

Cultivo primario de cardiomiocitos embrionarios

Beatriz Barranco Ruiz, Salomón Gómez Migueles, Rafael Hernández Castillo,
¹Elena Aréchaga Ocampo, ¹Claudia Haydée González de la Rosa,
²Nohra E Beltrán Vargas.

¹Departamento de Ciencias Naturales, ²Departamento de Procesos y Tecnología.
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Cuajimalpa.

nbeltran@correo.cua.uam.mx

Resumen

Un tema crítico en la ingeniería de tejido cardiaco es la obtención de cultivos primarios para el desarrollo de un constructo. En este trabajo se obtuvieron cultivos primarios de cardiomiocitos embrionarios de pato y pollo, debido a su estado de diferenciación y su alta capacidad proliferativa. El cultivo primario se obtuvo a partir de la disección de ventrículos y disgregación mecánica y enzimática con tripsina y DNasa. La suspensión celular fue sembrada en gelatina y cultivada a 37° C en medio con suero. Los cambios morfológicos fueron documentados mediante morfometría utilizando microscopía de campo claro. Se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos anti-actina cardiaca, para identificar la población de cardiomiocitos presentes en el cultivo primario, después de varios periodos de tiempo de crecimiento. Los resultados muestran la presencia de cardiomiocitos de 0.02 mm de ancho y 0.1 mm de longitud y forma rectangular, así como la factibilidad del estudio para seleccionar únicamente cardiomiocitos, con la finalidad de colocarlos en andamios para generar constructos.

Palabras clave: Cardiomiocitos, cultivo primario, ingeniería de tejidos.

Abstract

A critical issue in cardiac tissue engineering is to obtain primary cultures for the development of a construct. In this study, primary cultures of embryonic cardiomyocytes were obtained from duck and chicken, because of their state of differentiation and high proliferative capacity. The primary cultures were obtained from ventricles dissection and mechanical and enzymatic digestion with trypsin and DNase. The cell suspension was seeded on gelatin and cultured at 37° C in medium containing serum. The morphological changes were documented by morphometry using bright field microscopy. Anti-cardiac actin immunofluorescence was performed with antibodies to identify the cardiomyocyte population present in the primary culture after several

growth periods. The results show the presence of cardiomyocytes 0.02 mm wide and 0.1 mm long and rectangular shape. The results show feasibility study to select only the cardiomyocytes, in order to place them on scaffolds to generate constructs.

Key words: Cardiomyocytes, Primary Culture, Tissue Engineering.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares isquémicas se consideran la primera causa de muerte a nivel mundial en personas mayores de 40 años. La alta incidencia de estas enfermedades las ha convertido en un importante problema de salud, debido a tratamientos poco efectivos y alto costo de atención^[1,2].

El proceso isquémico en el miocardio se traduce en falta de nutrientes y oxígeno en el miocardio, debido a la disminución del flujo sanguíneo. Si no se revierte, evoluciona a la necrosis mejor conocida como IAM. Los procesos posteriores al IAM provocan la cicatrización cardíaca, reduciendo la Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo (FEVI) y provocando anomalías hemodinámicas en el paciente, que pueden evolucionar en insuficiencia cardíaca^[3, 4].

Los pacientes que sufren un IAM y posteriormente insuficiencia cardíaca, tienen pocas opciones de tratamiento. La alternativa final para pacientes en etapas terminales de insuficiencia cardíaca, es el trasplante de corazón, procedimiento que se limita a la disponibilidad de órganos, es susceptible al rechazo del mismo y requiere la supresión del sistema inmunológico, afectando la calidad de vida del paciente^[3].

La utilización de cultivos celulares ha marcado una nueva forma de analizar y desarrollar opciones de tratamiento. Las células cardíacas miden alrededor de 50 a 100 μm de longitud, con un diámetro aproximado de 14 μm . Los extremos de las fibras musculares cardíacas se conectan a las fibras vecinas a través de discos intercalares, los cuales cuentan con uniones de hendiduras (gap) que permiten la conducción de los potenciales de acción. Así mismo, para la identificación de las células cardíacas, algunos autores utilizan inmunodetección de algunas proteínas abundantes en este tipo de células, como Actina Cardíaca, Tropomiosina Cardíaca, Troponina I, entre otras^[5, 6].

A partir de estos conocimientos surge el desarrollo de la terapia celular cardíaca, la cual propone reemplazar las células dañadas, por células funcionales. Se han desarrollado protocolos para la evaluación de infusión de células de origen

troncal y embrionario. Sin embargo, los resultados obtenidos han sido variables y modestos, ya que la FEVI aumenta un máximo de 10%^[7-10].

Otra alternativa es la ingeniería de tejidos, es decir, la utilización de células para la construcción de tejido cardíaco. La fuente celular debe cumplir varios requisitos como alta proliferación celular, facilidad de cultivo, respuesta inmune mínima o nula y habilidad para diferenciarse a las células deseadas, en este caso a cardiomiocitos, los cuales constituyen aproximadamente el 75% de las células totales del tejido cardíaco. Diversos protocolos han mostrado que las células troncales embrionarias y adultas, son una prometedora opción para la ingeniería de tejidos, aunque su verdadero potencial aún no está claro^[3, 11-13].

Se debe diseñar un andamio en el cual las células sean capaces de desarrollarse. El andamio cardíaco debe contar con propiedades de flexibilidad, que permitan la contracción/relajación de la sístole/diástole así como la sincronía eléctrica del tejido trasplantado con el huésped^[3, 11-13].

Finalmente, el resultado del crecimiento de las células en el andamio, forma un constructo. Este constructo puede ser optimizado a través de su cuidado en ambientes controlados. La literatura ha reportado la optimización de constructos cardíacos, mediante la utilización de biorreactores con estimulación mecánica o estimulación eléctrica, beneficiando el desarrollo de las células cardíacas^[14, 15].

Debido a las variadas metodologías que engloba la Ingeniería de Tejidos, resulta necesario trabajar en temas específicos y de manera paralela. Por lo que el objetivo de este trabajo, es crear un protocolo reproducible para el cultivo de cardiomiocitos embrionarios, que pueda ser utilizado para la generación de constructos de tejido cardíaco.

Métodos

A partir de un protocolo utilizado para el estudio electrofisiológico de cardiomiocitos embrionarios^[16], se realizaron 10 cultivos primarios con modificaciones paulatinas que permitieron la obtención de células viables de forma reproducible.

Reactivos

Para la obtención del cultivo primario, se utilizó Tripsina al 0.01% w/v (Sigma T8003) Deoxyribonucleasa I tipo II-S al 0.035% w/v (D-4513-1 VL, Sigma),

Medio M199 (Gibco), Suero Fetal Bovino (Gibco), Suero de Caballo (Invitrogen) y Gelatina de Origen Bovino al 2% w/v (Sigma G9391).

Obtención de Cardiomiocitos

Cada cultivo se realizó a partir de 30 embriones de pato (7 cultivos) o pollo (3 cultivos), ambas especies de embriones con 7 días de gestación (Figura 1A). Con ayuda de microscopio estereoscópico se realizó la disección de ventrículos (Figura 1B).

Finalizada la disección de los ventrículos, se disgregó el tejido cardiaco en tripsina y DNasa en 4 series de 7 min a 37°C con agitación a 150 rpm (Figura 2A). Después de inactivar las proteasas, la suspensión celular se pasó por un filtro de 20 μm y se centrifugó a 1500 rpm (Figura 2).

El botón celular se resuspendió con medio M199 suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino y 5% de Suero de Caballo. Se realizó un primer sembrado de una hora, para el enriquecimiento de cardiomiocitos. Finalizada la hora de cultivo se recuperó el sobrenadante. Las células recuperadas fueron sembradas sobre cajas Petri de 35 mm con y sin cubreobjetos en densidades de 1.5×10^6 células/caja. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂. El primer cambio de medio se realizó a las 24 h y posteriormente cada 48 h.

Para favorecer la adhesión de los cardiomiocitos, las cajas de cultivo y cubreobjetos fueron tratados con gelatina. Se colocaron 500 μL de gelatina al 2% sobre las cajas Petri con y sin cubreobjetos, y se incubaron durante 2 horas a 37°C previo al sembrado de las células. Los cubreobjetos se esterilizaron con luz UV por 20 min, previo a la incubación con gelatina.

Inmunocitofluorescencia

Las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% el día 1, 2 y 5 de cultivo. Las células fijadas fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.1% por 15 minutos y se hizo un bloqueo de las muestras con albúmina sérica bovina al 1% por 30 minutos. Para la identificación de los cardiomiocitos, se utilizó anticuerpo monoclonal anti-actina cardiaca (Sigma A9357), incubado toda la noche a 4°C con dilución 1:100. Posteriormente las células se lavaron con PBS y se procedió a la incubación del anticuerpo secundario marcando con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC, Jackson 115-097-003) con dilución 1:200 durante una hora a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron 6 veces con PBS y se montaron sobre portaobjetos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) para contra teñir los núcleos.

Morfometría

Para la evaluación de la morfología celular, se seleccionaron regiones al azar de las cajas de cultivo. Se tomaron diversas microfotografías en un microscopio Axiovert 40 CFL (Zeiss), en objetivo 40x para su posterior análisis. El software AxioVision 4.8 (Zeiss), permitió determinar la longitud y área de las células. Las mediciones fueron realizadas antes del cambio de medio correspondiente.

Resultados

Fue posible la obtención de cultivos primarios cardíacos de origen embrionario, los cuales pudieron mantenerse hasta por 21 días, sin la utilización de antibiótico o antimicótico. En la Tabla 1 se muestra el número de células obtenidas, el número de células cultivadas, la morfología, el diámetro celular, la duración del cultivo y las modificaciones al protocolo original en cada uno de los cultivos. De los 10 cultivos realizados, los primeros 7 corresponden a células extraídas a partir de embriones de pato y los 3 restantes a células extraídas a partir de embriones de pollo.

A partir del cultivo 5 se pudieron observar los primeros cambios morfológicos, a las 24 h de haberse realizado el sembrado. La Figura 3 muestra diversas microfotografías con microscopía de campo claro, en diversos periodos de tiempo de los cultivos obtenidos.

En la Figura 3A se observan células con diversas morfologías, en la Figura 3B se pueden observar células con morfología rectangular y con longitudes mayores a los 100 μm . En las Figuras 3C, 3D, 3E y 3F, se observan cambios morfológicos de las células y formación de colonias. Las microfotografías obtenidas permitieron identificar posibles cardiomiocitos debido a la longitud de las células cultivadas, la cual corresponde a lo reportado por la literatura^[5, 6]. Los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia, mostraron poblaciones de células positivas a actina cardíaca, lo cual sugiere fuertemente la presencia de cardiomiocitos en el cultivo primario. La localización subcelular de la actina cardíaca, mediante microscopía de fluorescencia, muestra su distribución homogénea en el citoplasma, Figuras 4A, 4B y 4C. En azul podemos observar la localización de los núcleos celulares. Asimismo, podemos inferir una adecuada especificidad del anticuerpo hacia cardiomiocitos, debido a que el marcaje con DAPI, muestra que existen otros tipos celulares, que no son positivos al anticuerpo, tal y como se observa en la Figura 4D.

Discusión

Los primeros 7 cultivos se obtuvieron a partir de embriones de pato, debido a una donación que permitió iniciar este proyecto, posibilitando el perfeccionamiento de la técnica de disección, pues a los 7 días de incubación, los embriones de ambas especies son muy similares. Es importante mencionar, que al realizar una revisión bibliográfica, no encontramos reportada la utilización de embriones de pato para la generación de cultivos de cardiomiocitos embrionarios.

Como se observa en la Tabla 1, los cultivos 1, 2, 3, y 4 no presentaron viabilidad celular. A partir del cultivo 3 se realizaron las primeras modificaciones del protocolo original. La primera modificación consistió en cultivar sobre poli-L-lisina para descartar que el problema fuera el sustrato de adhesión celular, con resultados similares a los cultivos anteriores. Al no tener resultados favorables en el cultivo 4 se procedió a una segunda modificación, que consistió en recuperar y lavar los ventrículos en solución Hank a 37°C, con 2 objetivos: eliminar la mayor cantidad de células sanguíneas y aumentar la ventana de tiempo para la disección de los ventrículos. Así mismo, se filtró la suspensión celular, para evitar el paso de tejido no disgregado. A pesar de mejorar la calidad del botón celular, las células no fueron viables.

En el cultivo 5 se decidió cambiar el medio de mantenimiento rico en sales, por medio M199 suplementado con suero fetal bovino y suero de caballo. Durante este cultivo se obtuvieron los primeros resultados satisfactorios. A las 24 h se observaron en las células del cultivo cambios morfológicos, así como una confluencia del 90%. Este cultivo se mantuvo por 11 días. Lo cual permitió definir que la cantidad excesiva de sales en el medio, era la principal causante de no obtener células viables en los cultivos anteriores. Con los resultados del cultivo 5, se obtuvo un protocolo, el cual se reprodujo en cultivos posteriores.

El cambio de modelo animal de pato a pollo, se realizó en el cultivo 8 y se repitió la metodología obtenida en el cultivo 5, asumiendo condiciones fisiológicas similares entre ambas especies. En la utilización de embriones de pollo, se observó que las células cambiaron su morfología a las 48 h, en comparación con las células de pato que cambiaron su morfología a las 24 h, las cuales modificaban su morfología esférica a una morfología fibroblastoide, epitelial e incluso se pudieron observar células con aparente morfología neuronal.

Sin embargo, como se observa en la Figura 3, existe una gran cantidad de células con morfología fibroblastoide, lo cual fue corroborado en las inmunocitofluorescencias, ya que un gran número de células presentes en

el cultivo no dio positivo al anticuerpo anti-actina cardiaca. Esto dio paso a una última modificación del protocolo, para aumentar la población de cardiomiocitos, a través de un pre-sembrado de 1h de la suspensión celular inicial, tal y como lo sugiere la literatura ^[6], para enriquecer el cultivo de cardiomiocitos, debido a que durante la hora de sembrado las células no cardiacas se adhieren primero, disminuyendo su número en el cultivo final.

A pesar de ser un protocolo reproducible, es necesario optimizar aún más el protocolo, para aumentar el grado de purificación del cultivo de cardiomiocitos embrionarios. Esto podría ser posible a través del aumento en la duración del tiempo del enriquecimiento o bien con la utilización de inhibidores de mitosis para fibroblastos como se ha reportado ^[17].

Conclusiones

Fue posible obtener un protocolo que permitió el cultivo de cardiomiocitos embrionarios de ave de manera reproducible. Con base en los resultados, se pudieron identificar, en los cultivos primarios, cardiomiocitos. Estos resultados permitirán a futuro iniciar la evaluación de biomateriales que puedan ofrecer nuevas alternativas para la generación de tejido cardiaco *in vitro*.

Agradecimientos

Agradecemos el financiamiento recibido del Programa de Mejoramiento del Profesorado al cuerpo académico Fisiología Celular y Tisular (UAM-C-CA-33) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT181534).

Apéndice de imágenes

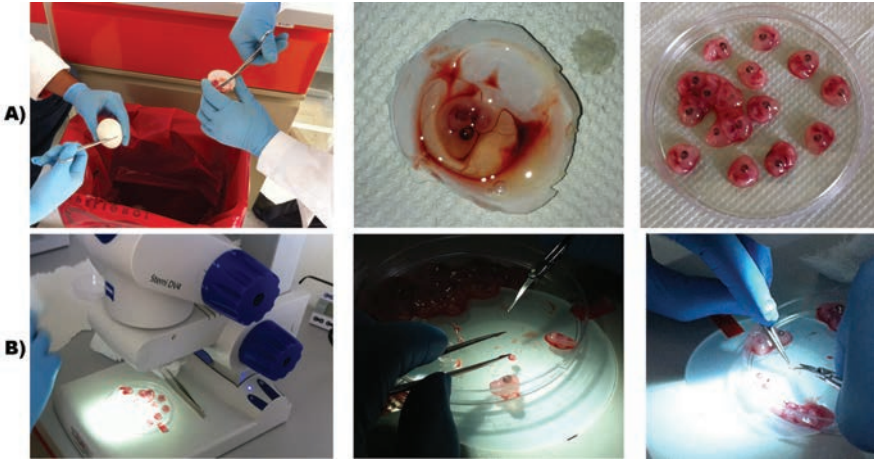


Figura 1. A) Obtención de embriones de pollo. B) Disección de ventrículos.

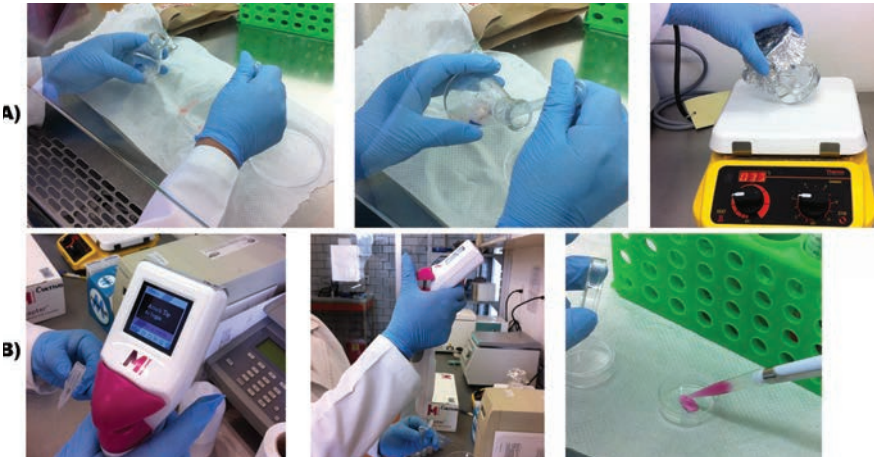


Figura 2. A) Disgregación mecánica y enzimática. B) Conteo celular.

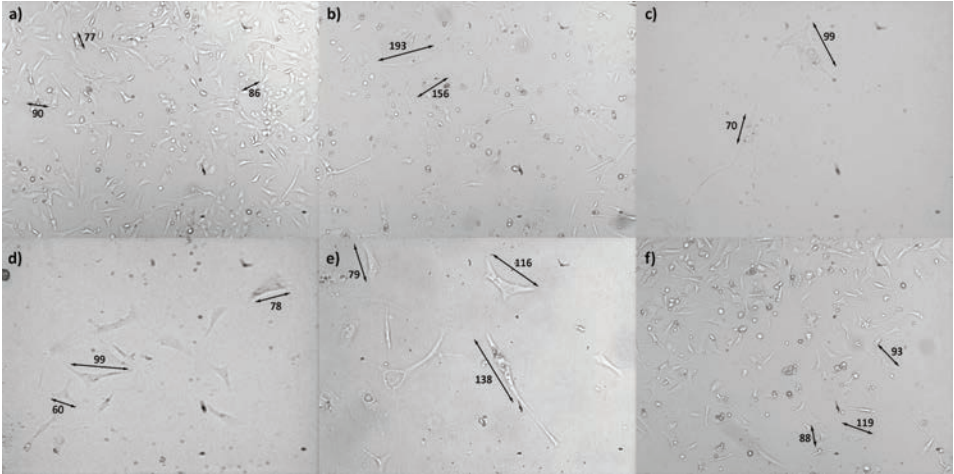


Figura 3. Longitud de algunas células (en μm) del cultivo primario de cardiomiocitos embrionarios de pollo sembrados sobre gelatina tras 2, 5, 12, 16, 19 y 21 días de cultivo (a, b, c, d, e, f, respectivamente). Objetivo 10x.

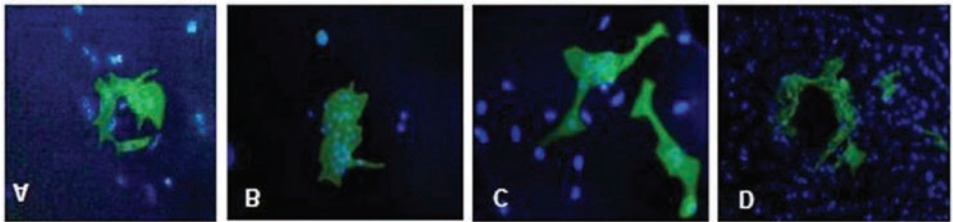


Figura 4. Inmunofluorescencias de las células del cultivo primario de cardiomiocitos embrionarios de pollo sembrados sobre gelatina, tras 1, 2 y 5 días en cultivo (a, b, y c, respectivamente). Los campos mostrados son representativos de 4 campos tomados de 5 preparaciones diferentes. En verde se observa la respuesta positiva a actina cardiaca. Objetivo 20x Las Figura 4D muestra una colonia celular. Objetivo 10x.

Tabla 1. Resultados obtenidos a lo largo de 10 cultivos.

Cultivos	Embriones de pato						Embriones de pollo			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N° Células/mL obtenidas	2.4 x 10 ⁶	Incont.	2.2 x 10 ⁶	3.5 x 10 ⁶	15.3 x 10 ⁶	46.9 x 10 ⁶	22.4 x 10 ⁶	33 x 10 ⁶	22 x 10 ⁶	13.5 x 10 ⁶
N° Células/mL sembradas	305,833	Incont.	210,000	588,931	2.5 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶ 8.9 x 10 ⁶	1.5 x 10 ⁶ 13.5 x 10 ⁶	5.0 x 10 ⁶ 30.0 x 10 ⁶	1.0 x 10 ⁶ 2.4 x 10 ⁶
Forma	Redonda	Redonda	Redonda	Redonda	Alargada	Alargada, estrella triangular	Alargada, estrella triangular	Alargada, estrella triangular	Alargada, estrella triangular	Alargada, estrella triangular
Morfología					Fibroblastoide Epiteloides	Fibroblastoide Epiteloides	Fibroblastoide Epiteloides	Fibroblastoide Epiteloides	Fibroblastoide Epiteloides	Fibroblastoide epiteloides
Longitud					49 µm	59.7 µm (24 h), 86.7 µm (3 d), 153 µm (7 d), 39.8 µm (14 d)	78 µm (24 h), 110 µm (5 d), 66 µm (3 d), 84 µm (9 d), 99 µm (12 d)	89 µm (48 h), 110 µm (5 d), 121 µm (9 d), 119 µm (12 d)	99 µm (48 h), 142 µm (5 d), 146 µm (7 d), 130 µm (14 d)	80 µm (24 h), 93 µm (5 d), 112 µm (7 d), 115 µm (10d)
Diámetro (0 horas)					6 - 12 µm	6 - 12 µm	6 - 12 µm	6 - 12 µm	6 - 12 µm	6 - 12 µm
Adhesión	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Viabilidad (días)	No	No	No	No	11	14	16	15	21	10
Modificaciones al protocolo inicial.			Poli-L-lisina	*Concentración de células en la caja *Solución Hank. *Uso del filtro.	*Concentración de células en la caja. *Medio M-199, modificado				Incubación de 1 h en una primera siembra	Incubación de 1 h en una primera siembra

Referencias

- [1] World Health Organization. (2014), [ONLine]: Health topics. [Accessed: August 03, 2014]. Available.
- [2] C. Galvez-Monton C., Prat-Vidal S., Roura C., Soler-Botija A. (2013), Ingeniería tisular cardíaca y corazón artificial, Rev. Esp. Cardiol, vol. 66(5):391-399.
- [3] Boccacini A., Harding S. (2011), Myocardial Tissue Engineering, Springer, vol. 6.
- [4] Rabkin F. Schoen J. (2002), Cardiovascular Tissue Engineering, Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology, 11(6):305-317.
- [5] Tortora, Derickson. Principios de Anatomía y Fisiología. Edit. Panamericana. 11ª edición.
- [6] Sreejit P., Kumar S., Verma R. S. (2008), An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice, In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim., vol. 44, no. 3-4, pp. 45-50.
- [7] Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B. (2001), Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, Nature 410(6829), 701-705.
- [8] Schachinger, V., Erbs, S., Elsasser, A., Haberbosch, W., Hambrecht, R., Holschermann, H. (2006), Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial, Eur. Heart J. 27(23), 2775-2783.
- [9] Amado L.C., Saliaris A.P., Schuleri K.H., St John M., Xie J.S., Cattaneo S. (2005), Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(32), 11474-11479.
- [10] Sanz-Ruiz R., Villa Arranz A., Ibañes E.G., Fernández Santos M., E, Sánchez Fernández P.L., Fernández-Avilés F. (2011), RandomizedClinicalTrials in StemCellTherapyforthe Heart, Old and New Types of Cellsfor Cardiovascular Repair.

- [11] Zimmermann W.H., Schneiderbanger K., Schubert P., Didie M., Munzel F., Heubach J.F., Kostin S., Neuhuber W.L., Eschenhagen T. (2002), Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct, *Circ. Res.* 90(2), 223–230.
- [12] Naito H., Melnychenko I., Didie M., Schneiderbanger K., Schubert P., Rosenkranz S., Eschenhagen T., Zimmermann W.H. (2006), Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle, *Circulation* 114(1 Suppl), I72–I78.
- [13] Huang Y.C., Khait L., Birla R.K. (2007), Contractile three-dimensional bioengineered heart muscle for myocardial regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. A* 80, 719–731.
- [14] Powell C.A., Smiley B.L., Mills J., Vandenberg H.H. (2002), Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C1557–C1565.
- [15] Radisic M., Park H., Shing H., Consi T., Schoen F.J., Langer R., Freed L.E., Vunjak-Novakovic G. (2004), Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiomyocytes cultured on scaffolds, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 18129–18134.
- [16] Terrón de Alba C.J., González Gómez G.H. (2012), Efecto de dos sustratos celulares sobre la actividad espontánea de cardiomiocitos en cultivo, Tesis de licenciatura en Biología, UNAM.
- [17] Pura Hortigon Vinagre, M., Henao Dávila, F. (2012), Muerte celular en cardiomiocitos tras exposición al producto de peroxidación lipídica 4-hidroxi-2-nonenal. Desregulación del transporte de calcio en retículo sarcoplásmico, Tesis de doctoral, Universidad de Extremadura.