</b>	

## Tinción (Opcional):

Agua destilada I	5'
Agua destilada II	5'
Hematoxilina	10''
Agua corriente	10'
Agua destilada I	Enjuague rápido

<sup>9</sup> Al comenzar el día 2 de trabajo, se traspasa la bandeja con las preparaciones al agitador. **Antes de comenzar los lavados con Buffer Tris se prepara el anticuerpo secundario.**

<sup>10</sup> 1:500; i.e., por cada 1 µL de anticuerpo se agregan 500 µL de buffer.

<sup>11</sup> Preparar al menos 30 minutos antes de usar.

<sup>12</sup> Debe prepararse aproximadamente después del segundo lavado con Buffer, ya que debe utilizarse casi inmediatamente; si se prepara antes debe ser guardado en oscuridad.

## Capítulo 7: Bibliografía

Agua destilada II	5'
Agua destilada III	5'

### **Deshidratación:**

Agua destilada (solo si no se hace contraste)	5'
Alcohol 50	5'
Alcohol 70	5'
Alcohol 80	5'
Alcohol 95 I	5'
Alcohol 95 II	5'
Alcohol 100 I	5'
Alcohol 100 II	5'
Alcohol 100 III	5'
Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	5'

### **Montar con Entellán**

## **Protocolo Caspasa 3**

### **Día 1**

### **Desparafinación:**

Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	5'
Alcohol 100 I	5'
Alcohol 100 II	5'
Alcohol 100 III	5'
Alcohol 95 I	5'
Alcohol 95 II	5'
Alcohol 80	5'
Alcohol 70 con $\text{Li}_2\text{CO}_3$	5'
Alcohol 70	5'
Agua destilada I	5'
Agua destilada I	5'
Tris buffer	5'

**Recuperación Antigénica:**

Buffer tris (T° ambiente)	5'
Microondas	3'
<b>Vaporera (Recuperación antigénica Tris-EDTA)</b>	30'
Enfriamiento de preparaciones en agitador	20'
Agua destilada I(en agitador)	10'
Agua destilada II (en agitador)	10'
Agua destilada III (en agitador)	10'

**Bloqueo Peroxidasa Endógena:**

* <b>Peróxido de hidrogeno</b> (2% en metanol) (en agitador)	30'
Agua destilada I (en agitador)	5'

<b>TRASLADAR LAS PREPARACIONES A LA BANDEJA Y MARCARLAS CON LÁPIZ HIDÓFOBO</b>	
<b>Incubación (en agitador)</b>	
Tris buffer I (T° ambiente)	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Suero de cabra 2% en Tris buffer (200 µL/porta)	30'
Anticuerpo primario (4 ° C)(200 µL/porta) <b>Cleaved Caspasa-3 (rabbit polyclonal) 1:200 en Buffer Tris</b>	<b>Over night</b>

**Día 2<sup>13</sup>**

Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Anticuerpo secundario anti-conejo hecho en cabra 1:500 <sup>14</sup>	1h
Tris buffer I	5'

<sup>13</sup> Al comenzar el día 2 de trabajo, se traspa la bandeja con las preparaciones al agitador. **Antes de comenzar los lavados con Buffer Tris se prepara el anticuerpo secundario.**

<sup>14</sup> 1:500; i.e., por cada 1 µL de anticuerpo se agregan 500 µL de buffer.

Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
<b>*Complejo ABC</b> (200 µL/porta) <sup>15</sup>	90'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
<b>*Diaminobencidina</b> (200 µL/porta) <sup>16</sup>	10'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
<b>TRANSFERIR LAS PREPARACIONES AL CANASTILLO</b>	

**Tinción (Opcional):**

Agua destilada I	5'
Agua destilada II	5'
Hematoxilina	10''
Agua corriente	10'
Agua destilada I	Enjuague rápido
Agua destilada II	5'
Agua destilada III	5'

**Deshidratación:**

Agua destilada (solo si no se hace contraste)	5'
Alcohol 50	5'
Alcohol 70	5'
Alcohol 80	5'
Alcohol 95 I	5'
Alcohol 95 II	5'
Alcohol 100 I	5'
Alcohol 100 II	5'
Alcohol 100 III	5'
Xilol I	5'
Xilol II	5'
Xilol III	5'

**Montar con Entellán**

<sup>15</sup> Preparar al menos 30 minutos antes de usar.

<sup>16</sup> Debe prepararse aproximadamente después del segundo lavado con Buffer, ya que debe utilizarse casi inmediatamente; si se prepara antes deber ser guardado en oscuridad.