

**Universidad de Valparaíso
Facultad de Medicina
Tecnología Médica
Casa central
Mención Morfofisiopatología y Citodiagnóstico**

Proyecto de Seminario de Grado

**“Análisis citológico comparativo del efecto de Scaffold
microestructurado versus sin microestructura a distintos
tiempos de cultivo y diferenciación”**

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”

Datos del autor

Camila Ivonne Madariaga Alfaro

Profesor Guía

Donald Irving Brown González

Profesor Co-Guía

Cristian Andrés Acevedo Gutiérrez

i. Resumen

En los últimos años se ha expandido el estudio del tejido muscular esquelético vinculado a la ingeniería de tejidos. Esto debido a que presenta una potencial alternativa de solución para el reemplazo de tejidos, por daño o defecto de los músculos y de órganos en general. No obstante, existe otra rama menos estudiada debido a los retos técnicos que presenta, y es la posibilidad de usar esta tecnología de tejidos para crear carne *in vitro*. En este estudio se utilizó la rama de la ingeniería de tejidos que comprende scaffolds con una estructura tridimensional específica cultivada con células mioblastos de la línea celular C2C12 en un medio favorable de nutrientes, y factores de crecimiento y diferenciación determinado. Para estudiar el efecto de la estructura se usó un scaffold de microestructura superficial acanalada, y otro scaffold sin estructura definida o de estructura lisa. Los scaffolds tuvieron 0, 7, 14 y 21 días de cultivo celular para discriminar los cambios ocurridos durante el proceso de diferenciación y determinar el momento óptimo de maduración muscular de las células. Se procesaron los scaffolds con técnica histológica e inmunohistoquímica para realizar un conteo celular y H-Score de los marcadores PCNA, desmina, miogenina y MYH. Con esto se buscó una alternativa a la producción de proteína animal como solución a los problemas medioambientales de la industria ganadera, la escasez de recursos naturales, el maltrato animal y las enfermedades transmitidas por el consumo de carne animal. Los resultados muestran que los scaffolds utilizados permiten la viabilidad y el crecimiento celular, no así la diferenciación musculoesquelética. El scaffold microestructurado resultó ser la matriz óptima para la vitalidad, proliferación y asociación celular, y el scaffold liso como el óptimo para diferenciación celular, siendo el día 7 el de mejores resultados en general. No obstante, se evidenció una escasa diferenciación y adhesión celular que puede estar relacionado a la metodología de cultivo de los scaffolds, las propiedades de los materiales utilizados, entre otros.

ii. Palabras Claves

Scaffold, Ingeniería Tisular, Diferenciación celular, Técnica Histológica, Inmunohistoquímica, Músculo esquelético, Mioblastos, Células C2C12.

iii. Abreviaciones

MRF (factores reguladores de la miogénesis), EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida), PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación), MEC (matriz extracelular), MYH (miosina cadena pesada)

iv. Agradecimientos

Para comenzar quiero agradecer al proyecto FONDECYT 1160311, por su apoyo en financiamiento para la realización de este estudio.

A mi profesor Guía Donald Brown y co-Guía Cristian Acevedo, por su paciencia, apoyo y guía durante este tiempo, por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto y las herramientas para desarrollarme como profesional en el área de la investigación.

A la TM. Karina Pino, por ser una guía y apoyo fundamental en el desarrollo de mi trabajo en laboratorio.

A mi compañera Dragica Bezbek, por su ayuda y compañía durante la mención y en especial en este proyecto.

A mis amigos de la universidad, en especial de mi generación, por darme siempre aliento y compañía en los días felices y en los días difíciles.

Y finalmente, pero aún más importante, a mi familia y en especial a mis padres, un sincero gracias por haberme criado y dado las herramientas para ser siempre mejor, por confiar en mí, guiarme, cuidarme y quererme por sobre todas las cosas, sin su apoyo nada de esto habría sido posible.

Índice

1. Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Músculo esquelético	1
1.1.1 Diferenciación celular	3
1.2 Ingeniería tisular	5
1.2.1 Scaffold	7
1.2.2 Línea celular C2C12.....	9
2. Capítulo 2: Objetivos	11
2.1 Objetivo General.....	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. Capítulo 3: Materiales y métodos	12
3.1 Muestra	12
3.2 Criterios de Inclusión y Exclusión.....	13
3.3 Procesamiento	14
3.4 Tinción	15
3.5 Inmunohistoquímica	15
3.6 Descripción y Recuento celular	16
Variables Consideradas.....	16
3.6.1 Estructura del Scaffold.....	16
3.6.2 Tiempo de Cultivo Celular.....	16
3.6.3 Viabilidad Celular	17
3.6.3.1 Células Viables.....	17
3.6.3.2 Células Picnóticas	17
3.6.3.3 Células en Cariorrexis.....	17
3.6.4 Asociación Celular	18
3.6.4.1 Grupos Redondos.....	18
3.6.4.2 Grupos en Parche.....	18
3.6.5 Proliferación.....	19
3.6.6 Diferenciación celular	19

3.7	H-Score	20
3.8	Análisis estadístico	20
4.	Capítulo 4: Resultados	21
4.1.	Descripción de la Viabilidad.....	21
4.1.1	Proliferación celular.....	24
4.2	Grupos Celulares.....	26
4.2.1	Determinación de perímetros.....	27
4.3	H-Score	28
4.4	Análisis estadístico	30
5.	Capítulo 5: Discusión.....	31
5.1	Descripción de la Viabilidad.....	32
5.1.1	Proliferación celular.	33
5.2	Grupos Celulares.....	33
5.3	Marcadores de Diferenciación celular musculoesquelética: H-Score.....	35
	Capítulo 6: Conclusión.....	37
	Conclusiones experimentales.....	37
	Bibliografía.....	38
	ANEXO A	41
	Fotomicrofotografías	41
	ANEXO B	50
	Protocolos del Laboratorio de Biología de la Reproducción y Del Desarrollo.	51

Capítulo 1: Introducción

1.1 Músculo esquelético

El sistema motor de los organismos del reino animal, en específico del ser humano, abarca tres sistemas anatómicos interrelacionados: el sistema esquelético, el sistema nervioso y el sistema muscular. Éste último, que deriva del mesodermo, aporta la potencia para mover las palancas óseas(1).

La formación del músculo esquelético comienza con los mioblastos. Éstos se describen como células fusiformes mono nucleadas provenientes de células mesenquimales, que progresivamente se agrupan durante el desarrollo embrionario, alineándose extremo con extremo varios cientos y se fusionan entre sí para formar un sincitio plurinucleado llamado miotubo, adquiriendo así, las características morfo funcionales de las células musculares(2).

El músculo esquelético está formado por haces de células cilíndricas largas y alineadas, por lo que reciben el nombre de “fibras musculares”. Estas células son multinucleadas, con sus múltiples núcleos situados en la periferia justo bajo la membrana celular, y presentan estriaciones transversales claras y oscuras alternadas a lo largo de la fibra. Estas estriaciones se deben a la disposición de las proteínas miofibrilares contráctiles que se repiten en forma regular, los miofilamentos(2).

El músculo está constituido en su totalidad por un conjunto de fascículos recubiertos por tejido conectivo denso irregular y colagenoso conocido como epimisio. Cada fascículo está, a su vez, recubierto por otro tejido conectivo denominado perimisio, que contiene en su interior un conjunto de fibras musculares. Las fibras están rodeadas de un endomisio que se compone de la membrana basal celular y fibras reticulares finas(2).

La contracción del músculo esquelético está sujeta al control voluntario. Esta contracción es realizada por la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico y se efectúa por la unidad funcional del músculo estriado denominado sarcómero. Este le da al músculo estriado la apariencia de bandeo claro y oscuro intercalado. Las bandas oscuras, denominadas bandas A, están compuestas principalmente por filamentos de actina y miosina intercalados, separadas por otras proteínas estructurales. Los filamentos de miosina se alinean formando en el medio una banda clara denominada banda H (sólo con las colas de las miosinas) dividida

por una línea M (unión de las colas de miosina de cada hemisferio del sarcómero). Las bandas claras denominadas bandas I, están compuestas principalmente por actina, y se dividen por una línea central llamada Línea Z que delimitan al sarcómero, dejándolo conformado por dos medias bandas I y una banda A(2).

Entre las fibras musculares, y el endomisio se encuentran las “células satélites”, específicamente en las depresiones de las células musculares compartiendo su lámina externa. Las células satélites son de tamaño pequeño, uninucleadas y tienen una red de cromatina más densa y gruesa que la de la fibra muscular(2). Las propiedades regenerativas, el potencial de proliferación y de diferenciación que reside en estas células son la clave de su utilización en la ingeniería de tejido muscular(3).

La incidencia de células satélites en el músculo es baja, entre un 1 - 5% de la población celular del tejido muscular, y depende de la edad y la composición muscular(4). Generalmente las células satélites se encuentran en estado quiescente de no división y ante la necesidad de regeneración se dividen asimétricamente en mioblastos auto-renovados y miofibras(4).

En los últimos años se ha expandido el estudio del tejido muscular esquelético vinculado a la ingeniería de tejidos. Esto debido a que presenta una potencial alternativa de solución para el reemplazo de tejidos, por daño o defecto de los músculos y de órganos en general. No obstante, existe otra rama menos estudiada debido a los retos técnicos que presenta, y es la posibilidad de usar esta tecnología de tejidos para crear carne *in vitro* que podría dar solución a problemas en el ámbito de la salud y el medio ambiente(5).

1.1.1 Diferenciación celular

El desarrollo miogénico comienza desde la primera semana embrionaria en los mamíferos. Durante el desarrollo embrionario la formación del tejido muscular comienza con mioblastos mononucleados de capacidad proliferativa limitada, luego la fusión de los mioblastos en miotubo multinucleado, el cual madura en una miofibra no proliferativa. En el período postnatal, aumenta el número de miofibras y el número de núcleos por miofibra, hasta la instancia en que el tejido requiera reparación o regeneración en que las células satélites son las responsables de generar nuevas miofibras(4).

Todos los tejidos requieren de un soporte físico y químico para el crecimiento celular, denominado matriz extracelular (MEC)(6). La MEC contiene un número de componentes que pueden influenciar el comportamiento y regulación de las células musculares progenitoras, siendo así una fuente de factores de crecimiento, proliferación y diferenciación que actúan en la activación de las células, o en su inhibición(7).

Este sistema requiere de un medio de cultivo que proporcione nutrientes, que de soporte y promuevan el crecimiento celular. Además, estar hecho de componentes asequibles, comestibles y disponibles en grandes cantidades, y contener elementos como proteínas, factores de adhesión, vitaminas, hormonas y trazas minerales, entre otros. La estimulación con moléculas bioactivas influye en la regulación fenotípica celular, la expresión de proteínas endógenas, la acumulación de proteínas y la actividad metabólica(4).

Luego de una semana después de un trauma severo nuevos miotubos ya están formados, y en 28 días luego del trauma, la regeneración muscular es casi completa. Una red transcripcional controla la progresión de las células madres embrionarias y adultas(7).

Las células progenitoras embrionarias musculares en estado quiescente pueden ser identificadas por la co-expresión de los factores Pax3 y Pax7, y se mantienen como la población de células proliferativas de auto regeneración. Bloquear Pax3 y Pax 7 es requerido para iniciar el compromiso de las células satélites con el programa miogénico, y así activar el MyF-5 y MyoD denominados factores reguladores miogénicos o MRFs(7).

Los factores reguladores miogénicos inducen la expresión de otras proteínas musculares, tales como la α -actina, miosina cadena pesada o MYH, miosina cadena ligera,

tropomiosina y troponina C e I(8). A través de los MRFs las células progenitoras y quiescentes se vuelven mioblastos activos y comprometidos con el linaje muscular.

Luego de activados los factores Myf-5 y MyoD se promueve la diferenciación muscular final, las células comprometidas en la diferenciación músculo esquelética expresan Myf-5 y Mrf-4, dando lugar rápidamente a las células Desmina (+), cuya diferenciación es regulada por miogenina, MyoD y Mrf-4(7).

Miogenina, desmina y miosina cadena pesada son ampliamente utilizados para la caracterización de células musculares esqueléticas de temprana, intermedia y tardía diferenciación(9). La miogenina es uno de los factores reguladores miogénicos más utilizados. Cuando las células se comprometen con el linaje músculo esquelético y expresan MyoD y Myf-5, se induce la diferenciación celular traducido en la expresión de miogenina siendo este un marcador temprano para la entrada de los mioblastos en la vía de diferenciación, denominándose de carácter intermedio(7).

La desmina es un filamento intermedio del citoesqueleto, se considera también como un marcador temprano, indicando la primera señal de diferenciación musculoesquelética. Finalmente, la MYH es una subunidad de la miosina convencional, está encargada de la función motora de ésta, involucrada así en la contracción y movimiento muscular, MYH se considera un marcador musculo-esquelético tardío(9).

1.2 Ingeniería tisular

La ingeniería de tejidos o ingeniería tisular se define como un grupo de herramientas utilizadas para la creación de implantes con características similares a las fisiológicas, capaces de conducir e inducir la regeneración de un tejido específico(10). La base de la ingeniería de tejidos es la utilización de tres elementos específicos: matriz de soporte, moléculas bioactivas y células. La matriz de soporte y las moléculas bioactivas actúan como sistema de distribución de nutrientes e inducen la proliferación, diferenciación y actividad metabólica celular. Las células implantadas en la matriz son para la formación del tejido, ya que poseen capacidad de división indefinida y diferenciación(11).

Existen distintos tipos de matrices utilizadas en la ingeniería de tejidos, no obstante, todas deben cumplir idealmente con ciertas características en porosidad y diámetro de poro adecuado, biodegradabilidad, propiedades mecánicas y reproducibilidad(12). Específicamente en la ingeniería de tejidos musculo-esquelética son principalmente utilizados dos sistemas en 3D: 1) sistemas de gel, ya sea colágeno o fibrina(13), y 2) el sistema de scaffolds (mallas porosas de fibras tejidas), como lo son las esponjas de colágeno o los polímeros biodegradables(12)

La ingeniería de tejidos abarca una amplia variedad de aplicaciones clínicas, como la fabricación de fármacos, modelos *in situ* de fisiología de un órgano, matrices de regeneración celular ante injuria o defectos de órganos, entre otros(14). Otra posible aplicación ampliamente impulsada actualmente es el cultivo de carne animal(12).

El cambio de enfoque de la ingeniería de tejidos desde la clínica a la creación de un producto alimenticio alternativo nace a partir de las preocupaciones expresadas por los consumidores y la comunidad científica. Estas soportan la relevancia de este estudio, dar una solución a problemáticas actuales asociadas a las consecuencias del consumo de carne animal y su producción(15)(16). Tales problemáticas abarcan: enfermedades relacionadas con la nutrición, aumento de patógenos resistentes a antibióticos, el aumento previsto de la demanda de carne que se expresa en escasez de recursos, el maltrato animal y el impacto ambiental generado por la cría y manejo de ganado en altos volúmenes(5)(17)(18).

El sistema de producción de carne *in vitro* es más amigable con el medioambiente y eficiente en usos de energías, que el sistema de granjas tradicional. Este sistema reduce los peligros medioambientales, el sufrimiento animal y asegura una producción sostenible de carne *in vitro*, químicamente segura y libre de enfermedades por las condiciones controladas y manipuladas propias del sistema. Finalmente cabe mencionar que la carne *in vitro* puede ser diseñada para ser más saludable y funcional que la tradicional manipulando la composición del cultivo y el contenido de grasa del tejido(17).

1.2.1 Scaffold

Un scaffold o en español “andamio” es una matriz tridimensional porosa que tiene como función principal soportar la adhesión, proliferación, migración celular, diferenciación y maduración en un fenotipo específico(10). Si bien la ingeniería de tejidos y en específico, el área del tejido musculoesquelético utiliza principalmente los sistemas de matrices (en gel o scaffolds), en la literatura existen variadas formas de producir músculo *in vitro*. Por ejemplo, la utilización de matrices sintéticas, la mezcla de células satélites con fibroblastos en suspensión para crear una matriz extracelular, la utilización de tejidos a-celulares como matriz de soporte, entre otros(5). Para que un scaffold sea una buena alternativa de uso debe cumplir con ciertos requerimientos.

De acuerdo con las demandas estructurales y metabólicas del tejido, el scaffold debe proporcionar una alta superficie para la óptima interacción entre la matriz y las células, así como para la regeneración de la matriz extracelular. En el caso del músculo esquelético, el crecimiento celular y la diferenciación dependen de un entorno estructurado que las células necesitan para interactuar con la matriz, respaldando así la capacidad de migración celular y permitiendo la difusión de factores de crecimiento y nutrición(3).

Estudios afirman que el músculo esquelético requiere alineamiento celular uniforme y una arquitectura reproducible(12). El tejido muscular esquelético consiste en largas fibras alineadas de forma paralela, por lo que un aspecto importante es la habilidad del scaffold para promover esta organización estructural(19). Diversos autores afirman que los miofibros se forman en una orientación paralela en los scaffolds de acuerdo con la estructura del poro (19)(20)(21). La microestructura modelada en la matriz confiere señales topográficas para el crecimiento y orientación de las células(21).

Las características básicas del tejido muscular esquelético determinan la importancia de un modelo tridimensional acanalado. Este favorece el alineamiento celular, la adhesión y el asentamiento de las células en el scaffold(22), promoviendo a través de esta base estructural, la supervivencia, proliferación y diferenciación celular.

En la ingeniería de tejidos, las propiedades reológicas y de transporte molecular en los materiales del scaffold son determinantes claves de la viabilidad celular, la migración y la diferenciación celular (19). Propiedades mecánicas como la rigidez y la elasticidad son críticos, debido a que un apropiado estímulo mecánico activa vías mecanotransductoras relacionadas con el desarrollo del músculo(12). Scaffolds basados en esponjas porosas de polímeros naturales y copolímeros (como la gelatina y el quitosano) son ampliamente utilizados para aplicaciones de la ingeniería de tejidos.

El scaffold, además, debe ser reabsorbible y biocompatible; es decir, requiere que los productos de degradación asociados posean baja o nula citotoxicidad y, generar mínimas reacciones inmunes(10), siendo así declarados “comestibles” los materiales utilizados. A lo mencionado se le añade que la selección de los materiales para la creación del scaffold, debe ser de naturaleza no mamífera cuya importancia radica en que no sean obtenidos a través del maltrato animal. Ejemplos de materiales generalmente usados en el diseño de scaffolds sin intervención de mamíferos son: Alginato, quitosano, gelatina de pez, agar, agarosa, etc(23). Esta matriz ideal es complementada con la línea celular idónea y las moléculas bioactivas que induzcan diferenciación de las células musculares esqueléticas como la línea celular C2C12(3).

1.2.2 Línea celular C2C12

Las células C2C12 son mioblastos residuales que se escapan del desarrollo muscular esquelético y persisten en el músculo adulto como células satélites(8).

Específicamente las células C2C12 son subclones de mioblastos C2 en estado quiescente, provenientes del murino, un roedor perteneciente a la familia *Muridae* que incluyen las especies más comúnmente usadas en laboratorios en especial para músculo esquelético(24).

La línea C2C12 son células que permiten el análisis experimental del proceso de diferenciación del músculo esquelético desde su fase totipotencial a su madurez final. Para esto utilizan ciertos MRF (factores reguladores miogénicos) que se expresan en células comprometidas con el linaje miogénico y aparecen o desaparecen alternadamente durante su diferenciación. Entre estos factores se encuentran principalmente el Myo-D, Myf-5, Mrf-4 y la Miogenina, que son los mejores caracterizadores y se vuelven activos en un espacio-tiempo correlacionado(8).

El proceso de división celular comprende un período de diferenciación musculo-esquelética que se divide en 3 etapas: condición indiferenciada, diferenciación intermedia y diferenciación final. La primera comprende desde el día 0 al día 1-2 de implantación y cultivo, entendiéndose como el día 0 de diferenciación donde hay células indiferenciadas de tamaño no mayor a 80 μm , planas no confluentes, en forma de estrella o fusada. En la segunda etapa de diferenciación intermedia se considera el período de 3 a 5 días de diferenciación en donde las células tienden a adquirir una forma principalmente alargada y se observan patrones iniciales de confluencia. La tercera etapa de diferenciación es a partir del día 5 donde aparecen sincitios alargados de 100 a 600 μm , con un grosor de 30-50 μm y más de 20 núcleos localizados centralmente o distribuidos a lo largo de la célula. Desde la etapa anterior se considera todo cambio de alta diferenciación o diferenciación final(8).

En este estudio (en el marco del proyecto FONDECYT 1160311) se realizó una comparación entre dos tipos de scaffolds a distintos días de diferenciación. La conformación de los scaffolds recoge características primordiales de las estructuras o matrices utilizadas en la ingeniería de tejidos abarcando desde el origen hasta las propiedades físicas y reológicas de los materiales. Las muestras obtenidas de los scaffolds en estudio fueron procesadas con

distintas técnicas de tejidos histológicos y observadas en microscopio óptico de campo claro para su evaluación mediante distintos métodos. Los resultados esperados teóricamente comprenden un scaffold con una estructura definida y la mayor cantidad de días de diferenciación como el mejor sistema de scaffold para la adhesión, proliferación y diferenciación celular, sin embargo, en los resultados expuestos en este estudio se evidencia un scaffold de estructura definida (denominado scaffold microestructurado) como el más apto para la asociación, proliferación y vitalidad celular, y un scaffold sin estructura definida (denominado scaffold liso) como el más apto para diferenciación celular. Finalmente, el tiempo óptimo para las situaciones antes mencionadas se encuentra en la primera semana de diferenciación.

Capítulo 2: Objetivos

2.1 Objetivo General

- Evaluar los scaffold liso y microestructurado para determinar el scaffold adecuado en términos de viabilidad, proliferación y diferenciación de la línea celular C2C12, según su estructura y cantidad de días de cultivo

2.2 Objetivos Específicos

- Describir la viabilidad de las células contenidas en los scaffolds lisos y con microestructura a distintos días de diferenciación.
- Determinar el perímetro de los grupos celulares encontrados en los scaffolds lisos y con microestructura a distintos días de diferenciación.
- Describir la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos: PCNA, Desmina, Miogenina y Miosina de cadena pesada, en células de la línea C2C12 en los scaffolds lisos y con microestructura a distintos días de diferenciación.
- Comparar los scaffolds lisos y con microestructura en distintos días de diferenciación a través de un análisis estadístico.

Capítulo 3: Materiales y métodos

3.1 Muestra

El tamaño de la muestra fue de 24 muestras de scaffolds, correspondientes a 8 grupos de estudio por triplicado.

→ Tres muestras con 0 días de diferenciación y estructura lisa, sembradas con 1.000.000 de células.

→ Tres muestras con 0 días de diferenciación y microestructura, sembradas con 1.000.000 de células.

→ Tres muestras con 7 días de diferenciación y estructura lisa, sembradas con 1.000.000 de células.

→ Tres muestras con 7 días de diferenciación y microestructura, sembradas con 1.000.000 de células.

→ Tres muestras con 14 días de diferenciación y estructura lisa, sembradas con 1.000.000 de células.

→ Tres muestras con 14 días de diferenciación y microestructura, sembradas con 1.000.000 de células.

→ Tres muestras con 21 días de diferenciación y estructura lisa, sembradas con 1.000.000 de células.

→ Tres muestras con 21 días de diferenciación y microestructura, sembradas con 1.000.000 de células.

3.2 Criterios de Inclusión y Exclusión

3.2.2 Criterios de Inclusión: Las 24 muestras entregadas para el experimento fueron utilizadas en el proyecto.

3.2.3 Criterios de Exclusión: La ausencia de células en el scaffold, mala conservación de la estructura y mala fijación de la muestra.

3.3 Procesamiento

Los Scaffolds fueron confeccionados en el “*Centro de Biotecnología de la Universidad Técnica Federico Santa María*”. Los materiales utilizados fueron: Gelatina de Salmón, y Quitosano, posteriormente se incorporaron agentes gelificantes (Agarosa) y EDC/NHS (entrecruzante químico) para formar hidrogeles estables. Finalmente, los hidrogeles fueron congelados y liofilizados para producir dos tipos de armazones porosas, unos con estructura 3D “lisa” o sin forma definida y otros con estructura 3D de superficie acanalada o “microestructurado”.

Una vez obtenidos los scaffolds con y sin microestructura se les incubaron células mioblastos de la línea C2C12, durante 0, 7, 14 y 21 días, entendiéndose el primero como el scaffold con menor tiempo de diferenciación y el último como el scaffold con mayor tiempo de diferenciación muscular esquelética. Una vez incubados los polímeros con el sustrato de diferenciación específico para las C2C12, se extrajo una punción de figura circular y se fijaron en Bouin acuoso por 24 horas. Posteriormente 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 procesadas con técnica histológica e inmunohistoquímica para evidenciar los cambios morfológicos y de diferenciación esquelética ocurrida.

Los scaffolds contenidos en placas de cultivo multipocillos fueron lavados en tres baños de 30 minutos de etanol al 70% y fueron incluidos en Histogel (ThermoFisher, Kalamazoo, USA), para entregar soporte y evitar contaminación con restos de muestras en el procesador de tejidos. Una vez enfriado el Histogel se colocaron las muestras en casetes de procesamiento histológico y luego fueron lavadas en etanol al 70%, para ser posteriormente colocadas en el procesador de tejidos (Leica TP1020, Heidelberg, Alemania) para su deshidratación e impregnación. En el procesador las muestras fueron pasadas por una serie de alcoholes ascendentes desde el etanol al 80% hasta el etanol al 95%, mezcla etanol-butano y luego 3 pasos por butanol, finalizando con 3 pasos de impregnación por Paraplast Plus (Leica, Heidelberg, Alemania) a 60°C (Anexo B1). Luego las muestras se colocaron en el centro de inclusión (Leica EG1150H, Heidelberg, Alemania) y fueron incluidas para obtener el taco de parafina. Los tacos de parafina fueron tallados y, utilizando un micrótopo rotatorio (Leica RM2155, Heidelberg, Alemania), cada scaffold fue cortado

totalmente en cortes seriados obteniendo cintas de 15 cortes de 5 μm . De cada cinta se montó el primer corte utilizando un baño térmico de flotación a 40°C, y albúmina de Mayer como medio de adhesión. En el caso de los cortes para inmunohistoquímica, el medio de adhesión utilizado fue Poly-l-lysine para evitar el desprendimiento de los cortes durante el proceso. Finalmente se dejaron secar las placas durante 12 horas en estufa a 40°C.

3.4 Tinción

Para la observación histológica se utilizó la técnica del Tricrómico de Arteta (Anexo B2), en el cual las muestras fueron: Desparafinadas e hidratadas en una batería que comprende tres baños de xilol, tres baños de etanol absoluto y luego baños de etanol de concentraciones decrecientes (95°-80°-70°) hasta llegar al agua destilada. Los cortes fueron teñidos 75 segundos en Hematoxilina de Harris, lavados por 10 minutos en agua corriente y luego por 5 minutos en agua destilada, y teñidos 30 minutos en Eritrosina-Naranja G al 0,5%. Luego de lavar en agua destilada 5 minutos, se trataron 10 minutos con ácido fosfotúngstico al 0,5%, lavados por 5 minutos en agua destilada, y teñidos 75 segundos con Azul de Anilina al 1%. Las preparaciones fueron deshidratadas en tres alcoholes de 95° (1 minuto cada uno) y en tres alcoholes de 100° (5 minutos cada uno). Finalmente se aclararon en tres baños de xilol (5 minutos cada uno) y se montaron definitivamente con cubreobjetos, utilizando como medio de adhesión Entellán (Merck, Darmstadt, Alemania).

3.5 Inmunohistoquímica

Los anticuerpos utilizados fueron PCNA, Desmina, Miogenina y Miosina de cadena pesada. En la técnica de inmunohistoquímica se utilizaron distintos protocolos de acuerdo al anticuerpo empleado (Anexo B3). Las preparaciones desparafinadas e hidratadas fueron sometidas a la recuperación antigénica en buffer Tris EDTA en vaporera marca Oster a 90°C durante 30 min. Luego el bloqueo de la peroxidasa endógena con H₂O₂ y metanol, seguido de tres lavados en buffer Tris. Posteriormente la incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, lavados en Tris y la incubación con el anticuerpo secundario. Se utilizó Complejo ABC para la amplificación de señal y el revelado con DAB que da reacción cromógena de color café, seguido de un contraste nuclear suave con Hematoxilina de Harris. Finalmente, los cortes fueron deshidratados, aclarados en xilol y cubiertos con cubreobjetos utilizando Entellán como medio de adhesión.

3.6 Descripción y Recuento celular

Se describió la morfología de células estableciendo los criterios de: células viables (células alargadas uni/multinucleadas, células gigantes multinucleadas, células en mitosis y células iniciales), células no viables, que comprende células en picnosis (núcleo hipercromático, cromatina condensada y pequeño) y células en cariorrexis (núcleo segmentado de cromatina condensada); grupos redondos y grupos “parche” (grupos de células sin forma esférica). Posteriormente se realizó el conteo de cada célula y grupo clasificándolos según los criterios antes mencionados, todo esto en microscopio óptico de campo claro (Leica 2500, Heidelberg, Alemania).

Variables Consideradas

3.6.1 Estructura del Scaffold

Arquitectura tridimensional que tienen los scaffolds para favorecer la adhesión, proliferación y diferenciación celular(12). Los scaffolds utilizados tienen una composición idéntica de Quitosano, agarosa, gelatina y EDC/NHS, pero se diferencian en la morfología con referencia a la orientación de las fibras en la superficie de la membrana, siendo un scaffold con estructura lisa (o no definida) y otro con microestructura (o acanalado). Esta variable es de tipo cualitativa nominal dicotómica.

3.6.2 Tiempo de Cultivo Celular

Días en los que las células C2C12 fueron sometidas al proceso de diferenciación(22). Los scaffolds tuvieron distintos días de cultivo para su diferenciación partiendo desde 0 días (día en que se cambia al medio de cultivo con factores específicos de diferenciación), luego 7 días, 14 días y finalmente 21 días. Esta variable es de tipo cuantitativa discreta.

3.6.3 Viabilidad Celular

Medición de la proporción de células vivas en relación con las muertas luego del proceso de diferenciación. Respecto de esta variable se obtuvieron los siguientes datos:

3.6.3.1 Células Viables:

Se entienden como células viables aquellas que presenten un núcleo con cromatina homogénea y continuidad de la carioteca, sin signos de muerte celular, además de un citoplasma íntegro. En este grupo encontramos:

- **Alargadas Uninucleadas (AU):** Células con signos de viabilidad, de citoplasma alargado o cilíndrico, con un núcleo de mayor diámetro en comparación con mioblastos. Esta variable de tipo cuantitativa discreta puede tomar valores de 0 a infinito, y fue medida a través de la observación directa al microscopio óptico de campo claro.
- **Alargadas Multinucleadas (AM):** Células con signos de viabilidad, de citoplasma alargado o cilíndrico, con 2 o más núcleos de mayor diámetro en comparación con mioblastos. Esta variable de tipo cuantitativa discreta puede tomar valores de 0 a infinito y fue medida a través de la observación directa al microscopio óptico de campo claro.
- **Gigantes Multinucleadas (GM):** Células con signos de viabilidad de forma esférica con 2 o más núcleos. Esta variable de tipo cuantitativa discreta puede tomar valores de 0 a infinito y fue medida a través de la observación directa al microscopio óptico de campo claro.
- **Células en Mitosis (M):** Presencia de figuras mitóticas (cromosomas condensados según las etapas de la mitosis). Esta variable es de tipo cuantitativa discreta, puede tomar valores de 0 a infinito y que fue medida a través de la observación directa al microscopio óptico de campo claro.

3.6.3.2 Células Picnóticas (P):

Células con retracción de núcleo, condensación de la cromatina e hipercromasia, signo de muerte celular(25). Esta variable de tipo cuantitativa discreta puede tomar valores de 0 a infinito y fue medida a través de la observación directa al microscopio óptico de campo claro.

3.6.3.3 Células en Cariorrexis (C):

Células con fragmentación del núcleo en trozos de cromatina condensada, signos de muerte celular(25). Esta variable de tipo cuantitativa discreta puede tomar valores de 0 a infinito y fue medida a través de la observación directa al microscopio óptico de campo claro.

3.6.4 Asociación Celular

Confluencia de las células, necesario para la fusión celular y la diferenciación(22). Se realizó el conteo de los grupos y la medición de su diámetro. Respecto de esta variable se obtuvieron los siguientes datos:

3.6.4.1 Grupos Redondos (GR):

Células agrupadas formando esferas u ovoides. Esta variable es de tipo cuantitativa discreta, puede tomar valores de 0 a infinito y fue medido a través de la observación directa al microscopio óptico de campo claro. Para la medición de su perímetro (variable cuantitativa continua que puede tomar valores de 0 a infinito) se utilizó el programa Image J, versión 1.60 del *National Institute of Health* (NIH) de uso universal.

3.6.4.2 Grupos Parches (GP):

Células agrupadas en paralelo formando “parches” o extendidos de células. Esta variable es de tipo cuantitativa discreta y fue medida a través de la observación directa al microscopio óptico de campo claro. Para la medición de su perímetro (variable cuantitativa continua que puede tomar valores de 0 a infinitivo) se utilizó el programa Image J, versión 1.60 del *National Institute of Health* (NIH) de uso universal.

3.6.5 Proliferación:

Indicadores de división celular. Se evidenció marcador PCNA (antígeno nuclear de células proliferativas). Esta variable es de tipo cualitativa ordinal que puede tener valores entre 0, +1, +2, +3, y fue medida a través de un H-Score(26)(27) utilizando microscopio óptico de campo claro.

3.6.6 Diferenciación celular:

Indicadores de diferenciación musculoesquelético. Se evidenciaron los marcadores Desmina, Miogenina y Miosina de cadena pesada. Esta variable es de tipo cualitativa ordinal que puede tomar valores entre 0, +1, +2 y +3, y fue medida a través del H-Score(26)(27) utilizando microscopio óptico de campo claro.

3.7 H-Score

Los resultados del estudio inmunohistoquímico fueron medidos a través de un método semicuantitativo utilizado para otorgar un puntaje (numérico) en consideración con la intensidad de tinción (o de reacción) de las células. Los valores asignados fueron: 0 entendiéndose como nula reacción o tinción negativa, +1 como intensidad débil, +2 como intensidad intermedia y +3 como intensidad fuerte. Se calculó el porcentaje de células con las distintas marcaciones en cada caso utilizando la siguiente fórmula de H-Score:

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

Los valores obtenidos varían de 0 a 300, otorgando una medición a la intensidad de tinción de células en todo el espesor del scaffold de 0, sin tinción; 1-99, tinción débil, 100-199, tinción moderada, 200-300, tinción fuerte.

3.8 Análisis estadístico

El método estadístico utilizado para este estudio fue el análisis de varianza ANOVA, usando las herramientas estadísticas del software Microsoft Excel para office 365 (Microsoft). Se considera significativo cuando $p < 0,05$.

Capítulo 4: Resultados

4.1. Descripción de la Viabilidad

Con el fin de evaluar en cada scaffold la capacidad de permitir a las células adaptarse, proliferar y diferenciarse, se realizaron diversas pruebas histológicas e inmunohistoquímicas en cada matriz utilizada. Las células fueron incubadas en un scaffold con superficie acanalada cuyas paredes les otorgan abundante espacio a las células para adherirse y desarrollarse. También fueron incubadas células en un scaffold sin microestructura definida o liso el cual genera una trama para la adhesión y desarrollo de las células C2C12 (Figura A1).

Se realizó un conteo celular en donde se observaron células con características morfológicas de vitalidad y muerte celular, a su vez, se realizó una subclasificación en ambas categorías según a su forma y tamaño celular, o según sus signos nucleares (Figura A2). Dentro de las células con características morfológicas de vitalidad encontramos células con rasgos de diferenciación celular y proliferación celular (mitosis). Dentro de las células con características morfológicas de muerte celular encontramos células con núcleo en picnosis y cariorrexis.

Las células clasificadas como viables según características morfológicas de diferenciación se subdividieron en: Células de tamaño no mayor a 80µm, de morfología fusada o estrellada denominadas “células fusadas” (F) (Figura A2B), o redondas denominadas “células redondas” (R) (Figura A2A), con citoplasma eritrosinófilo, conteniendo un núcleo basófilo, de cromatina homogénea, y carioteca íntegra. Estas células fueron consideradas como “células iniciales” debido a que son las características de las células que fueron incubadas al inicio del experimento (mioblastos C2C12) y que difieren de las células con características morfológicas de diferenciación musculoesquelética. Luego, aquellas con características morfológicas que sugieren proceso de diferenciación musculoesquelética (Figuras A3 Y A4), son: las que presentan un citoplasma considerablemente de mayor tamaño tanto en diámetro como en largo con respecto a los mioblastos incubados, a las cuáles denominamos “células alargadas uninucleadas” (AU) cuando constan de 1 núcleo, o “células alargadas multinucleadas” (AM) cuando constan de 2 o más núcleos. Finalmente, aquellas células con citoplasma redondo de tamaño mayor a las células iniciales y multinucleadas (2 o más núcleos) a las cuáles denominamos “células

gigantes” (GM). Por otro lado, tenemos aquellas también clasificadas dentro de las células viables con características de proliferación celular, las cuales presentan figuras mitóticas tales como profase, metafase, anafase y telofase (Figura A5).

Las células clasificadas como no viables poseen características morfológicas de muerte celular, tales como: células picnóticas, cuyo núcleo es hipercromático, compactado, y su cromatina condensada, y células en cariorrexis, con núcleo hipercromático, cromatina condensada de forma irregular y carioteca fragmentada.

Luego del conteo y clasificación de las células de características morfológicas vitales y no vitales, se puede decir que el recuento total de células en los scaffolds fluctúa entre las 7.000 y 17.000 células aproximadamente. Un 62% a 95% del total de células presentaron características de vitalidad celular. En este escenario, encontramos que la mayor cantidad de células vitales se presentó en el scaffold del día 21 con microestructura seguido por los días 7 con microestructura y el día 14 liso, y el menor número de estas se encontró en el scaffold del día 0 microestructurado (Gráfico 1). A pesar de que la cantidad de células viables fue generalmente similar en los scaffold se evidencia la tendencia de aumentar en los scaffolds microestructurados.

En relación a la comparación entre scaffolds microestructurados y de estructura lisa, no hay una diferencia significativa entre los porcentajes de viabilidad de ambos, no obstante, se evidenció una tendencia de aumento a favor de los scaffolds microestructurados, traducida en mayor cantidad de células vitales en los casos del día 7, 14 y 21 (Gráfico 1).

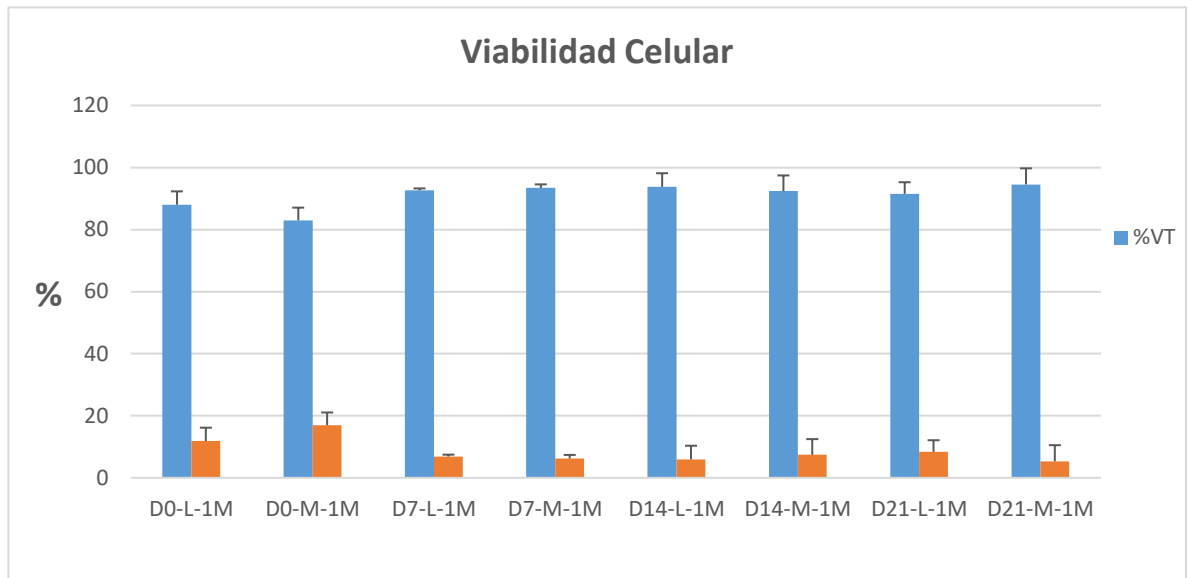


Gráfico 1. Porcentajes de células con características morfológicas de viabilidad (%VT) y de muerte celular (%MCT) en los scaffolds microestructurados (M) y lisos (L) de los días 0, 7, 14 y 21 (D0, D7, D14, D21) de diferenciación, incubadas con 1 millón de células (1M).

Como se mencionó anteriormente, en la subclasificación de las células con características morfológicas de vitalidad encontramos aquellas que además poseían características morfológicas de diferenciación celular. A pesar de que los valores de esta subclasificación no destacan en gran medida en relación con el total de células, se evidenció que los scaffold con mayor número de células con características morfológicas de diferenciación son los del día 7 con y sin microestructura, y aquellos con menor cantidad fueron los del día 0, con y sin microestructura (Gráfico 2), considerando en estos resultados las células alargadas uninucleadas, multinucleadas y las células gigantes.

Finalmente, el scaffold que presentó la mayor cantidad de células alargadas uninucleadas y multinucleadas fue el día 7 con microestructura, luego el de mayor cantidad de células gigantes multinucleadas fue el día 7 liso. Estos resultados se relacionaron posteriormente con el H-score para los diferentes marcadores de diferenciación musculoesquelética.

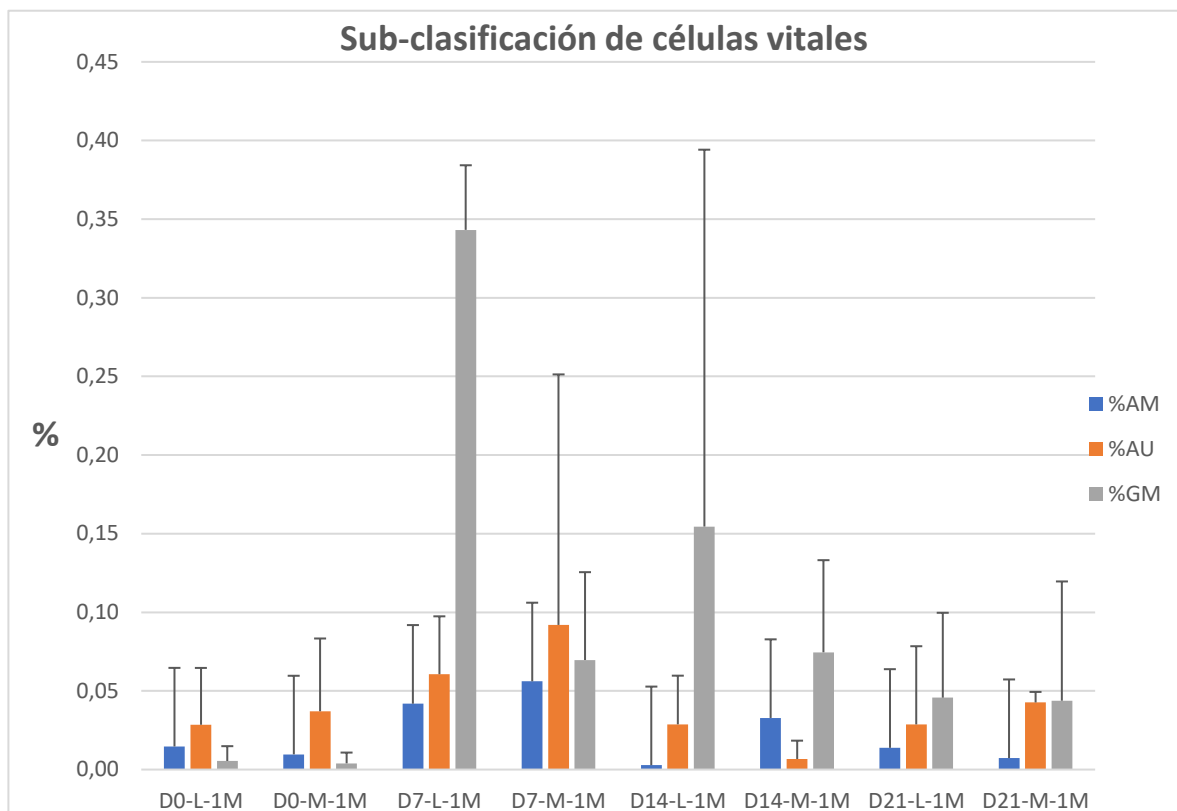


Gráfico 2. Porcentajes de células alargadas multinucleadas (AM), células alargadas uninucleadas (AU) y células gigantes multinucleadas (GM), en relación con el total de células vitales, en los scaffolds microestructurados y lisos de los días 0, 7, 14 y 21 (D0, D7, D14, D21) de diferenciación, incubadas con 1 millón de células (1M).

4.1.1 Proliferación celular

En cuanto a la proliferación celular, morfológicamente se evidenció células con figuras mitóticas que representan estados de la célula en división. El scaffold que presentó mayor proliferación fue el día 7 con microestructura, seguido por el del día 14 sin microestructura (Gráfico 3). El scaffold con menor porcentaje de proliferación fue el día 21 con y sin microestructura, esto quiere decir que, a mayor cantidad de días de diferenciación hubo menor proliferación. Al comparar entre scaffolds con microestructura y sin microestructura, se evidenció una tendencia de aumento en los scaffold lisos. No obstante, la cantidad de estas células no destaca en relación a la cantidad total de células vitales. Posteriormente, se correlacionó con el resultado del H-score para el marcador de proliferación celular PCNA.

En el Gráfico 3 podemos evidenciar que la proliferación alcanza un “*peak*” en el día 7 en el caso de los scaffolds microestructurados desde donde comienza a decrecer a medida que los días aumentan. En los scaffolds lisos, no hay una clara tendencia relación creciente o decreciente entre los scaffolds día 0, 7, 14; prácticamente manteniéndose los valores. Sin embargo, a los 21 días se presentan los valores más bajos en ambos tipos de scaffolds.

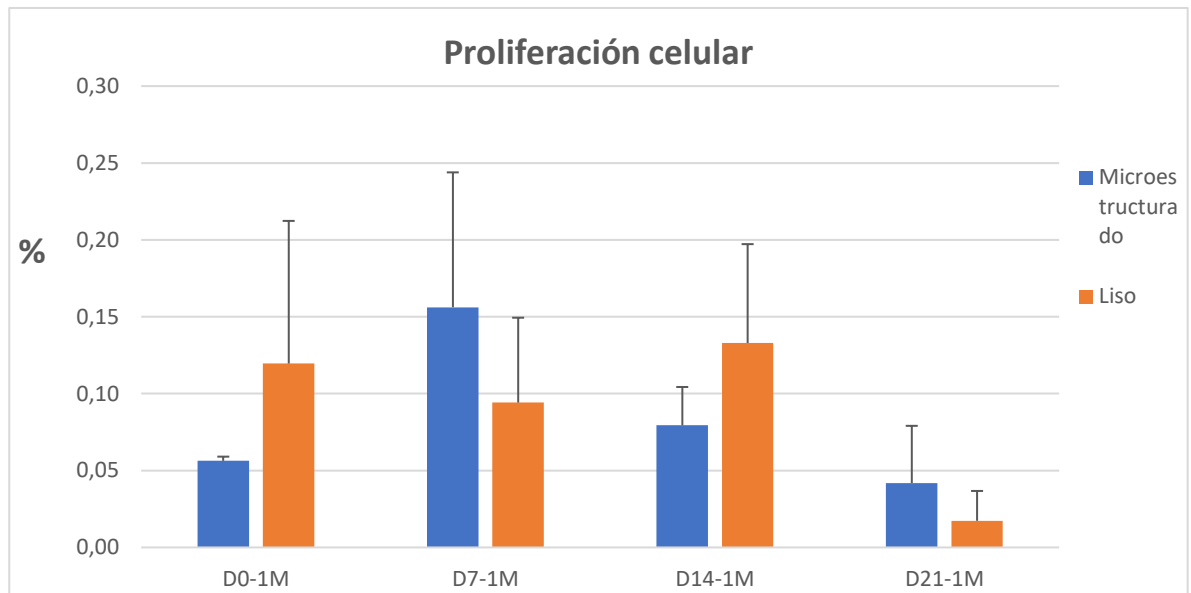


Gráfico 3. Porcentajes de mitosis evidenciadas en los scaffolds microestructurados y lisos en los días 0, 7, 14 y 21 (D0, D7, D14, D21) de diferenciación, incubados con 1 millón de células (1M), en relación con el total de células vitales.

4.2 Grupos Celulares

En los scaffolds las células se encontraron individuales o agrupadas. Las agrupaciones celulares se clasificaron en dos grupos. Primero, aquellas cuya forma es redonda u ovoide, bien delimitada y compactada se les denominó “Grupos Redondos” (GR). En estos grupos, las células se agrupan de forma concéntrica, compactadas, superpuestas, y presentan abundantes células picnóticas hacia el centro del grupo (Figura A6A). El segundo corresponde a agrupaciones con forma alargada sin bordes definidos, donde las células se agruparon de forma paralela y alineada formando un “parche”, por lo que se les denominó “Grupos Parches” (GP) (Figura A6B). Cabe mencionar también que la distribución espacial de las células no es homogénea en el espesor del scaffold, si no que tiende a la periferia.

Existe una tendencia de aumento a favor de los grupos parches en todos los scaffolds. Destaca en el caso de los grupos parches el día 0 con microestructura con la mayor cantidad, y el día 7 con microestructura la menor cantidad. En el caso de los grupos redondos el día 0 con microestructura presenta la mayor cantidad, y el día 21 liso la menor cantidad. Cabe destacar que no existe una tendencia relación creciente o decreciente entre los distintos scaffolds (Gráfico 4). Por otro lado, se evidencia que la mayor cantidad de grupos parches y grupos redondos se presenta en los scaffolds microestructurados.

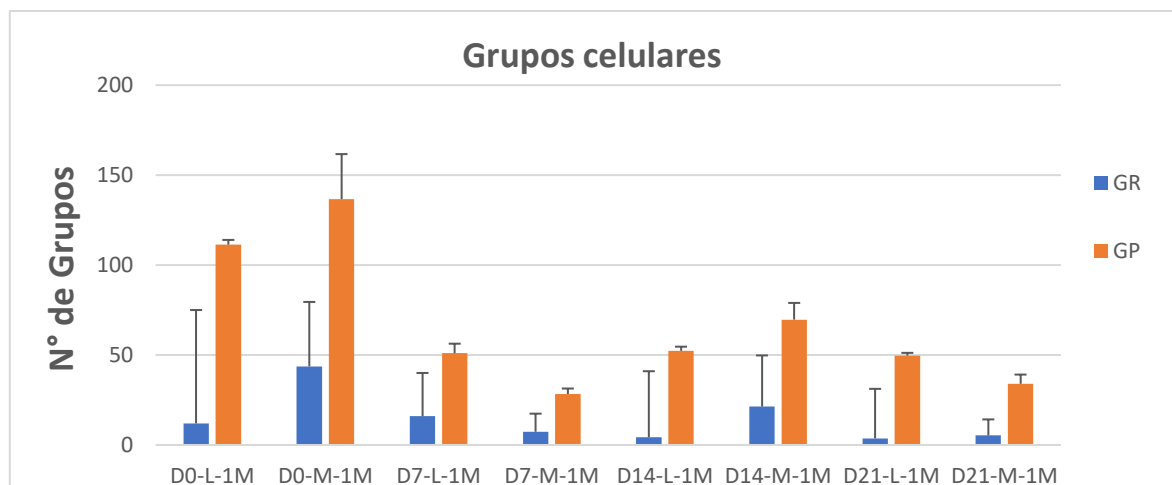


Gráfico 4. Cantidad de Grupos celulares de forma redonda u ovoide (GR), y de grupos de forma alargada o en parche (GP), en los scaffolds con microestructura y lisos en los días 0, 7, 14 y 21 (D0, D7, D14, D21) de diferenciación, incubados con 1 millón de células (1M).

4.2.1 Determinación de perímetros

Se determinó la medición de los perímetros de todos los grupos encontrados en los scaffolds (clasificados según su morfología) para analizar la interacción y agregación celular. En el caso de los grupos parche el scaffold que tuvo mayor perímetro en sus grupos fue el del día 0 tanto el microestructurado como el liso, seguido del scaffold día 21 microestructurado (Gráfico 5). Los menores perímetros en los grupos parches fueron encontrados en el scaffold día 14 sin microestructura o liso. En el caso de los grupos redondos el scaffold que tuvo mayor perímetro en sus grupos fue el del día 21 liso, seguido del día 7 liso; y los menores perímetros en los grupos redondos fueron encontrados en el scaffold del día 7 microestructurado (Gráfico 5)

Se evidenció que los mayores perímetros de grupos en general corresponden a los grupos parches en específico los scaffolds con microestructura (Gráfico 5).

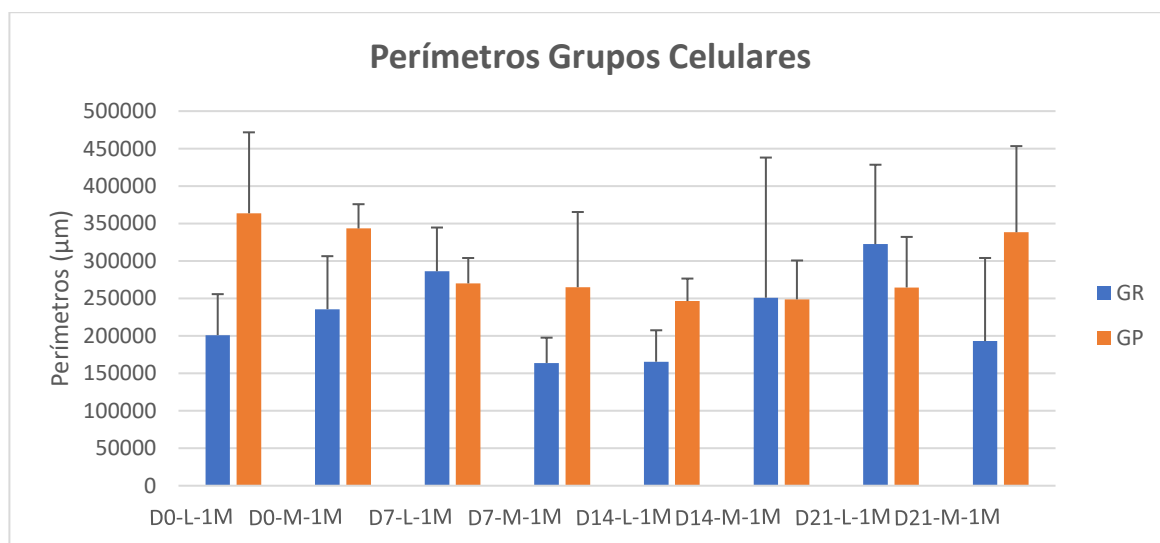


Gráfico 5. Medición de Perímetros de los Grupos Parches (GP) y Grupos Redondos (GR), en los scaffolds con microestructura y lisos de los días 0, 7, 14 y 21 (D0, D7, D14, D21) de diferenciación, incubados con 1 millón de células (1M).

4.3 H-Score

Para corroborar los resultados de la descripción morfológica se sometieron los scaffolds a estudios de inmunohistoquímica. En el caso de la proliferación celular, se utilizó el marcador PCNA (Antígeno nuclear de proliferación celular) con el protocolo estipulado en el Anexo B3. Por otro lado, para evaluar la diferenciación celular musculoesquelética se utilizaron los marcadores: Desmina, Miogenina y Miosina de cadena pesada (MHY) (Anexo B3).

Los scaffolds presentaron una marcación débil (0-99) para PCNA (Gráfico 6); ejemplos de las células encontradas y sus intensidades son mostrados en la Figura A7. Sus valores van entre 20-50, siendo el scaffold del día 7 con microestructura el que presentó mayor marcación y el scaffold del día 7 liso el de menor marcación.

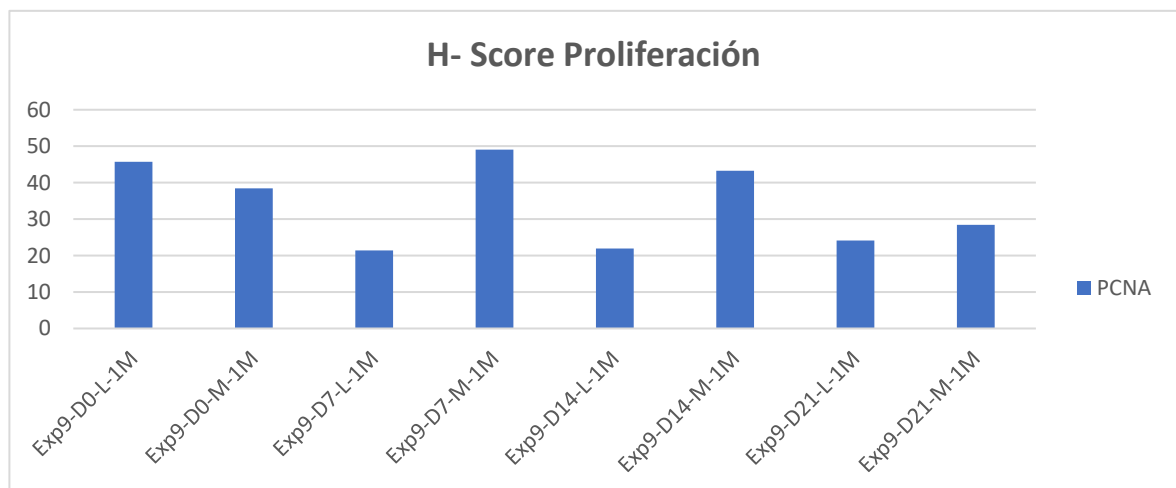


Gráfico 6. H-Score del marcador PCNA indicador de proliferación celular en los scaffolds con microestructura y lisos de los días 0, 7, 14 y 21 (D0, D7, D14, D21) de diferenciación, incubados con 1 millón de células (1M).

En el Gráfico 7 podemos observar los resultados obtenidos del H-Score de los marcadores de diferenciación celular. Para los tres marcadores utilizados se obtuvo una marcación débil (0-99). En primera instancia se encuentra la desmina, cuyos valores se encuentran entre 30-60 cuya intensidad de tinción se observa en la Figura A8. El scaffold con la mayor intensidad de tinción fue el del día 0 con microestructura, seguido por el

scaffold del día 7 liso; y el scaffold con menor marcación fue el día 14 con microestructura. Para miogenina encontramos valores entre 60-99, siendo este el marcador con mayor intensidad entre los tres utilizados; el scaffold con mayor marcación fue el día 0 liso, y el scaffold con menor marcación fue el del día 7 liso (Figura A9). Finalmente, para MYH encontramos valores entre 10-40, siendo este el marcador que tuvo menor marcación entre los tres marcadores musculoesqueléticos. El scaffold con mayor marcación fue el día 7 liso, seguido del día 14 liso, y el de menor marcación se encontró en el del día 0 liso. La intensidad de marcaje de las células y ejemplo de estas se observan en la Figura A10.

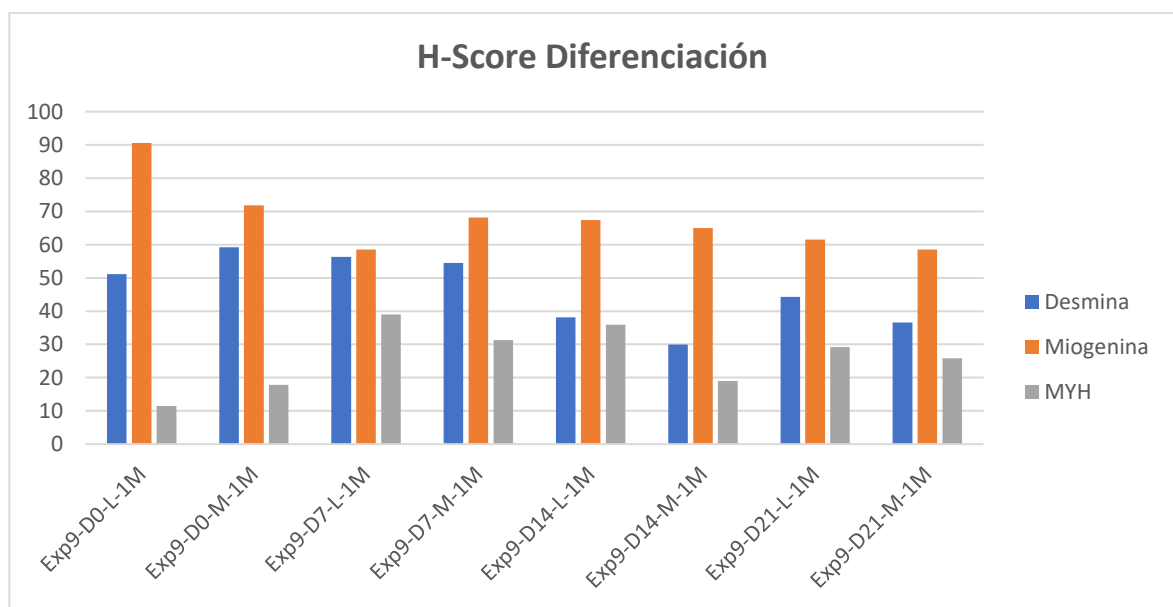


Gráfico 7. H-Score de marcadores de diferenciación musculoesquelética en los scaffolds con microestructura y lisos de los días 0, 7, 14 y 21 (D0, D7, D14, D21) de diferenciación, incubados con 1 millón de células (1M).

4.4 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico: ANOVA de dos factores para varias muestras por grupo (análisis de varianza), para analizar simultáneamente las variables de días de cultivo (0, 7, 14 y 21) y la estructura del scaffold (con microestructura o liso) respecto de los resultados en: Diferenciación celular, con las células alargadas multinucleadas (AM), células alargadas uninucleadas (AU), células gigantes multinucleadas (GM); proliferación (M); viabilidad celular (VT); y muerte celular (MTC). Como podemos observar en la Tabla 1, existe una diferencia o relación significativa entre los días de cultivo en medio de diferenciación y las células GM, VT y MTC. No obstante, los resultados muestran que no existe una interacción significativa en ninguna de las variables respecto de los factores de los scaffolds (días y estructura) debido a que los p-Valores son mayores a $p < 0,05$.

Variables	Días	Estructura	Interacción Dx E	Factores
AM	0,07	0,44	0,57	<ul style="list-style-type: none"> • Días de Cultivo • Estructura del scaffold
AU	0,46	0,79	0,90	
GM	0,02	0,04	0,11	
M	0,05	0,73	0,19	
VT	0,01	0,65	0,35	
MTC	0,01	0,65	0,35	

Tabla 1. Resultados análisis estadístico ANOVA en el cual se ve la interacción (p-Valor) de las variables analizadas en los scaffolds ($p < 0,05$) respecto de los días de cultivo (D0, D7, D14 Y 21) y la estructura superficial de los scaffolds (con microestructura y lisos).

Capítulo 5: Discusión

En el estudio realizado se procesaron scaffolds (biopolímeros tridimensionales) con matriz sin organización específica y con organización superficial acanalada, denominados liso y microestructurado respectivamente. Ambos sembrados con un total de 1 millón de células C2C12, que fueron cultivados en un ambiente idóneo para su diferenciación musculoesquelética durante 0, 7, 14 y 21 días (tiempo de diferenciación). Se utilizaron técnicas citológicas, histológicas e inmunohistoquímicas para evaluar aspectos como la viabilidad, proliferación, asociación celular y la diferenciación celular musculoesquelética.

Se establecieron las variables según: A) vitalidad o muerte celular, de acuerdo a la morfología individual celular y las características nucleares, separándolas en células viables y no viables (picnóticas y); B) diferenciación celular, separándolas en: células fusadas (F) y células redondas (R) (según sus características de células iniciales como mioblastos), alargadas uninucleadas (AU), alargadas multinucleadas (AM) y gigantes multinucleadas (GM); C) proliferación, denominándolas células mitóticas; y D) asociación celular, de acuerdo a su distribución en el scaffold, separándolas en: grupos parches (GP) y grupos redondos (GR). Todos estos criterios establecidos con técnica histológica (Tricómico de Arteta) mediante la observación directa en microscopio óptico.

A través de la técnica de inmunohistoquímica se identificó la proliferación celular mediante la expresión de PCNA, también se identificó diferenciación celular, mediante la expresión de marcadores miogénicos como: Desmina, Miogenina y MYH.

Finalmente se identificó cuál de los scaffolds presentó la mejor estructura tridimensional, y cuál fue el mejor tiempo de cultivo celular en los scaffolds.

5.1 Descripción de la Viabilidad

Los scaffold lisos presentaron una viabilidad celular menor a la de los microestructurados. Si bien los valores en porcentajes son similares en ambos grupos, son finalmente los microestructurados los que obtuvieron los valores más altos en cuanto a la viabilidad de las células implantadas. De esto podemos deducir, que las células incubadas en el scaffold con estructura acanalada, semejante a la orientación de las fibras musculares esqueléticas, se adaptan y sobreviven mejor que cuando no tienen una estructura definida(28)(29)(12)(30).

Por otro lado, el scaffold que presentó mayor viabilidad celular fue el del día 21, de lo que podemos deducir que en el transcurso de los días de incubación las células sobreviven de manera favorable al entorno dado, tanto en lo que respecta a matriz tridimensional y los medios agregados. Finalmente, el día en que hubo menor viabilidad celular fue el scaffold del día 0, lo cual puede deberse a la cantidad de células iniciales en el momento del cambio de medio de cultivo, el cuál es mayor a la cantidad de células del día 21.

En cuanto a la subclasificación de las células viables respecto a sus características morfológicas de diferenciación miogénica, la mayor cantidad de estas células se presentó en los scaffolds del día 7 microestructurado y liso, y la menor cantidad en los scaffolds del día 0 tanto en los microestructurados como en los lisos. En particular, el mayor número de células alargadas uninucleadas (AU) y multinucleadas (AM) se presentó en el scaffold microestructurado del día 7. En el caso de las células gigantes multinucleadas (GM) el mayor número se presentó en el scaffold liso, de la misma manera en el día 7.

Este resultado se corrobora con lo obtenido en un estudio de matrices porosas o polímeros de fibras altamente orientadas y no orientadas en el cual las células incubadas en la matriz de fibras orientadas presenta una mayor actividad metabólica que en matrices de fibras no orientadas y no fibrilares(22)(31). En adhesión, estudios de estructuras con diseños en 3D que utilizan la ingeniería de tejidos para el cultivo celular y la formación de tejidos *in vitro*, presentan un 87,5% de viabilidad en las primeras 24 horas, cuyo número de células aumenta en los siguientes 7 días aproximadamente el doble(29).

5.1.1 Proliferación celular.

Los scaffolds lisos presentaron un mayor porcentaje de división celular que los microestructurados. Sin embargo, al hacer la correlación con los resultados del H-score de PCNA el resultado se contrapone debido a que los scaffolds microestructurados presentan la mayor proliferación celular, esto puede deberse a que esta técnica evidencia varias etapas del ciclo celular relacionadas con la división(32). De esto podemos deducir, que los scaffolds que fueron diseñados con una microestructura superficial definida (acanalada) dejan en evidencia que los mioblastos, se reproducen y crecen mejor en un espacio tridimensional semejante a su organización *in vivo*. De igual manera se evidencia en otros estudios, en los que se utilizan mediciones colorimétricas, en donde el índice de proliferación celular es mayor en matrices con fibras altamente orientadas(22).

En cuanto a los días de incubación en el medio de diferenciación, el scaffold que presentó el mayor promedio de proliferación fue el del día 7. Este resultado se corrobora con el porcentaje de mitosis y el H-Score de PCNA obtenidos, por lo que podemos deducir que luego de transcurrida una semana las células alcanzan un punto máximo de proliferación, el cuál va decreciendo hasta el día 21. Esto podemos explicarlo debido a que se espera que la proliferación disminuya cuando comienza el proceso de diferenciación, la célula comienza el arresto para la diferenciación músculo-esquelética(30).

5.2 Grupos Celulares

En el caso de la asociación celular los scaffolds microestructurados fueron los que presentaron la mayor cantidad de grupos tanto en forma de parche como redondos, siendo los grupos parches los de mayores perímetros. De esto podemos deducir que las células incubadas en los scaffolds microestructurados se asociaron entre sí de mejor manera en un entorno tridimensional similar al del músculo *in vivo*, traducido en una mayor cantidad de células agrupadas en grandes grupos de forma paralela y en alineación. No obstante, la asociación que ocurre entre las células deja en evidencia la falta de asociación de estas con las paredes del scaffold, en donde las células no se adhieren a la estructura entregada para crecer en su espesor, sino que se adhieren entre sí para crecer agrupadas. Esto puede deberse

a las propiedades del scaffold, ya sean reológicas o de materiales, las cuales pueden no ser las adecuadas para las células utilizadas o pueden generar el “rechazo de estas”(12)(33)(34).

Por otro lado, al ser los scaffolds lisos quienes presentaron la menor cantidad de grupos celulares, tanto en grupos parches como en grupos redondos, dentro de los cuales fueron los grupos redondos los que presentan los mayores perímetros. Podemos deducir que las células en los scaffolds lisos tienden a asociarse en grandes grupos de células compactadas, sobrepuestas y con abundancia de picnosis, evidencia de muerte celular.

Estudios afirman que la asociación celular en grupos se asume como un factor importante para el proceso de cultivo celular. Dependiendo de las características de dichos grupos, es si se generará o no una resistencia adicional al transporte de oxígeno y nutrientes. En el caso de que un grupo esté muy compactado podría generarse hipoxia hacia el centro afectando la viabilidad celular(35). Este principio se aplica también a la distribución celular no homogénea en el espesor del scaffold, debido a que se evidencia tendencia hacia la periferia.

Finalmente, el scaffold que presentó mayor cantidad de grupos parches y grupos redondos fue el scaffold del día 0, de lo cual podemos deducir que las células comienzan a agruparse desde el momento en que son expuestas al medio de diferenciación. Por otro lado, en el caso de los grupos parches, el scaffold que presenta los mayores perímetros es el del día 0, por lo que se deduce que al inicio de la diferenciación es cuando las células tuvieron mayor asociación de forma paralela y alineada. En el caso de los grupos redondos, el scaffold que presenta mayores perímetros es el del día 21, por lo que se deduce en el transcurso de los días las células tienden a una mayor asociación de forma compactada y superpuesta.

Es importante, luego de este hallazgo, indagar en los posibles motivos de las asociaciones celulares presentadas, y responder a interrogantes en torno a las moléculas específicas de adhesión que están interactuando en mayor o menor cantidad en cada grupo, identificar si son diferentes en cada situación o si tienen alguna alteración(28).

5.3 Marcadores de Diferenciación celular musculoesquelética: H-Score.

En la diferenciación celular los scaffolds lisos presentaron mayor H-Score en Desmina, Miogenina y MYH que en los scaffolds microestructurados, lo que deja en evidencia que la diferenciación musculoesquelética ocurrió en mayor cantidad en los scaffolds que no tienen una estructura 3D definida.

En el caso de la Desmina y la Miogenina, el scaffold que presentó el mayor H-score fue el del día 0. Lo anterior se relaciona con las primeras etapas de diferenciación celular, cuando se está formando el miotubo inmaduro, es el momento en que se presentan en mayor cantidad estos factores de la diferenciación musculoesquelética. En cambio, para MYH el scaffold que presentó el mayor H-Score fue el del día 7, de lo cual se puede deducir que luego de una semana transcurrida las células se encuentran en mayor cantidad en la vía de diferenciación hacia fibras musculares maduras(36).

Lo anterior coincide con otros estudios en los que se realizó la descripción de los marcadores miogénicos por PCR, donde se evidencia que las desmina en el día 0 de incubación tuvo los mayores niveles de expresión en comparación con la miogenina y la MYH. Además, su expresión fue aumentando con el tiempo de cultivo en medio diferenciador. En el día 0 el nivel de expresión de miogenina fue bajo, sin embargo, aumenta considerablemente su expresión en el transcurso de los días. Finalmente la expresión de MYH es la última en aumentar llegando a ser la más expresada en la etapa de diferenciación tardía(9).

El resultado del H-score respecto al tiempo de incubación de las células en el medio de diferenciación revela que, para todos los marcadores utilizados, hay una mayor marcación desde el día 0 al día 7, el cuál desciende progresivamente a tiempos largos. De esto podemos deducir que, durante la primera semana de diferenciación, las células presentan una mayor cantidad de fibras musculares en proceso de maduración final. Resultados que se asemejan también a otros estudios en los que el punto máximo de diferenciación es alcanzado al día 4 de cultivo(9)(37).

Luego de transcurrida la semana los valores descienden, por lo que se deduce que los medios no son suficientes para mantener y llevar a cabo la diferenciación completa. Esto puede ser explicado por la técnica utilizada para mantener a los polímeros con las células en cultivo, el cual baja su rendimiento con el paso de los días y no cumple las necesidades que las células musculares requieren en su proceso de diferenciación *in vivo*. Sistemas especializados como biorreactores y sistemas de estimulación mecánica son necesarios para complementar la diferenciación celular (4)(38)(39).

El cese de diferenciación puede deberse también a dos factores fundamentales en los scaffolds, que son: 1) las características reológicas que presentan los scaffolds utilizados; la rigidez y el espesor tienen impacto en la proliferación, adhesión y movilización celular(33), 2) los materiales no mamíferos utilizados en la formación del scaffold que pueden provocar el “rechazo” de las células en el transcurso del tiempo, debido a que las células son de origen mamífero y necesitan componentes como la fibronectina, el colágeno y la laminina de origen animal(12)(40)(41).

Capítulo 6: Conclusión

Conclusiones experimentales

- 1) Los scaffolds microestructurados presentan mejor viabilidad, proliferación y asociación celular que los scaffolds sin microestructura o lisos.
- 2) Los scaffolds lisos presentan mejor diferenciación celular que los scaffolds microestructurados.
- 3) A los 7 días de incubación celular se obtienen los mejores avances en el proceso de diferenciación musculoesquelética.
- 4) Las células C2C12 viven y proliferan favorablemente en los scaffolds utilizados, sin embargo, su diferenciación musculoesquelética es insuficiente.
- 5) Las células C2C12 no tienen la interacción esperada con los scaffolds, lo que se traduce en una tendencia a asociarse en grupos y una falta de adhesión de las células con la matriz.

Bibliografía

1. Gowitkze B, Miller M. El Cuerpo y sus Movimientos: Bases científicas. Paidotribo. Barcelona, España; 137-139 p.
2. Gartner L. Texto Atlas de Histología Gartner. 2° Edición. México, DF: McGraw-Hill Interamericana; 2002. 153-168 p.
3. Bach A, Beier J, Stern-Staeter J, Horch R. Skeletal muscle tissue engineering. *J Cell Mol Med.* 2004;8(4):413–22.
4. Datar I, Betti M. Possibilities for an in vitro meat production system. *Innov Food Sci Emerg Technol.* Elsevier Ltd; 2010;11(1):13–22.
5. Edelman P, McFarland D, Mironov V, Matheny J. Commentary: In Vitro-Cultured Meat Production. *Tissue Eng.* 2005;11(5–6):659–62.
6. Adams J, Watt F. Regulation of Development by the Extracellular Matrix. *Cell Membranes.* 1993;117:1183–98.
7. Zouraq A, Stölting M, Eberli D. Skeleta Muscle Regeneration for clinical application. En: Departament of Urology UHZ, editor. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering.* Switzerland: INTECH; 2013. p. 679–712.
8. 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.
9. Chen Y, Stegaev V, Kouri V, Sillat T, Chazot P, Stark H, et al. Identification of histamine receptor subtypes in skeletal myogenesis. *Mol Med Rep.* 2015;2:2624–30.
10. Barreto J. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos : una introducción. *Rev Estud Transdiscipl Venez.* 2009;1(2):98–109.
11. Smith B, Grande D. The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nat Rev Rheumatol Estados Unidos.* Nature Publishing Group; 2015;11(4):213–22.
12. Langelaan M, Boonen K, Polak R, Baaijens F, Post M, van der Schaft D. Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle. *Trends Food Sci Technol Netherlands.* Elsevier Ltd; 2010;21(2):59–66.
13. Alvarez-Barreto J, Shreve M, Deangelis P, Sikavitsas V. Preparation of a Functionally Flexible, Three-Dimensional, Biomimetic Poly(L-Lactic Acid) Scaffold with Improved Cell Adhesion. *Tissue Eng.* 2007;13(6):1205–17.
14. Lee N, Robinson J, Lu H. Biomimetic strategies for engineering composite tissues. *Curr Opin Biotechnol.* Elsevier Ltd; 2016;40:64–74.
15. Post M. An alternative animal protein source: Cultured beef. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1328(1):29–33.

16. Weinstein-Oppenheimer C, Aceituno A, Brown D, Acevedo C, Ceriani R, Fuentes M, et al. The effect of an autologous cellular gel-matrix integrated implant system on wound healing. *J Transl Med.* 2010;8:1–11.
17. Bhat Z, Kumar S, Fayaz H. In vitro meat production : Challenges and benefits over conventional meat production. *J Integr Agric. Chinese Academy of Agricultural Sciences;* 2015;14(2):241–8.
18. Enrione J, Pino K, Pepczynska M, Brown D, Ortiz R, Sánchez E, et al. A novel biomaterial based on salmon-gelatin and its in vivo evaluation as sterile wound-dressing. *Mater Lett.* 2017;212:159–64.
19. Schuster E, Wallin P, Klose F, Gold J. Correlating network structure with functional properties of capillary alginate gels for muscle fiber formation. 2017;72:210–8.
20. Kroehne V, Heschel I, Schügner F, Lasrich D, Bartsch J, Jockusch H. Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts. 2008;12(5):1640–8.
21. Li G, Zhao X, Zhao W, Zhang L, Wang C, Jiang M, et al. Porous chitosan scaffolds with surface micropatterning and inner porosity and their effects on Schwann cells. *Biomaterials.* Elsevier Ltd; 2014;35(30):8503–13.
22. Riboldi S, Sadr N, Pignini L, Neuenschwander P, Simonet M, Mognol P, et al. Skeletal myogenesis on highly orientated microfibrillar polyesterurethane scaffolds. *J Biomed Mater.* 2008;84(4):1094–101.
23. Verma D, Desai M, Kulkarni N, Langrana N. Characterization of surface charge and mechanical properties of chitosan/alginate based biomaterials. *Mater Sci Eng C.* Elsevier B.V.; 2011;31(8):1741–7.
24. Steppan S, Adkins R, Spinks P, Hale C. Multigene phylogeny of the Old World mice, Murinae, reveals distinct geographic lineages and the declining utility of mitochondrial genes compared to nuclear genes. *Mol Phylogenet Evol.* 2005;37(2):370–88.
25. Chuaqui S, González B. Daño celular irreversible Necrosis. *Manual de Patología general.* Chile: Pontificia Universidad Católica;
26. Kerfoot C, Huang W, Rotenberg S. Immunohistochemical Analysis of Advanced Human Breast Carcinomas Reveals Downregulation of Protein Kinase α . *J Histochem Cytochem.* 2004;52(3):419–22.
27. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Hara Y, Omoto Y, Sugiura H, et al. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of aromatase expression in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;74(1):47–53.
28. Grabowska I, Szeliga A, Moraczewski J, Czaplicka I, Brzóska E. Comparison of satellite cell-derived myoblasts and C2C12 differentiation in two- and three-dimensional cultures: changes in adhesion protein expression. *Cell Biol Int.* 2011;35(2):125–33.

29. Goldstein T, Smith B, Zeltsman D, Grande D, Smith L. Introducing a 3-dimensionally printed, tissue-engineered graft for airway reconstruction: A pilot study. *Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2015;153(6):1001–6.
30. Acevedo C, Orellana N, Avarias K, Ortiz R, Benavente D, Prieto P. Micropatterning Technology to Design an Edible Film for In Vitro Meat Production. *Food Bioprocess Technol. Food and Bioprocess Technology*; 2018;11(7):1267–73.
31. Xu C, Inai R, Kotaki M, Ramakrishna S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: A potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials.* 2004;25(5):877–86.
32. Zalesska-kr M, Szkudlarek T, Jelen J. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions e. 1999;35:180–6.
33. Li S, Zhao F, Zhan Y, Liu X, Hun T, Zhang H, et al. How Deep Might Myoblasts Sense: The Effect of Substrate Stiffness and Thickness on the Behavior of Myoblasts. *J Med Biol Eng. Springer Berlin Heidelberg*; 2017;38(4):596–606.
34. Engler A, Griffin M, Shamik S, Bönnebamm G, Swenney H, Discher D. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J Cell Biol.* 2004;166(6):877–87.
35. Enrione J, Blaker J, Brown D, Weinstein-Oppenheimer C, Marzena P, Yusser O, et al. Edible Scaffolds Based on Non-Mammalian Biopolymers for Myoblast Growth. *Materials (Basel).* 2017;10(12):1404–19.
36. Yan W, George S, Fotadar U, Tyhovych N, Kramer A, Yost M, et al. Tissue engineering of skeletal muscle. *Minerva Biotechnol.* 2007;13(11):89–96.
37. Hill M, Wernig A, Goldspink G. Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *J Anat.* 2003;203(1):89–99.
38. Bischofs I, Schwarz U. Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(16):9274–9.
39. Tatsumi R, Sheehan S, Iwasaki H, Hattori A, Allen R. Mechanical stretch induces activation of skeletal muscle satellite cells in vitro. *Exp Cell Res.* 2001;267(1):107–14.
40. Carriel V, Garzón I, Jiménez J, Oliveira A, Arias-Santiago S, Campos A, et al. Epithelial and stromal developmental patterns in a novel substitute of the human skin generated with fibrin-agarose biomaterials. *Cells Tissues Organs.* 2012;196(1):1–12.
41. Rodríguez I, López M, Oliveira A, Sánchez M, Campos A, Alaminos M, et al. Rheological characterization of human fibrin and fibrin-agarose oral mucosa substitutes generated by tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011;6(8):636–44.

ANEXO A

Fotomicrofotografías

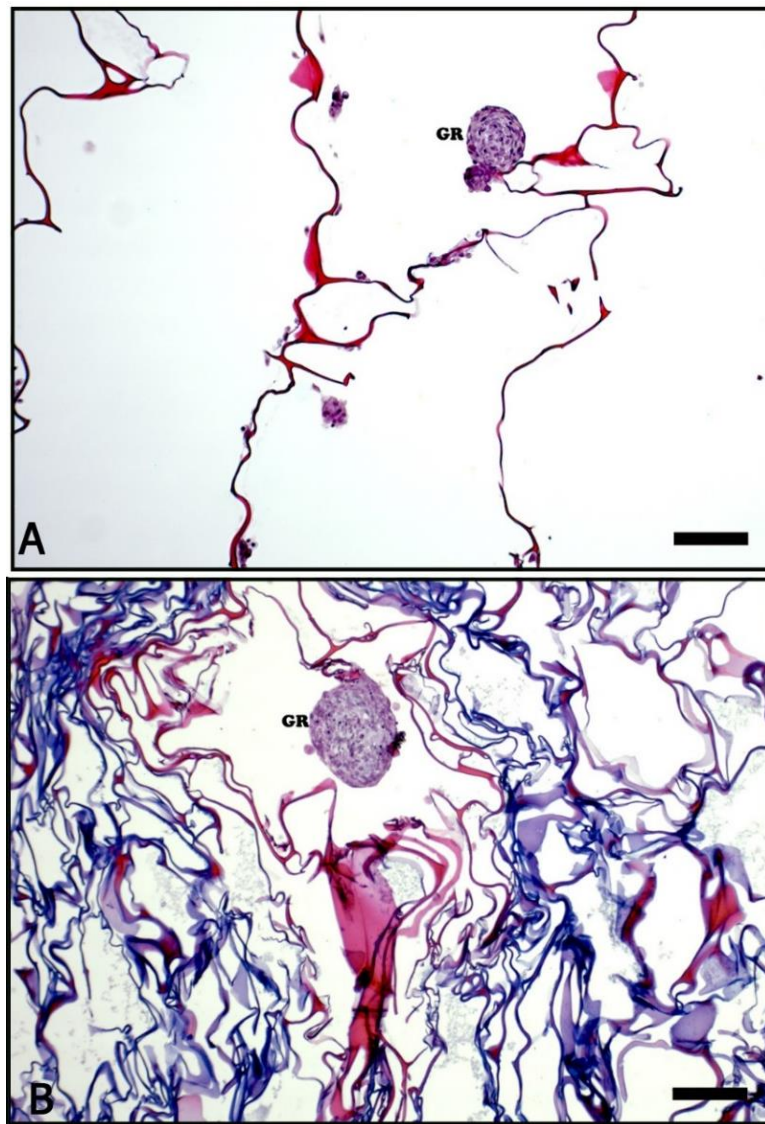


Figura A1: Fotomicrografía de cortes histológicos de los scaffolds con y sin microestructura incubados con 1 millón de células al día 0 de cultivo. **A)** corte transversal del scaffold microestructurado en donde se evidencia la estructura acanalada de las paredes, **GR** indica un grupo redondo asociado al scaffold. **B)** Corte transversal del scaffold sin microestructura o liso en donde se evidencia la estructura desorganizada de las paredes, **GR** indica un grupo redondo asociado al scaffold. **Tinción:** Tricrómico de Arteta. **Barra de escala:** 100 μm

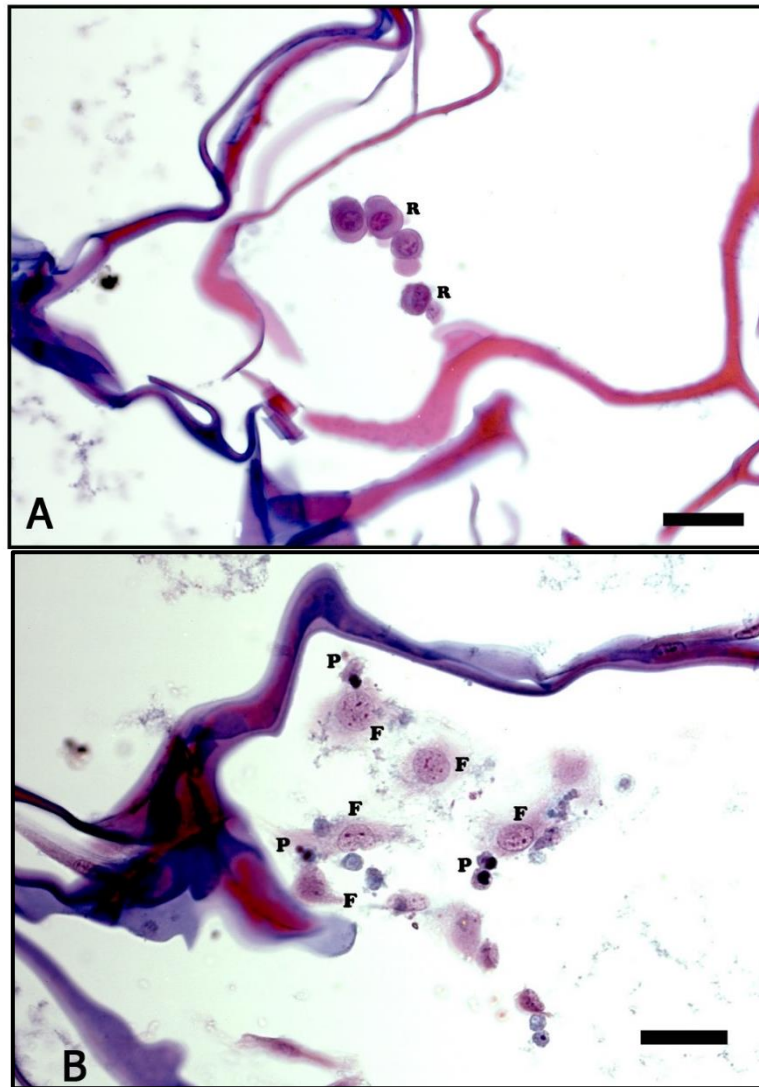


Figura A2: Fotomicrografías de cortes histológicos de los scaffolds con microestructura, incubados con 1 millón de células al día 7 de cultivo, con células viables y no viables. **A)** **R** indica células con características morfológicas de vitalidad y citoplasma esférico denominadas “células redondas”. **B)** **F** indica células con características morfológicas de vitalidad y citoplasma alargado o estrellado denominadas “células fusadas”, **P** indica células con características morfológicas de muerte celular denominadas “células picnóticas”. **Tinción:** Tricrómico de Arteta. **Barra de escala:** 30 μ m.

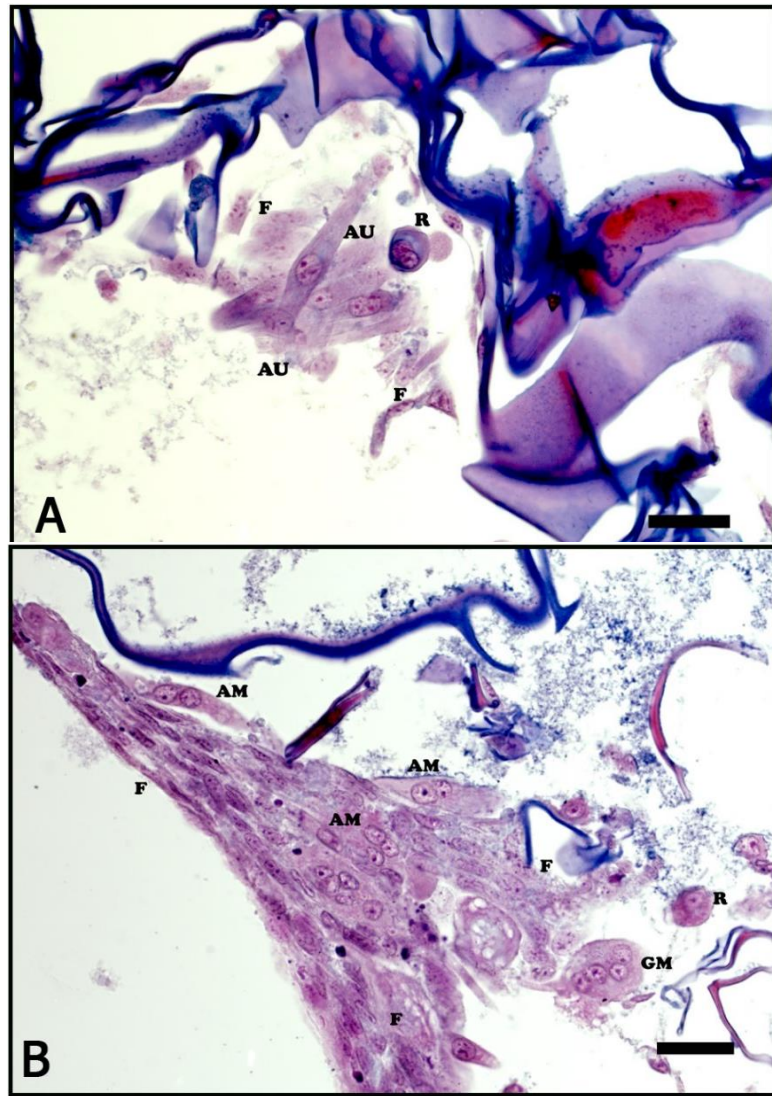


Figura A3: Fotomicrografías de cortes histológicos de los scaffolds con microestructura (A) y sin microestructura (B), incubados con 1 millón de células al día 7 de cultivo. **A)** AU indica células denominadas “Alargadas uninucleadas” por su tamaño considerablemente mayor al de los mioblastos incubados y poseer 1 núcleo; **F** indica “células fusadas” y **R** indica “células redondas”, ambas de morfología similar a los mioblastos incubados. **B)** AM indica células “Alargadas multinucleadas” por su tamaño y a que poseen 2 o más núcleos; **GM** indica “células gigantes multinucleadas”. **Tinción:** Tricrómico de Arteta. **Barra de Escala:** 30 µm.

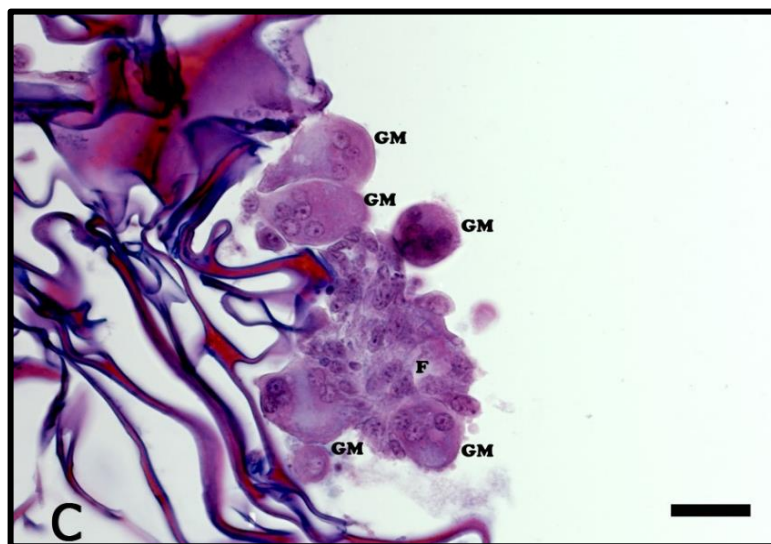


Figura A4: Fotomicrografía de corte histológico de scaffold sin microestructura, incubado con 1 millón de células al día 7 de cultivo. **C)** **GM** indica células denominadas “gigantes multinucleadas” por su forma y tamaño mayor al de los mioblastos incubados y a que poseen 2 o más núcleos. **Tinción:** Tricrómico de Arteta. **Barra de Escala:** 30 μm .

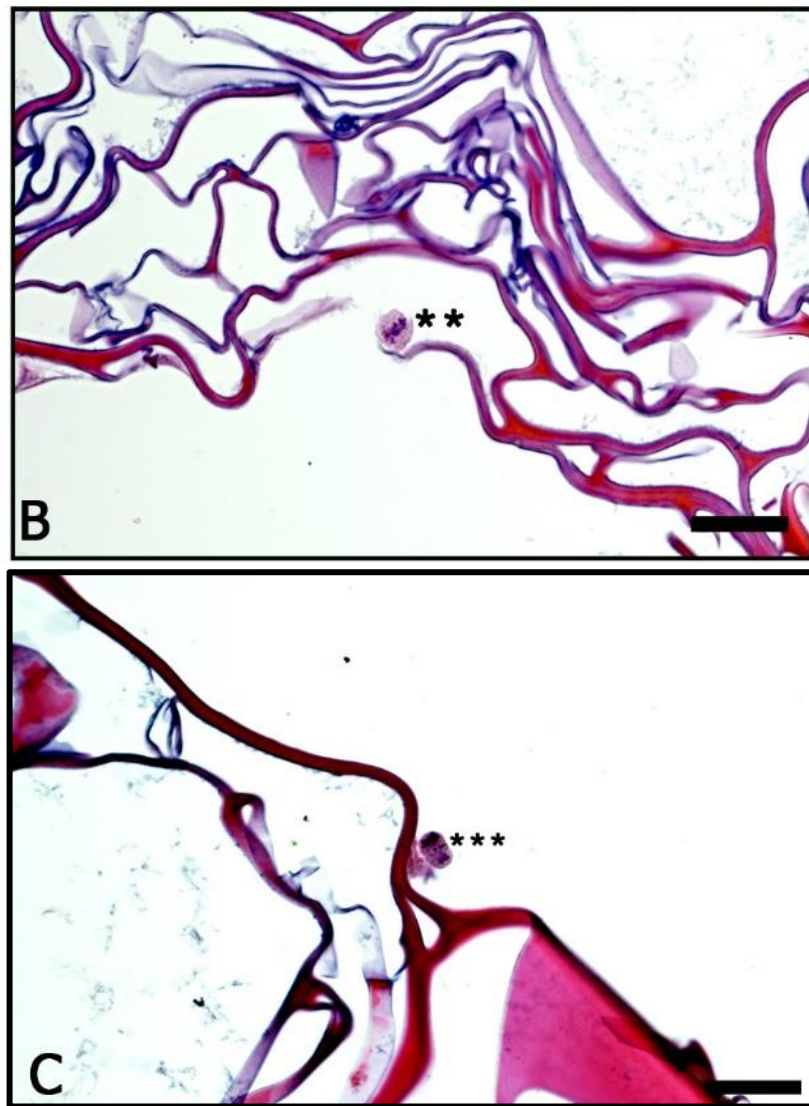


Figura A5: Fotomicrografía de cortes histológicos de scaffolds con microestructura, incubados con 1 millón de células al día 7 de cultivo, con células viables en división mitótica. **B)** (**) indica una célula en metafase. **C)** (***) indica una célula en telofase. **Tinción:** Tricrómico de Arteta. **Barra de escala:** 30 μm .

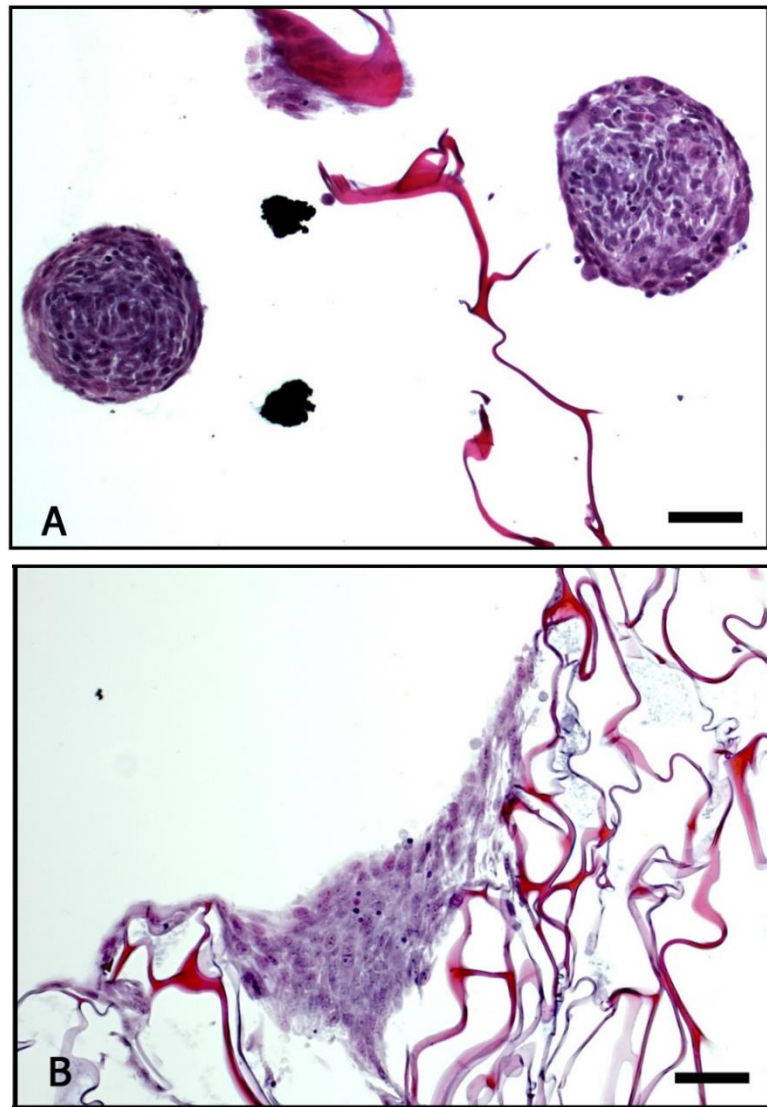


Figura A6: Fotomicrografía de cortes histológicos de los scaffolds con microestructura (A) y sin microestructura o liso (B) en el día 0 de cultivo, con células asociadas en grupos. **A)** Células asociadas de forma concéntrica y compactada formando un grupo denominado “grupo redondo” **B)** Células asociadas de forma paralela y extendida formando un grupo denominado “grupo parche”. **Tinción:** Tricrómico de Arteta. **Barra de escala:** 50 μm

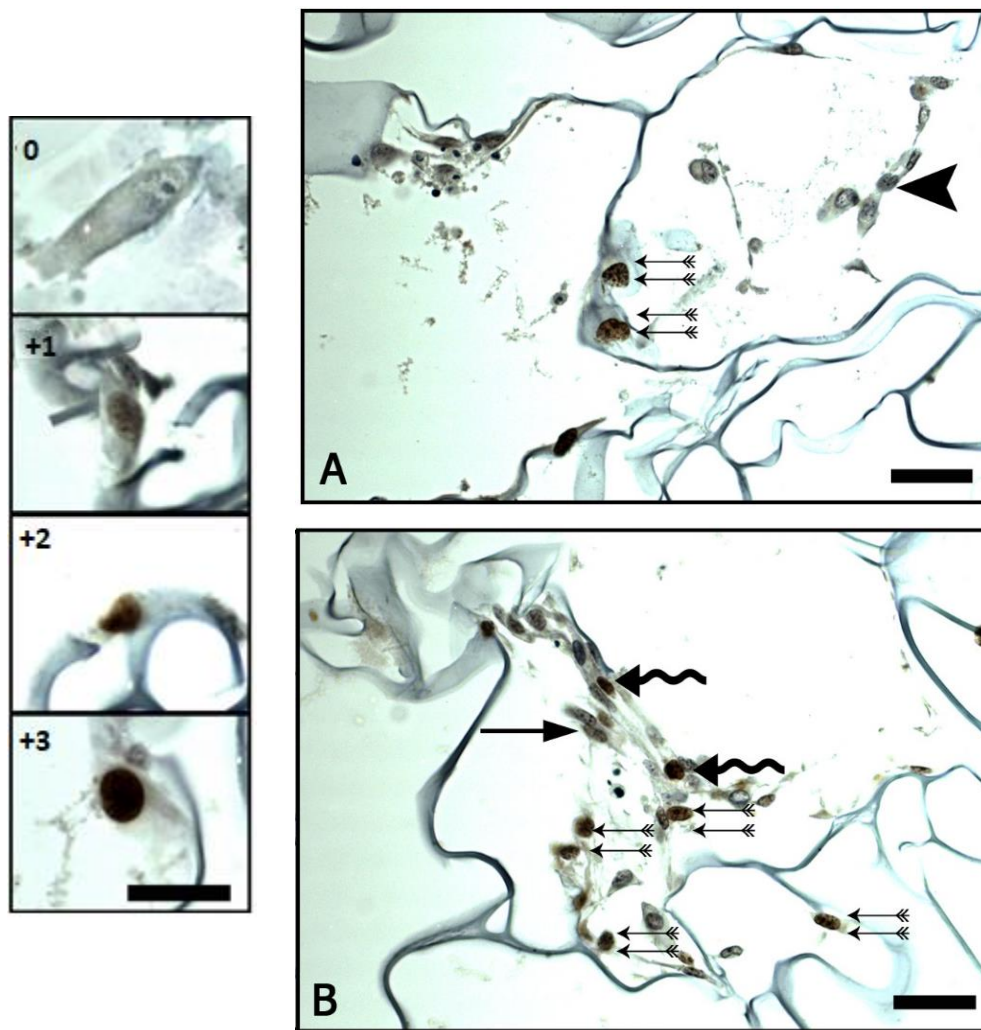


Figura A7: Fotomicrografía de cortes histológicos de los scaffolds sin microestructura (A) y con microestructura (B) en el día 7 de cultivo. Células marcadas con anticuerpo anti-PCNA utilizando técnica inmunohistoquímica, reacción cromógena de color café al revelar con DAB, tinción nuclear, Escala de referencia en intensidad de tinción utilizada para el H-score siendo **0** (sin tinción), **+1** (tinción débil), **+2** (tinción media), **+3** (tinción fuerte). **A**) (►) indica células iniciales de intensidad 0, (⇔) indican células redondas de intensidad +2. **B**) (→) indica células fusadas de intensidad +1, (⇔) indica células fusadas con intensidad +2 y (~~~~) indica células fusadas con intensidad +3. **Barra de escala:** 20 μm en escala de intensidades y 30 μm en scaffold.

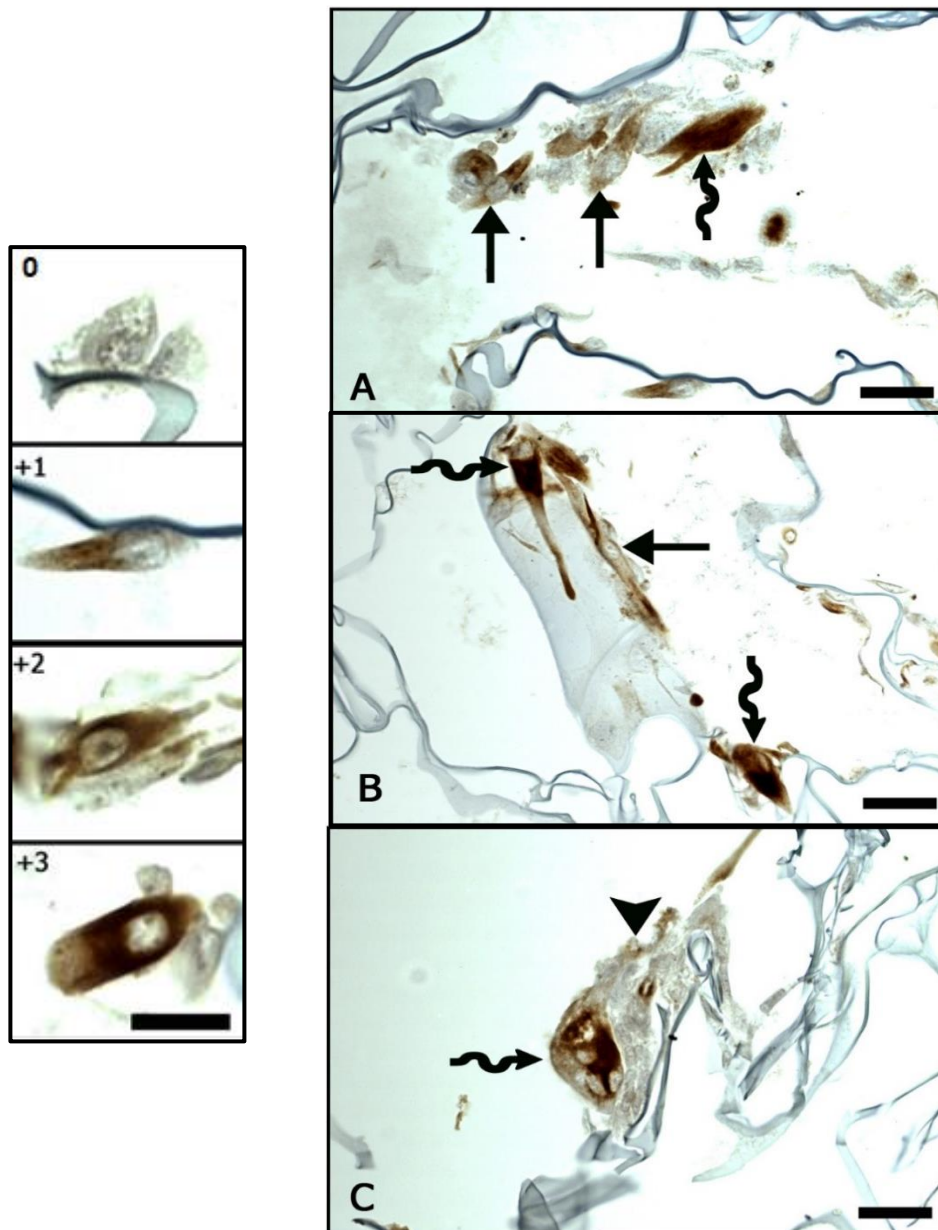


Figura A8: Fotomicrografía de cortes histológicos del scaffold con microestructura en el día 7 de cultivo. Células marcadas con anticuerpo anti-Desmina utilizando técnica inmunohistoquímica, tinción citoplasmática, revelado con DAB, Escala de referencia en intensidad de tinción utilizada para el H-score siendo **0** (sin tinción), **+1** (tinción débil), **+2** (tinción media), **+3** (tinción fuerte). **A**) (→) indica células iniciales de intensidad +1, (~~~~) indica célula fusada de intensidad +3. **B**) (→) indica célula alargada uninucleada de intensidad +1, (~~~~) indica célula fusada y una célula alargada uninucleada, ambas de intensidad +3. **C**) (▶) indica células fusadas sin tinción (0), (~~~~) indica célula gigante multinucleada de intensidad +3. **Barra de escala:** 20 μm en escala de intensidades y 30 μm en scaffold.

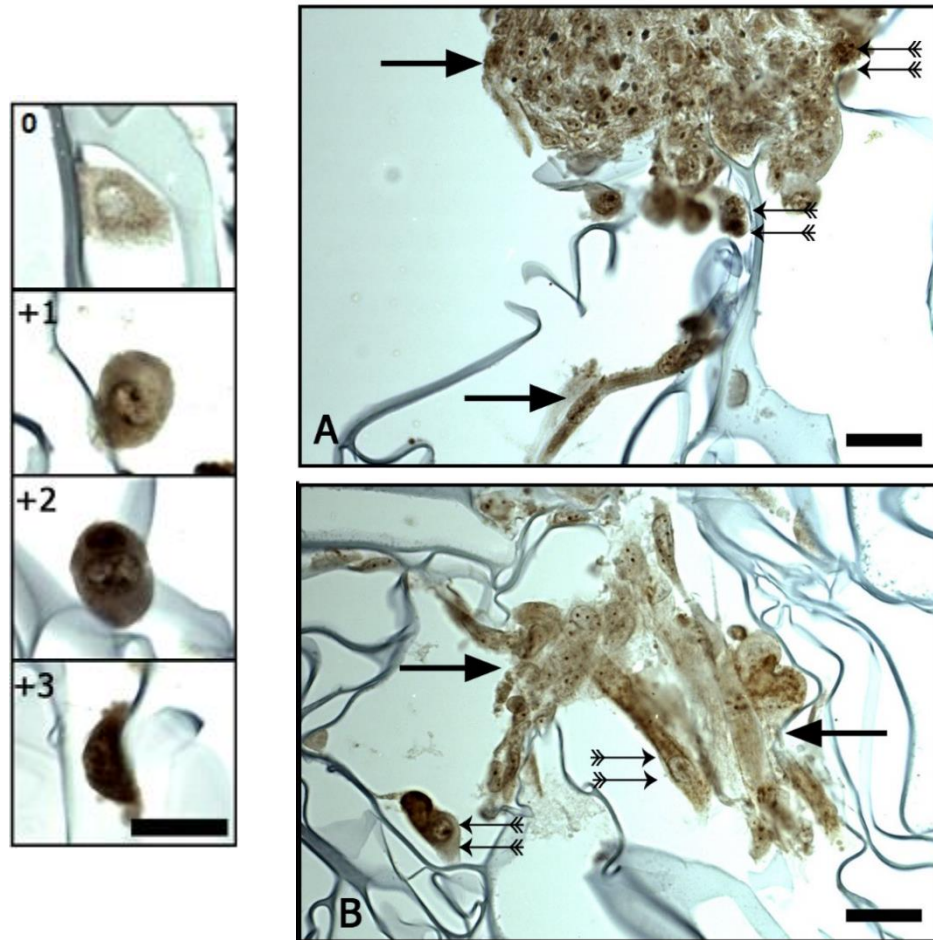


Figura A9: Fotomicrografía de cortes histológicos del scaffold microestructurado en el día 7 de cultivo. Células marcadas con anticuerpo anti-Miogenina utilizando técnica inmunohistoquímica, reacción cromógena de color café al revelar con DAB, tinción citoplasmática, Escala de referencia en intensidad de tinción utilizada para el H-score siendo **0** (sin tinción), **+1** (tinción débil), **+2** (tinción media), **+3** (tinción fuerte). **A**) (→) indica célula fusada uninucleada y, células iniciales ambos de intensidad +1, (⇨) indica células iniciales de intensidad +2. **B**) (→) indican células iniciales de intensidad +1, (⇨) indica célula inicial y célula alargada uninucleada, ambas de intensidad +2. **Barra de escala:** 20 μm en escala de intensidades y 30 μm en scaffold.

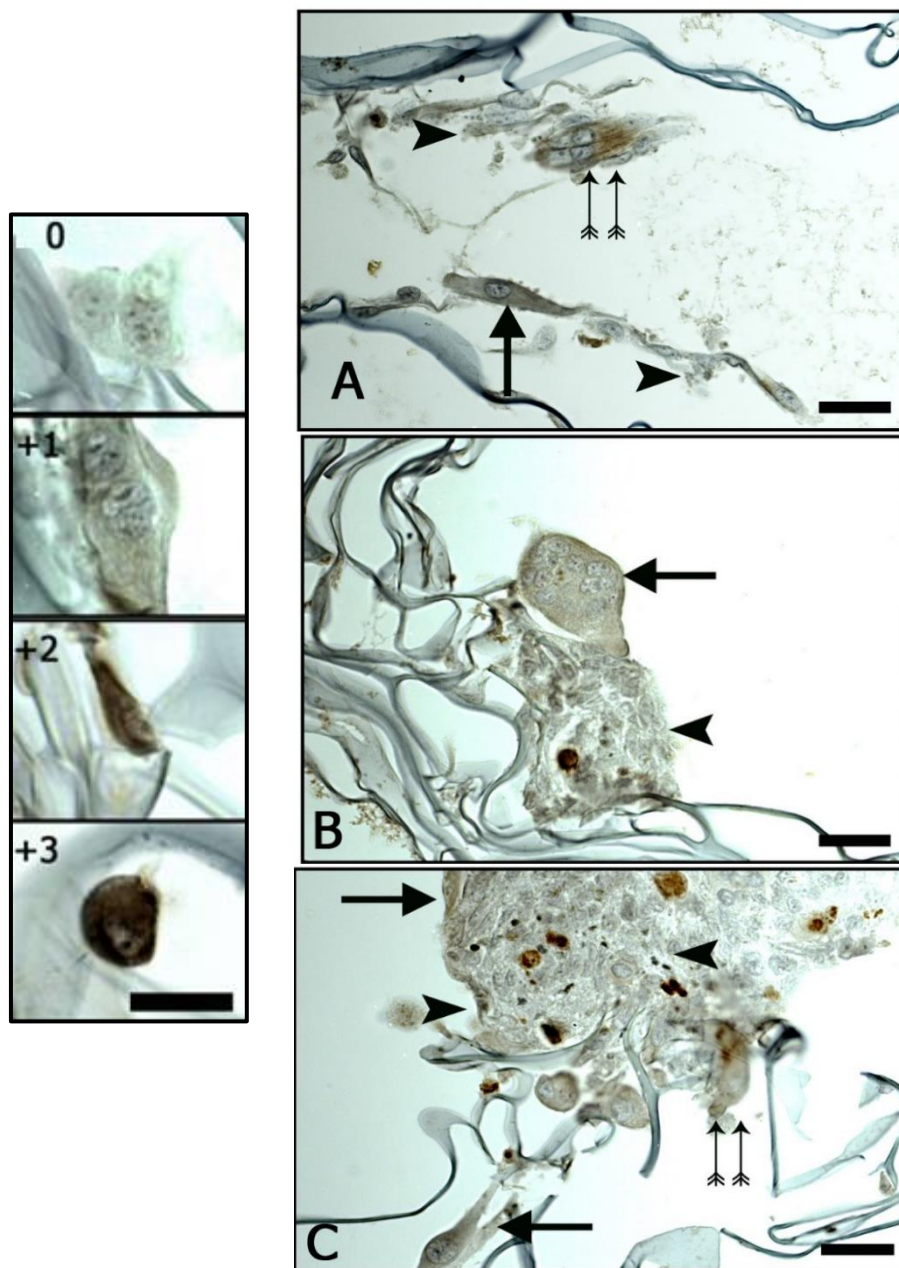


Figura A10: Fotomicrografía de cortes histológicos del scaffold del día 7 de cultivo. Células marcadas con anticuerpo anti-MYH utilizando técnica inmunohistoquímica, reacción cromógena de color café al revelar con DAB, tinción citoplasmática, Escala de referencia en intensidad de tinción utilizada para el H-score siendo **0** (sin tinción), **+1** (tinción débil), **+2** (tinción media), **+3** (tinción fuerte). **A)** (▶) indica células fusadas sin tinción (0), (→) indica célula fusada de intensidad +1, (⇒) indica células fusadas de intensidad +2. **B)** (▶) indica células fusadas sin tinción (0), (→) indica célula gigante multinucleada de intensidad +1. **C)** (▶) indica células fusadas sin tinción 0, (→) indica células iniciales de intensidad +1, (⇒) indica célula fusada de intensidad +2. **Barra de escala:** 20 μm en escala de intensidades y 30 μm en scaffold.

ANEXO B

Protocolos del Laboratorio de Biología de la Reproducción y Del Desarrollo.

B.1 Procesamiento de las muestras con técnica de rutina luego de la fijación en procesador de tejidos con sistema al vacío.

Alcohol 80%	1 hora
Alcohol 95%	1 hora
Alcohol 95%	1 hora
Alcohol 95%	1 hora
Mezcla de Alcohol 95% /Butanol	1 hora
Mezcla de Alcohol 95% /Butanol	1 hora
Butanol	8 horas
Butanol	8 horas
Butanol	8 horas
Paraplast Plus	10 horas
Paraplast Plus	10 horas
Paraplast Plus	10 horas

Luego de este proceso se formaron los tacos de parafina, los cuales fueron cortados en Micrótopo a 5 µm, en cintas de 15 cortes.

B.2 Tinción con Tricrómico de Arteta

Desparafinado

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 ₂ CO ₃	5'
Alcohol 70%	5'
Agua destilada I	5'
Agua destilada II	5'

Tinción

Hematoxilina de Harris	1' 15''
Agua corriente	10'
Agua destilada	5'
Eritrosina- Orange G	30''
Agua destilada	5'
Ácido fosfotúngstico al 0,5%	10'
Agua destilada	5'
Azul de anilina 1%	1' 15''

Deshidratación

Alcohol 95% I	1'
Alcohol 95% II	1'
Alcohol 95% III	1'
Alcohol 100% I	10'
Alcohol 100% II	5'
Alcohol 100% III	5'
Xilol I	10'
Xilol II	5'
Xilol III	5'

Montaje con Cubreobjetos y Entellán.

B.3 Inmunohistoquímica: Miogenina, Desmina, MYH, PCNA.

Día 1

Desparafinado

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 ₂ CO ₃	5'
Alcohol 70%	5'
Agua destilada I	5'
Agua destilada II	5'
Buffer tris	5'

Recuperación antigénica

Buffer tris-EDTA (T° ambiente)	5'
Vaporera*	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'

*Encender la vaporera previamente para tener la T° adecuada antes de colocar las muestras.

Bloqueo peroxidasa endógena:

Peróxido de hidrógeno (2% en metanol) (en agitador)	30'
Agua destilada I (en agitador)	5'

Incubación con anticuerpos (en agitador)

Trasladar las preparaciones a la bandeja y marcarlas con lápiz hidrófobo	
Tris buffer I	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) <ul style="list-style-type: none"> • Miogenina (Santa cruz, sc-576, policlonal)1:100 en buffer tris • Desmina (Santa cruz, sc-14026, policlonal)1:250 en buffer tris • MYH (Santa cruz, sc-20641, policlonal)1:100 en buffer tris • PCNA (Santa cruz, sc-56, monoclonal)1:1000 en buffer tris 	Over night
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Anticuerpo secundario: Anti-conejo hecho en cabra 1:500 (Des, Miog, MYH). Anti-ratón hecho en cabra 1:500 (PCNA)	1 hora.
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Complejo ABC** (200 µL/porta)	90'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Tris buffer III	5'
Diaminobencidina (DAB)*** (200 µL/porta)	10'
Tris buffer I	5'
Tris buffer II	5'
Transferir las preparaciones al canastillo	

*Antes de comenzar con los lavados en buffer, se debe preparar el anticuerpo secundario.

**El complejo ABC se debe preparar 30 minutos antes de aplicarlo.

***Se debe preparar y mantener en oscuridad, además debe ser preparado poco antes de ser utilizado.

Tinción de contraste

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

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.