



UNIVERSIDAD DEL ZULIA  
**REVISTA CIENTÍFICA**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN



MARACAIBO, ESTADO ZULIA, VENEZUELA



# CÉLULAS DE LINAJE NEURAL PRODUCIDAS POR DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADIPOSAS PARA TERAPIA REGENERATIVA EN CANINOS

## Neural Lineage Cells Produced by Differentiation of Adipose Stem Cells for Regenerative Therapy in Canine

Javier Enciso-Benavides<sup>1</sup>; José Amiel-Pérez<sup>1</sup>; Nancy Rojas-Morán<sup>2</sup> y Javier Enciso-Gutiérrez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Cultivo Celular e Inmunología. Universidad Científica del Sur. Lima. Perú

<sup>2</sup> Laboratorio de Microscopía Electrónica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. Perú.

\*Correspondencia: [HYPERLINK "mailto:jenciso@cientifica.edu.pe" jenciso@cientifica.edu.pe](mailto:jenciso@cientifica.edu.pe)

### RESUMEN

Las células madre facilitan la regeneración nerviosa produciendo factores neurotróficos y diferenciándose a cualquier tipo de linaje neural. Patologías agudas y crónicas del sistema nervioso pueden comprometer uno o varios de estos linajes, por lo que la terapia regenerativa con células madre alogénicas dará mejores resultados si son pre diferenciadas. El objetivo de este trabajo fue demostrar que los aislados de células madre adiposas (CMA) caninas se transdiferencian en linaje neural en alto porcentaje poblacional, mediante un protocolo de pre inducción e inducción y en tiempo determinado. Con este fin, 5-10 gramos de grasa de cinco perros fueron tratados a 37°C con Colagenasa tipo I, el pellet fue sembrado en Medio Eagle Modificado de Dulbecco + 10% de suero fetal bovino + penicilina/estreptomicina/anfotericina B. Pasajes 2-5 de CMA fueron evaluados en su multipotencialidad de diferenciarse en tres linajes, su pluripotencia por expresión del factor de transcripción Oct4, la morfología por microscopía electrónica de barrido. La diferenciación a linaje neural se realizó en dos pasos: pre-inducción con el Factor básico de crecimiento de fibroblastos, y la inducción con 2% de dimetil sulfoxido y 200 mM de hidroxibutilanisol (BHA). La identificación del linaje neural (nestina<sup>+</sup>) se realizó por inmunohistoquímica a diferentes horas pos inducción, contándose 400 células. Los resultados muestran que los aislados fueron adherentes al plástico y con morfología de fibroblastos, multipotentes al diferenciarse en osteocitos, condrocitos y lipocitos, la mayoría de ellas son Oct4<sup>+</sup> (55,4 % ± 1,86); las células inducidas se diferenciaron al linaje neural nestina<sup>+</sup> (70%), con morfología de neuroesferas y neuronales a cuatro horas (h) pos inducción. Se concluye que el 70% de células madre adiposas del pasaje 2-5 se diferencian en células nestina positivas con morfología de neuroesferas y neurales cuatro h pos inducción, pudiendo ser utilizadas en terapia celular frescas o criopreservadas. Este es el primer reporte de células madre adiposas caninas diferenciadas a linaje neural con fines terapéuticos en Perú.

**Palabras clave:** Célula madre adiposa; diferenciación neural; caninos; nestina.

### ABSTRACT

Stem cells facilitate nerve regeneration by producing neurotrophic factors and differentiating into any type of neural lineage. Acute and chronic pathologies of the nervous system can compromise one or more of these lineages, so regenerative therapy with allogeneic stem cells will give better results if they are pre-differentiated. The objective of this work was to demonstrate that the canine adipose derived mesenchymal stem cell (cAd-MSC) isolates were transdifferentiated into neural lineage in a high percentage population, using a protocol of pre induction and induction and in a determined time. Consequently, 5-10 grams (g) of five dog fat was treated at 37°C with Type I collagenase, the pellet obtained was seeded in Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 10 % Fetal Bovine Serum + penicillin / streptomycin / amphotericin B. Cells presented in passages 2-5, cAd-MS were characterized by evaluating their ability to differentiate in three lineages, assess their pluripotency identifying the transcription factor Oct4 expression and evaluating the morphology by scanning electron microscopy. Differentiation to neural lineage was performed in two treatment steps: pre-induction using basic fibroblast growth factor (bFGF) and induction using 2% Dimethyl sulfoxide and 200 mM of butylated hydroxyanisole (BHA). Identification of the neural lineage (nestin<sup>+</sup>) was performed by immunohistochemistry at different hours (h) after induction, counting 400 cells. The results show that the isolates were adherent to plastic and fibroblast morphology, multipotent when differentiated into osteocytes, chondrocytes and adipocytes, most of them were Oct4<sup>+</sup> (55.4% ± 1.86); induced cells were able to differentiate into nestin<sup>+</sup> cells (70%), with neuronal and neuronal morphology four h post induction. It was concluded that 70% of adipose derived mesenchymal stem cells present in passages 2-5 differentiated into nestin positive cells with neural and neuronal morphology four h post induction, and could be used in fresh or cryopreserved cell therapy. This is the first report of differentiated canine adipose stem cell culture to neural lineage in Peru.

**Key words:** Stem cells; neural differentiation; canine; nestin.

## INTRODUCCIÓN

Las células madre son células indiferenciadas capaces de auto-renovarse y de diferenciarse en células de linajes específicos [10], pueden ser embrionarias y adultas, su papel principal en la mayoría de tejidos es homeostático, es decir, para reponer las células perdidas por desgaste o lesión [29]. Por otro lado, las células madre adiposas (CMA) representan una población independiente de células madre provenientes de tejidos adultos, que han alcanzado una diferenciación parcial con potencialidad restringida, con capacidad para diferenciarse hacia linajes definidos, especializados y específicos [14], tienen efectos inmunosupresores, inmunomoduladores, regeneradores y angiogénicos [18]. Se reconoce como CMA aquellas que en cultivo tienen morfología de fibroblastos, capacidad de adhesión al plástico, son multipotentes al diferenciarse a los linajes osteogénico, condrogénico y adipogénico [19], muestran indiferenciación al expresar el factor de transcripción Oct4, que es un factor de transcripción clave esencial para la auto renovación y supervivencia de las células madre mesenquimales, a su vez, tiene un rol único en el desarrollo y determinación de pluripotencia [32], habiéndose demostrado que en células madre adiposas de pasajes entre 3 a 5, hay mayor sobreexpresión de los genes Oct4 y Sox2 en donantes. Así mismo, mediante citometría o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede demostrarse expresión de algunos de los marcadores de superficie CD90, CD105, CD73, CD44, CD166 y ausencia de expresión de CD45 y CD34 [8].

Las CMA son utilizadas en aplicación clínica para reparar o regenerar tejido dañado, por su fácil accesibilidad con procedimientos poco invasivos que permiten obtener alta densidad celular [3], así como por cumplir funciones de células progenitoras tejido-específicas, y por sus mecanismos de acción, al participar en la señalización paracrina de la angiogénesis, de la inflamación, en la adaptación y supervivencia celular y otros mecanismos de acción primarios [17], además, son poco inmunógenas y tienen potente efecto inmunosupresor, que las hace atractivas para terapia con células madre alogénicas [26].

La aplicación de CMA autólogas en terapia de injurias agudas de la cuerda espinal en caninos (*Canis lupus familiaris*) es promisorio con base a ensayos pre clínicos y clínicos [31, 39], en humanos, además lo es para lesiones cerebrales [41]; en tanto que las células alogénicas han demostrado factibilidad y seguridad en lesiones crónicas [9], en algunos ensayos su acción desaparece rápidamente, pero tienen mayor expectativa de aplicación por la alta casuística de esta patología, por la amplia población de pacientes que podría recibir terapia regenerativa con este tipo de células, así como por ventajas de tiempo, costo y control de calidad [44].

En modelos animales se han publicado muchos trabajos sobre el empleo de CMA en desordenes neurodegenerativos similares a los que se presentan en el envejecimiento e infarto en humanos [11], en hemorragia cerebral inducida en caninos [26], en

lo cuales, también se ha reportado diferenciación experimental a linaje neural a partir de células madre mesenquimales de médula ósea [1, 25] mientras que en humanos y ratones (*Mus musculus*) se reporta a partir de células madre adiposas [36], para lo cual emplearon inductores específicos de transdiferenciación.

Esta transdiferenciación se determina por la expresión de marcadores neurales en las células madre diferenciadas, dentro de éstos, el marcador nestina es el más utilizado, está altamente expresada en progenitores neurales y es promovida por la estimulación mitogénica de las células madre adiposas [7].

En la terapia regenerativa de desórdenes del sistema nervioso en caninos, se recomienda usar CMA diferenciadas en la dirección neuronal que puedan expresar marcadores tales como: nestina,  $\beta$ III-tubulina y la proteína asociada al microtúbulo (MAP2) [5], en humanos, de manera similar se recomienda que además de la morfología, y los marcadores previos, también pueden evidenciarse los marcadores: vimentina y la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) [42].

Sin embargo, en trabajos recientes relacionados a terapia experimental y ensayos clínicos en humanos que utilizan CMA en enfermedades autoinmunes y neuropatías periféricas, se resalta el problema de no existir apropiadas guías regulatorias a nivel mundial, lo que exige considerar mayores estudios de eficacia y seguridad [6].

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue demostrar que, aislados de CMA caninas, se transdiferencian en células de linaje neural nestina positivas en porcentaje poblacional de aplicabilidad clínica, mediante un protocolo de pre inducción e inducción y en un tiempo determinado pos inducción, que permita establecer procesos de producción de células neurales para terapia regenerativa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tejido adiposo

Mediante procedimiento quirúrgico se tomaron cinco a diez gramos (g) de tejido adiposo subcutáneo de la región glútea de cinco perros de 2-7 años de edad, para lo cual se obtuvo el consentimiento informado de los dueños y se contó con la autorización del Comité de Ética de la Universidad Científica del Sur de Lima, Perú. Los animales fueron anestesiados mediante la asociación de 1mg/kg de Xylacina más 10 mg/kg ketamina. Inmediatamente y con la mayor asepsia fue depositada en medio de cultivo Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina/estreptomicina/anfotericina B (100U/mL 100µg/mL, 0,25 µg/mL y mantenida a 4°C (General Electric, Modelo PFNS5NJZSS, México) durante 12 horas (h) hasta su procesamiento en el laboratorio de cultivo celular de la Universidad Científica del Sur, Lima Perú.

Las muestras de tejido graso fueron lavadas en solución de tampón fosfato (PBS siglas en inglés) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (EMSURE® ISO) con pH 7,4 (SCHOTT, Lab 850, 11380371) para luego ser cortadas en pequeños trozos en un mortero estéril. Después se procedió a lavar dos veces con PBS, en seguida se añadió una solución de colagenasa tipo I (Invitrogen, Estados Unidos de Norteamérica, EUA) al 0,075% agitando a 37°C durante 40 minutos (min) como fue descrito previamente [45].

Posteriormente, se pasó por un filtro de 40  $\mu\text{m}$  y la fase líquida se centrifugó (Boeco, C-28 A. Alemania) a 700 G durante 10 min. Luego de eliminar el sobrenadante, el pellet obtenido fue suspendido en un medio de cultivo DMEM (Invitrogen, EUA), suplementado con 10% de SFB y antibióticos (100U/mL de penicilina G, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de sulfato de estreptomycin y 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anfotericina B) en frascos de cultivo celular de 50 mL (Falcon®).

Las células adherentes fueron mantenidas a 37°C en una incubadora (MEMMERT, modelo INCO, serie MIM12880-1, Alemania) con 5% de  $\text{CO}_2$  y humidificada al 95%, realizando cambios de medio de cultivo cada 72 h, hasta alcanzar una semiconfluencia del 70% cuando se tripsinisan y se sub-cultivan en frascos de 75  $\text{cm}^2$ , para expandir las poblaciones celulares con el fin de realizar la caracterización y diferenciación celular.

### Caracterización

Los aislados celulares obtenidos para los ensayos de transdiferenciación fueron obtenidos en base a un protocolo de aislamiento y caracterización de células madre utilizado en un trabajo previo [16], demostrando que, siguiendo este protocolo, se obtienen CMA porque reunían las cualidades básicas de morfología, multipotencialidad, indiferenciación e inmunofenotipo (CD90+/CD105+ y CD45-) exigidas por consenso [15].

Para los ensayos de este trabajo, la caracterización de aislados celulares obtenidos, se realizó empleando células de los pasajes 2-5, considerados los más satisfactorios para terapia celular, que fueron cultivados empleando el mismo medio de cultivo y en el mismo microambiente. El primer criterio a demostrar fue sus cualidades morfológicas, el segundo criterio fue su multipotencialidad y el tercer criterio fue la indiferenciación, cualidades fundamentales para los objetivos de este trabajo.

### Células

Células adherentes de los pasajes 2-5 aislados en este trabajo fueron sembradas en frascos de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  en una concentración inicial de  $5 \times 10^3$  células/ $\text{cm}^2$ , empleando como medio de cultivo DMEM-F12 (Invitrogen) suplementado con 10% de SFB, glucosa 4,5 y 1% de antibióticos, e incubadas en 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad hasta alcanzar el 70% de confluencia, que fue cuando se utilizaron para las pruebas de diferenciación y microscopía electrónica de barrido [28]. Con este fin, luego de

tres lavados con PBS, se desprendieron las células con tripsina al 0,25% por 3-5 min a 37°C, posteriormente se centrifugó a 100 G por 5 min. La viabilidad celular se determinó mediante tinción Azul Tripán y usando un citómetro de mano (Scepter 2.0, ANO1B15V, EUA) se contó la población celular según las necesidades de cada ensayo.

### Microscopía electrónica de barrido

Con el fin de confirmar la morfología de CMA, aislados de células de pasajes 2-5 fueron sembradas en placas Petri de 100 mm que contenían cubreobjetos estériles tratados con Poly-L-lysina 0,1% en medio de cultivo DMEM-F12, 10% de SFB y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomycin/anfotericina B), hasta alcanzar una confluencia de 50%, se retiró el medio de cultivo, se lavó con PBS y fueron retiradas de la placa petri para su fijación con 2% glutaraldehído en tampón Cacodilato 0,1 M a pH=7,4, por 1 h a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas tres veces por 10 min usando Tampón Cacodilato + Sacarosa isosmolar con el fijador.

La pos fijación se realizó con tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1% en Cacodilato, por 1 h en oscuridad y a 4°C, inmediatamente se lavó por tres veces con Cacodilato, por 10 min. Posteriormente se deshidrató en series crecientes de etanol (30; 50; 70; 90; 96; 100 % y dos veces usando etanol absoluto), por 10 min en cada concentración. Seguidamente se llevó a desecado al punto crítico (EMS critical point dryer). Finalmente se realiza el recubrimiento metálico con oro en un metalizador para visualizar y fotografiar en un microscopio electrónico de barrido INSPECT S50 (FEI, Hillsboro, Oregon, EUA).

### Determinación de la multipotencialidad

Con este objetivo se sembró células ( $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ ) de pasajes 2-5 en placas de 12 pocitos conteniendo cubreobjetos tratados con Poly-L-lysina 0,1% y esterilizadas por exposición a luz ultravioleta (UV) por 12 h, en medio DMEM-F12 con 10% de SFB y 1% de antibióticos (Penicilina/estreptomycin/anfotericina B) por 48 h a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de humedad, evaluando previamente la viabilidad celular como se describió en este trabajo; para ser diferenciadas en linajes osteogénico, condrogénico y lipogénico, siguiendo los protocolos que se resumen a continuación.

#### (a) Diferenciación osteogénica

Para inducir al fenotipo osteogénico, el medio de cultivo fue cambiado por el medio de diferenciación osteogénica (StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit, Gibco) que contiene 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 0,2 mM ácido ascórbico y  $10^{-7}$  M de dexametasona, por 21 días (d) con cambios de medio cada tres d. Para confirmar la diferenciación osteogénica se usó la tinción Alizarin Red S (Sigma-Aldrich), que en resumen consiste en remover el medio osteogénico y lavar tres veces en PBS, fijar en etanol 70% a 4°C durante 1 h, después de la fijación se lavó con agua desionizada y se secó al aire a temperatura ambiente.

Las células fijadas fueron teñidas con Alizarin red S 2%, pH 7,2 a 37°C por 1 h, se lavó con agua desionizada y se fotografió en un microscopio compuesto (NIKON, Eclipse E200, serie 148606, EUA).

### **(b) Diferenciación condrogénica**

La diferenciación a linaje condrogénico se indujo empleando el medio de cultivo StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco), que resumido consiste en, luego de lavar con PBS la monocapa de células en las microplacas de 12 pocillos, se añadió el medio para condrogenesis y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, se cambió de medio cada tres d hasta completar los catorce d en que se somete a tinción Alcian Blue, para lo cual, se removió el medio de cultivo, se lavó con PBS tres veces por tres min cada lavado, se fijó con Formaldehído al 4% por treinta min. Luego se lavó con PBS y se aplicó la solución de Alcian Blue 1% preparada en 0,1 N HCl por treinta min. Luego, se lavó tres veces con 0,1 N HCl, se añadió agua destilada para neutralizar la acidez, y finalmente se visualizó bajo microscopio compuesto (NIKON, Eclipse E200, serie 148606, EUA) capturando imágenes para análisis. La tinción azul indica síntesis de proteoglicanos por condrocitos.

### **(c) Diferenciación adipogénica**

La diferenciación en linaje adipogénico se indujo mediante el medio de cultivo para diferenciación adipogénica, el cual contiene 50 µg/mL de indometacina, 50 µg/mL de ácido ascórbico y 100nM de dexametasona (StemPro® Adipogenesis differentiation kit, Gibco) durante 21 d, con cambios de medio cada tres d. La diferenciación adipogénica fue confirmada usando la tinción Oil Red O (Sigma). El medio adipogénico fue removido y lavado tres veces en PBS, las células fueron fijadas en formalina 10% por 30 min a temperatura ambiente, lavadas con agua destilada y tratadas con 2mL de isopropanol (60%) por 5 min. Luego se remueve y se tinte con Oil Red O (2 mL por pocillo) por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente las células son lavadas en agua y fotografiadas con un microscopio invertido (NIKON, Eclipse TI-5, serie 535430, EUA).

### **Determinación de indiferenciación**

Para ratificar que los aislados eran células indiferenciadas se evaluó la expresión del factor de transcripción Oct4, mediante inmunocitoquímica empleando un anticuerpo anti proteína Oct4 (Invitrogen Inc). Con este objetivo, cubreobjetos tratados con poly-L-lyisina 0,1% en agua desionizada por 30 min y secadas a 60°C por 2 h, fueron esterilizadas por exposición a UV, depositadas en microplacas de cultivo celular de 12 pocitos, sembrándose sobre ellas las células de los aislados, y cultivadas en medio de cultivo DMEM más 10% de SFB y antibióticos 1% (Penicilina-estreptomocina), hasta obtener una confluencia de aproximadamente 70%. Los lavados se realizaron con PBS a pH 7,4.

Luego de alcanzar esta confluencia, se aplicó el protocolo para inmunocitoquímica del fabricante (Invitrogen, EUA), con este fin, las células se lavaron con PBS pH 7,4 por tres veces de 3 min cada lavado, se fijó en una solución de metanol-acetona fría (25:75%) por 30 min, seguido de lavado en PBS pH 7,4, tres veces por tres min cada uno. A continuación se aplicó solución bloqueadora del suero por 10 min, luego se aplicó el anticuerpo primario por 60 min en cámara húmeda, se lavó en PBS tres veces por 3 min cada uno, y se aplicó el anticuerpo secundario por 20 min, posteriormente, se lavó tres veces por 3 min cada lavado, y se aplicó HRP-Streptavidina por 10 min. Finalmente, para el revelado se usó el cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 3 min y se lavó con agua destilada, finalmente la contratinción se realizó con hematoxilina.

### **Producción de células con linaje neural**

Las CMA fueron diferenciadas a linaje neural tomando como base una metodología ya descrita [25]. Una vez aisladas fueron cultivadas, mantenidas y expandidas en medio de cultivo DMEM/F-12 + antibióticos 1%, en una placa de 100 mm a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

Posteriormente, se sembró en placas de 12 pocitos (10<sup>4</sup>células/pocillo) en cinco repeticiones para cada período de inducción. Inicialmente fueron sometidas a un período de pre-diferenciación con medio DMEM/F-12 (Sigma, Inc. EUA), más Factor de Crecimiento de Fibroblastos básico (bFGF por sus siglas en inglés) (10ng/mL) y antibióticos (Penicilina-estreptomocina), por un período de 24 h. Después de este período inmediatamente se cambió a un medio de inducción que estaba constituido de DMEM/F-12 (Sigma, Inc. EUA), más hidroxibutilanisol (BHA por sus siglas en inglés) (200mM) y dimetil-sulfóxido (DMSO) (2%) por un periodo de 5 hs. Finalmente, al término de este tiempo, se cambió a un medio de diferenciación final constituido por el suplemento libre de suero denominado N-2 (1%) (Thermo Fisher Scientific, EUA), además, transferrina humana, insulina recombinante y progesterona (Invitrogen Cat. 17502) en medio de cultivo DMEM/F-12 (Sigma, Inc. EUA) y antibióticos 1 % (Penicilina-estreptomocina), cambiándose de medio cada 48 h. Como control se utilizó células madre adiposas caninas mantenidas en DMEM/F12 evaluado a las 4 h de inducción.

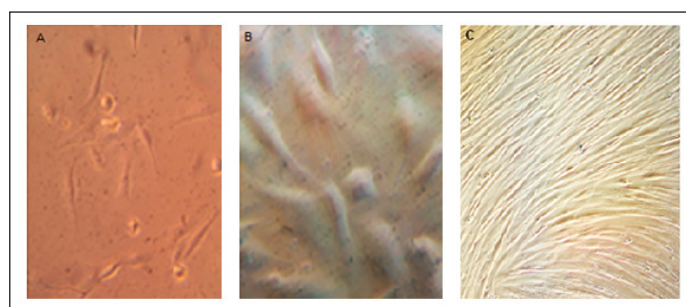
El tiempo de diferenciación celular al linaje neural continuó en mantenimiento hasta los 6 d. Para la inmunocitoquímica se tripsinizaron las células de cada pocillo de la placa de cultivo celular y se centrifugó a 700g por 10 min, posteriormente, se realizó impronta y frotis en portaobjetos tratados con Poly-L-lyisina-acetona fría al 0,5%. Un esquema de todo el protocolo se puede observar en la FIG. 1.

### **Identificación del fenotipo neural**

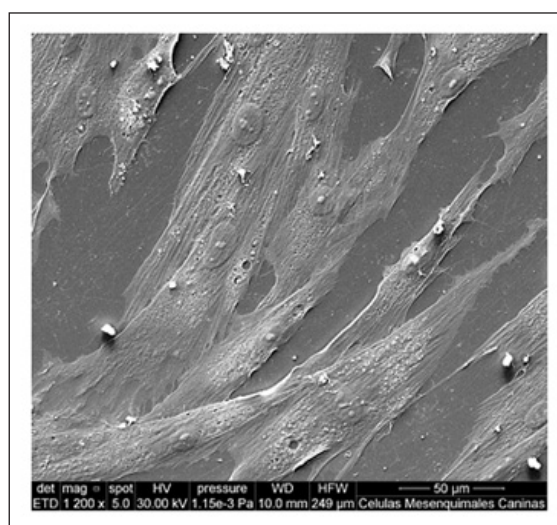
Para identificar y cuantificar la diferenciación celular al fenotipo neural, se planteó iniciar el estudio a las 24 h de pre inducción como se establece en la TABLA I. Las láminas

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

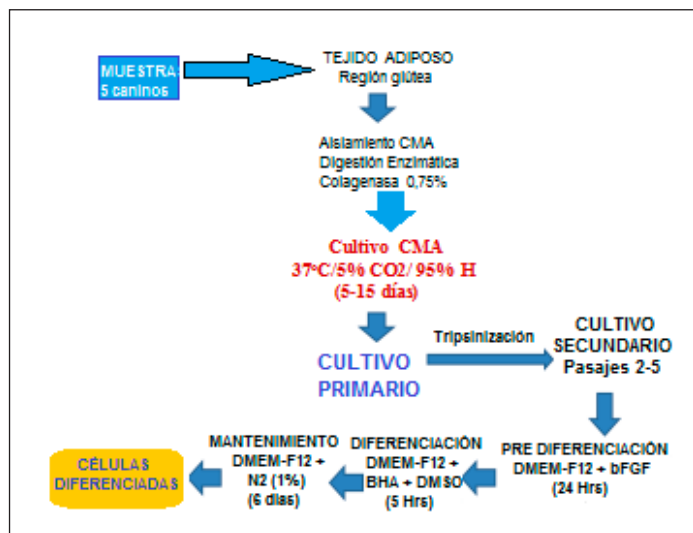
Siguiendo el protocolo establecido, obtuvimos cinco aislados de CMA que fueron mantenidas en medio de cultivo DMEM con 10% de SFB y 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). Las células fueron adherentes al plástico y de morfología alargada similar a fibroblastos al microscopio invertido (FIG. 2. A-B-C) y ratificada en microscopía electrónica de barrido (FIG. 3). La multipotencialidad de estos aislados se demostró al lograr diferenciarlas en los tres linajes de consenso: adipogénico, condrogénico y osteogénico, como se aprecia en la Fig. 4, en la que se identifican adipocitos mediante la tinción Oil Red O (FIG. 4A), osteoblastos mediante Alcian Blue (FIG. 4B) y osteocitos mediante Alizarin red S evidenciándose material mineralizado, (FIG. 4 C), cualidades que se han establecido como inherentes a células madre adultas [9].



**FIGURA 2. CÉLULAS MADRE ADIPOSAS DE PASAJE 2. (A) CÉLULAS CON MORFOLOGÍA DE FIBROBLASTOS 48 HORAS, 10X (B) CÉLULAS AISLADAS CON INTENSA ADHESIÓN AL PLÁSTICO DE LA PLACA DE CULTIVO, 40X; (C) MORFOLOGÍA DE CÉLULAS MADRE ADIPOSAS AL 100% DE CONFLUENCIA. 10X. MICROSCOPIO INVERTIDO.**



**FIGURA 3. MORFOLOGÍA FUSIFORME DE CÉLULAS MADRE ADIPOSAS CANINA ADHERIDA A LA SUPERFICIE CON SU RESPECTIVO NÚCLEO Y UNIONES INTERCELULARES. MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO. 1200X.**

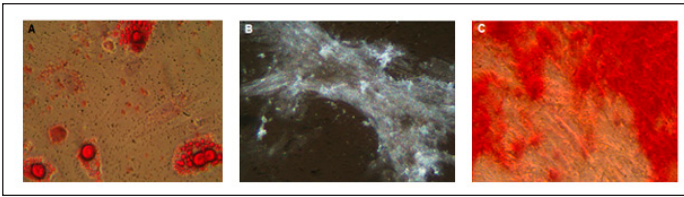


**FIGURA 1. FLUJOGRAMA DE LA METODOLOGÍA UTILIZADA PARA EL AISLAMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADIPOSAS CANINA A CÉLULAS DE FENOTIPO NEURAL.**

fueron fijadas en una solución de metanol-acetona (25-75%), se identificaron las células madre adiposas inducidas a diferenciación celular, mediante la determinación de la presencia en el citoplasma celular de la molécula Nestina que es un marcador de célula madre neural, para ello se empleó el anticuerpo Rabbit Anti-Nestin Human (Invitrogen, EUA). Con este objetivo se usaron láminas portaobjetos estériles cubiertas de poli-L-lisina depositadas en placas petri para cultivo celular. El procedimiento de inmunocitoquímica (ICQ) se realizó siguiendo el protocolo del fabricante como se describe en determinación de la indiferenciación en este trabajo (Invitrogen, EUA). Los datos se presentan como la media  $\pm$  desviación estándar donde cada valor fue por quintuplicado dentro de cada grupo.

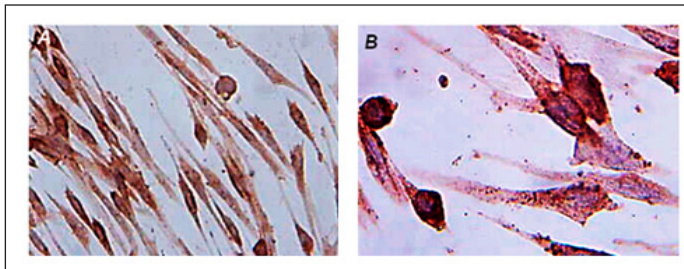
**TABLA I  
PERÍODO Y TIEMPO DE TOMA DE MUESTRA PARA INMUNOTINCIÓN CON NESTINA, DE LOS CULTIVOS CELULARES INDUCIDOS A DIFERENCIACIÓN NEURAL**

Tiempo de tratamiento	Período
24 hr	Pre-Inducción (p-i)
30'	Inducción (i)
2 hr	Inducción(i)
4 hr	Inducción(i)
5 hr	Inducción(i)
4 hr	Post-inducción (pi)
12 hr	Post-inducción(pi)
24 hr	Post-inducción(pi)
72 hr	Post-inducción(pi)
96 hr	Post-inducción(pi)
6 días	Post-inducción(pi)



**FIGURA 4. CÉLULAS MADRE ADIPOSAS DIFERENCIADAS EN ADIPOCITOS, OIL RED O, 20X (A), EN OSTEÓBLASTOS, ALCIAN BLUE, 40X (B), EN OSTEÓCITOS, ALIZARIN RED S, 20X (C).**

En tanto que el  $55,4\% \pm 1,85$  de células aisladas en este trabajo demostraron inmunoreactividad positiva al marcador Oct4 mediante inmunocitoquímica (FIG. 5).

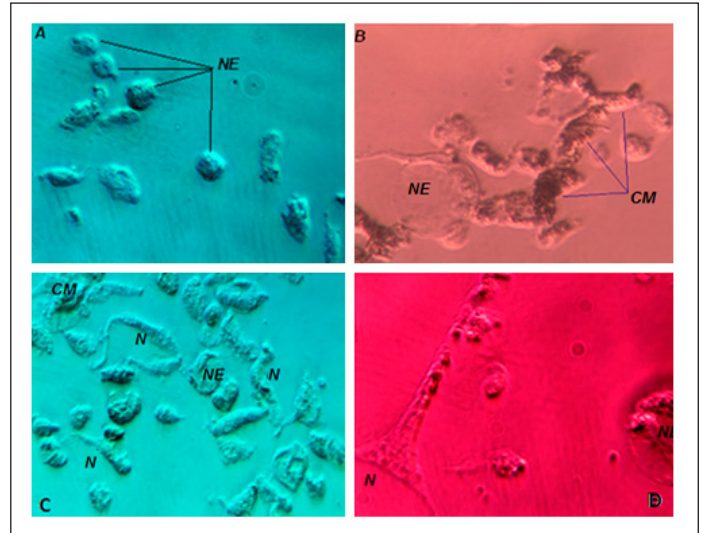


**FIGURA 5. CÉLULAS MADRE ADIPOSAS CANINAS OCT4+. (A) 40X. (B) 100X. INMUNOCITOQUÍMICA (HRP). HEMATOXILINA COMO TINCIÓN DE CONTRASTE.**

Cualidad de importancia para los fines de la terapia celular neural, pues la expresión de Oct4 permite generar células de linaje neuronal funcionales [13], demostrando así su plasticidad [20] que puede permitir obtener grandes poblaciones de células progenitoras neurales, con fines de terapia celular alogénica en determinados desórdenes neurológicos en caninos, tomando como base su estado inmunoprivilegiado [9], sin embargo, otros autores encontraron que estas células son rechazadas después que cumplen su rol terapéutico [30], lo que plantea la necesidad de nuevos ensayos para establecer los períodos válidos de acción terapéutica.

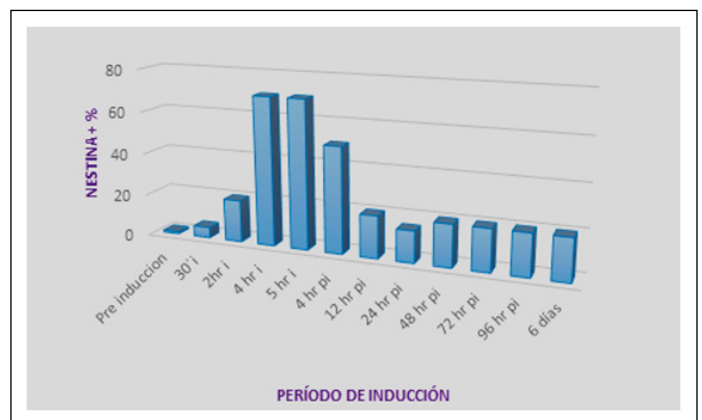
Este porcentaje de células Oct4 positivas es similar al reporte obtenido en un trabajo con células madre de tejido adiposo humano y primate [23], difiere notablemente de otros investigadores quienes en aislados frescos de humanos encontraron poblaciones muy bajas como el 1,9% [27], en otros trabajos no encontraron células que respondieran positivamente al marcador [9], también se reporta diferencias en reactividad a Oct4 entre cultivos frescos positivos y del tercer pasaje que se tornan negativos [38], en este estudio no se evaluó diferencias de esta cualidad entre los aislados de los pasajes 2-5 estudiados.

Por otro lado, con el protocolo utilizado se diferenció CMA a células con linaje neural positivas al marcador nestina y con morfología de neuroesferas y neuronal (FIG. 6), este es un marcador de multipotencialidad [22] que es expresado en células progenitoras neurales [12].



**FIGURA 6. DIFERENCIACIÓN A FENOTIPO DE LINAJE NEURAL A PARTIR DE CÉLULAS MADRE ADIPOSAS (CMA), (A Y B) NEUROESFERAS (NE). 20X, (C) CÉLULAS CON FENOTIPO NEURONAL (N) Y NEUROESFERAS (NE), CÉLULAS MADRE (CM). 40X. (D) FENOTIPO NEURONAL (N), NEUROESFERA (NE), 96 HORAS POST-INDUCCIÓN. 100X.**

En la FIG. 7, se muestra la inmunoreactividad a nestina en función al tiempo, el proceso de inducción comprende tres etapas: pre-inducción por 24 h, inducción por 5 h y pos-inducción por 6 d. El tiempo de inducción en h influye sobre el porcentaje de células nestina positivas, logrando apreciar que a 30 min de inducción ya hay células diferenciadas, sin embargo, se incrementa a las 2 h del inicio de la inducción ( $20\% \pm 1,41$ ) y alcanza el mayor porcentaje a las 5 h de inducción ( $70\% \pm 2,28$ ), para luego observar que la inmunoreactividad frente a este marcador decae y se mantiene en un  $20\% \pm 1,78$  a los seis d posteriores del fin de la inducción.



**FIGURA 7. INMUNOTINCIÓN DE CÉLULAS NESTINA POSITIVAS (+) SEGÚN EL PERÍODO DE INDUCCIÓN A DIFERENCIACIÓN NEURAL. I: INDUCCIÓN. PI: POS INDUCCIÓN.**

Si bien esta diferenciación se inicia a los 30 min iniciada la inducción, la mayor población nestina positiva se alcanza a las 4 h post inducción, a diferencia de otros trabajos que logran células con morfología neural y positividad a los marcadores neurales nestina,  $\beta$ III-tubulina y MAP2 a 1 h pos inducción [5], considerando que esto podría deberse a diferencias entre individuos como es la edad y a los factores inductores utilizados en el medio neurogénico, además que en este último trabajo no se cuantifica la población nestina positiva, que para los fines del estudio es fundamental, pues se busca grandes poblaciones de células con perfil neural aún no muy especializadas.

La diferenciación a linaje neural en porcentajes importantes se considera que está basado en la combinación de factores de crecimiento y diferenciación química. En el proceso de pre-inducción se utilizó el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), que permite formar agregados de células flotantes, denominados neuroesferas [34], que están constituidas variablemente por células madre, células progenitoras y diferenciadas, y representan la solución óptima de adaptación ambiental en condiciones *In vitro* [4], cualidades que fueron identificadas en los resultados de este trabajo.

Mientras que para la inducción se usó una combinación de DMSO y BHA, el primero actúa como agente inductor para la formación de fenotipos mesodermales a dosis bajas y medias (1-2%), mediante la regulación positiva y negativa de genes específicos de las tres capas germinales [24], en tanto el butil hidroxianisol (BHA), aumenta el número de marcadores neurales en células madre mesenquimales, introduciéndolas a un proceso de elongación [35]. Finalmente, para el proceso de post-inducción se usó un medio de cultivo con el suplemento libre de suero denominado N2 (Gibco™), que permite adquirir un fenotipo neuronal y la capacidad de producir dopamina [21].

Con este protocolo se observó que la morfología va cambiando luego del período de inducción, observándose inicialmente predominio de morfología de células madre rodeadas por células redondeadas y flotantes, que otros autores definen como neuroesferas [34], posteriormente a las 72 h pos inducción aparecen células con morfología neuronal, coincidiendo con otros trabajos que describen que las neuroesferas están constituidas por células madre entre el 10-50% y por células progenitoras y diferenciadas [4], mientras que en el presente trabajo, a las 96 h aparecen algunas células con morfología neuronal.

Los cambios morfológicos expresados por presencia de neuroesferas y células con morfología neuronal fueron ratificados por la expresión del marcador nestina mediante inmunotinción, el cual se sobre-expresa en células progenitoras neurales durante la fase temprana de neurogénesis y gliogénesis [22, 40], indicando un potencial regenerativo neural y ratificando así mismo la plasticidad de los aislados obtenidos como es observado en otros estudios [33].

Otros autores comunican que, células madre de médula ósea de ratas (*Rattus norvegicus*) se transforman en nestina positivas a las 5 h pos inducción, pero a los 6 d prácticamente no existían estas células [43], sin embargo es evidente la disminución de las poblaciones celulares, la que es atribuida al envejecimiento de los cultivos, y a la ausencia de mitosis celular reconocida por menor confluencia celular en los frascos de cultivo, esto podría explicarse por una disminución en la expresión del gen nestina en células progenitoras neurales en las fases previas a la mitosis, como se describe en experiencias *In vivo* en ratas [37]. Se plantea que los eventos relacionados con la plasticidad y/o el ciclo celular pueden estar implicados en la expresión de nestina por las células progenitoras neurales [21].

El porcentaje de diferenciación obtenido con este protocolo plantea una posibilidad promisoriosa para lograr expansiones grandes de CMA que permita establecer un banco de células madre diferenciadas a neurales similar a lo que se plantea con otros tipos de células autólogas [45] y alogénicas en veterinaria [2]. Por otro lado, el uso de células alogénicas criopreservadas disminuiría significativamente el costo de la terapia celular permitiendo la masificación de la medicina regenerativa.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que, de acuerdo al protocolo utilizado en este trabajo, la mayor producción de células de linaje neural con inmunofenotipo nestina positivas se logra luego de 4 h de inducción en que alcanza el mayor porcentaje de diferenciación (70%), a pesar que se prolonga hasta el 6<sup>to</sup> d pos inducción pero con menor porcentaje (20%), tiempo que es suficiente para obtener alta población de células con inmunofenotipo neural que puede utilizarse para terapia celular y medicina regenerativa, proveyendo información básica que puede ser usada para aplicación clínica en desórdenes neurológicos, la cual es relevante por el incremento de estudios que promueven el uso terapéutico de CMA alogénicas.

## AGRADECIMIENTO

Este trabajo se realizó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) mediante convenio No. 409-2012-CONCYTEC-OAJ, así como por el convenio No. 541-FIDECOM-INNOVATE PERÚ-PIMEN-2015.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ABOUELFETOUH, A.; KONDOH, T.; EHARA, K. Morphological differentiation of bone marrow stromal cells into neuron-like cells after co-culture with hippocampal slice. **Brain Res.** 1029(1): 114-19. 2014.
- [2] ARNHOLD, S.; WENISCH, S. Adipose tissue derived mesenchymal stem cells for musculoskeletal repair in veterinary medicine. **Am. J. Stem Cells.** 4(1):1-12. 2015.



- [3] BAER, P.C.; GEIGER, H. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity. **Stem Cells Int.** 2012:812693. 2012.
- [4] BEZ, A.; CORSINI, E.; CURTI, D.; BIGGIOGERA, M.; COLOMBO, A.; NICOSIA, R.F.; PAGANO, S.F.; PARATI, E.A. Neurosphere and neurosphere forming cells: morphological and ultrastructural characterization. **Brain Res.** 993: 18-29. 2003.
- [5] BLECKER, D.; ELASHRY, M.I.; HEIMANN, M.; WENISCH, S.; ARNHOLD, S. New Insights into the Neural Differentiation Potential of Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Anat. Histol. Embryol.** 46(3):304-315. 2017.
- [6] BORA, P.; MAJUMDAR, A.S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. **Stem Cell Res. Ther.** 8: 145. 2017.
- [7] BOULLAND, J.L.; MASTRANGELOPOULOU, M.; BOQUEST, A.C.; JAKOBSEN, R.; NOER, A.; GLOVER, J.C.; COLLAS, P. Epigenetic regulation of nestin expression during neurogenic differentiation of adipose tissue stem cells. **Stem Cells Dev.** 22(7):1042-52. 2013.
- [8] BOURIN, P.; BUNNELL, B.A.; CASTEILLA, L.; DOMINICI, M.; KATZ, A.J.; MARCH, K.L.; REDL, H.; RUBIN, J.P.; YOSHIMURA, K.; GIMBLE, J.M. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) **Cytother.** 15:641-648. 2013.
- [9] CARDOSO, M.; ESCALHÃO, C.; RAMOS, I.; HOCHMAN-MENDEZ, C.; HANAE-KASAI, T.; LOPES-SOUZA, S.A.; GUTFILEN, B.; DOS SANTOS, R.C.; COELHO-SAMPAIO, T. Safety of Allogeneic Canine Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cell Intraspinal Transplantation in Dogs with Chronic Spinal Cord Injury. **Stem Cells International.** 2017:1-11. 2017.
- [10] CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Biology of stem cells: an overview. **Kidney International Supplements.** 1(3): 63-67. 2011.
- [11] CHAN, T.M.; CHEN, J.Y.; HO, L.I.; LIN, H.P.; HSUEH, K.W.; LIU, D.D.; CHEN, Y.H.; HSIEH, A.C.; TSAI, N.M.; HUENG, D.Y.; TSAI, S.T.; CHOU, P.W.; LIN, S.Z.; HARN, H.J. ADSC therapy in neurodegenerative disorders. **Cell Transplant.** 23(4-5):549-57. 2014.
- [12] CHUNG, D.J.; WONG, A.; HAYASHI, K.; YELLOWLEY, C.E.; Effect of hypoxia on generation of neurospheres from adipose tissue-derived canine mesenchymal stromal cells. **Vet. J.** 199(1):123-30. 2014.
- [13] DELEIDI, M.; COOPER, O.; HARGUS, G.; LEVY, A.; ISACSON, O. Oct4-induced 30 reprogramming is required for adult brain neural stem cell differentiation into 31 midbrain dopaminergic neurons. **PLoS ONE.** 6: e19926. 2011.
- [14] DOMINICI, M.; PAOLUCCI, P.; CONTE, P.; HORWITZ, E.M. Heterogeneity of multipotent mesenchymal stromal cells: from stromal cells to stem cells and vice versa. **Transplant.** 8 (9): S36-42. 2009.
- [15] DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy.** 8(4):315-7. 2006.
- [16] ENCISO, N.; AMIEL, J.; ENCISO, J. Treatment of canine atopic dermatitis with allogeneic adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering: Part A.** 21 (1): S-363. 2015.
- [17] FRESE, L.; DIJKMAN, P.E.; HOERSTRUP, S.P. Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Regenerative Medicine. **Transfus. Med. Hemother.** 43(4): 268-274. 2016.
- [18] GIMBLE, J.M.; KATZ, A.J.; BUNNELL, B.A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. **Circulat. Res.** 100 (9): 1249-1260. 2007.
- [19] GIMBLE, J.M.; GUILAK, F.; NUTTALL, M.E.; SATHISHKUMAR, S.; VIDAL, M.; BUNNELL, B.A. *In vitro* Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. **Transfus. Med. Hemother.** 35:228-238. 2008.
- [20] HAN, SM.; HAN, SH.; COH, YR.; JANG, G.; RA, J.CH.; KANG, SK.; LEE, HW.; YOUN, HY. Enhanced proliferation and differentiation of Oct4- and Sox2-overexpressing human adipose tissue mesenchymal stem cells. **Exp. Mol. Med.** 46(6): e101. 2014.
- [21] HERMANN, A.; GASTL, R.; LIEBAU, S.; POPA, M.O.; FIEDLER, J.; BOEHM, B.O.; MAISEL, M.; LERCHE, H.; SCHWARZ, J.; BRENNER, R.; STORCH, A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. **J. Cell. Sci.** 117: 4411-22. 2004.
- [22] IZADPANAH, R.; TRYGG, C.; PATEL, B.; KRIEDT, C.; DUFOUR, J.; GIMBLE, J.M.; BUNNELL, B.A. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **J. Cell Biochem.** 99: 285-1297. 2006.
- [23] JASMIN, D.C.; CAMPOS DE C, A.C.; MENDEZ-OTERO, R. Chemical induction of cardiac differentiation in P19 embryonal carcinoma stem cells. **Stem Cells Dev.** 19(3):403-411. 2010.

- [24] JIANG, J.; LV, Z.; GU, Y.; LI, J.; XU, L.; XU, W.; LU, J.; XU, J. Adult rat mesenchymal stem cells differentiate into neuronal-like phenotype and express a variety of neuro-regulatory molecules in vitro. **Neurosci. Res.** 66: 46–52. 2010.
- [25] KAMISHINA, H.; CHEESEMAN, J.A.; CLEMMONS, R.M. Nestin-positive spheres derived from canine bone marrow stromal cells generate cells with early neuronal and glial phenotypic characteristics. *In Vitro. Cell. Dev. Biol. Anim.* 44:140–144. 2008.
- [26] LEE, W.J.; LEE, J.Y.; JUNG, K.H.; LEE, S.T.; KIM, H.Y.; PARK, D.K.; YU, J.S.; KIM, S.Y.; JEON, D.; KIM, M.; LEE, S.K.; ROH, J.K.; CHU, K. Neurovascular Cell Sheet Transplantation in a Canine Model of Intracranial Hemorrhage. **Cell Med.** 9(3):73-85. 2016.
- [27] LIU, T.M.; WU, Y.N.; GUO, X.M.; HUI, J.H.P.; LEE, E.H.; LIM, B. Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells. **Stem Cells Dev.** 18:1013–1022. 2009.
- [28] MIKO, M., DANIŠOVIČ, L., MAJIDI, A., VARGA, I. Ultrastructural analysis of different human mesenchymal stem cells after in vitro expansion: a technical review. **Eur. J. Histochem.** 59:2528. 2015.
- [29] NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat. Genet.** 24 (4): 372–6. 2000.
- [30] OLIVEIRA, R.L.; CHAGASTELLES, P.C.; SESTERHEIM, P.; PRANKE, P. *In Vivo* Immunogenic Response to Allogeneic Mesenchymal Stem Cells and the Role of Preactivated Mesenchymal Stem Cells Cotransplanted with Allogeneic Islets. **Stem Cells Int.** 2017: 9824698. 2017.
- [31] PARK, S.S.; LEE, Y.J.; LEE, S.H.; LEE, D.; CHOI, K.; KIM, W.H.; KWEON, O.K.; HAN, H.J. Functional recovery after spinal cord injury in dogs treated with a combination of Matrigel and neural-induced adipose-derived mesenchymal stem cells. **Cytotherapy.** 14(5):584–597. 2012.
- [32] PESCE, M.; SCHÖLER, H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. **Stem Cells.** 19:271–278. 2001.
- [33] PETRICEVIC, J.; FOREMPOHER, G.; OSTOJIC, L.; MARDESIC-BRAKUS, S.; ANDJELINOVIC, S.; VUKOJEVIC, K.; SARAGA-BABIC, M. Expression of nestin, mesothelin and epithelial membrane antigen (EMA) in developing and adult human meninges and meningiomas. **Acta Histochem.** 113(7):703-11. 2011.
- [34] REYNOLDS, B.A.; EISS, S. Generation of neuron and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Sci.** 255: 1707-10. 1992.
- [35] RISMANCHI, N.; FLOYD, C.L.; BERMAN, R.F.; LYETH, B.G. Cell death and long-term maintenance of neuron-like state after differentiation of rat bone marrow stromal cells: a comparison of protocols. **Brain Res.** 991: 46-55. 2003.
- [36] SALEHI, H.; AMIRPOUR, N.; NIAPOUR, A.; RAZAVI, S. An Overview of Neural Differentiation Potential of Human Adipose Derived Stem Cells. **Stem Cell Rev.** 12(1):26-41. 2016.
- [37] SUNABORI, T.; TOKUNAGA, A.; NAGAI, T.; SAWAMOTO, K.; MASARU O., MIYAWAKI, A.; MATSUZAKI, Y.; MIYATA, T.; OKANO, H. Cell-cycle-specific nestin expression coordinates with morphological changes in embryonic cortical neural progenitors. **J. Cell Sci.** 121: 1204-1212. 2008.
- [38] TAHA, M.F.; HEDAYATI, V. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. **Tissue Cell.** 42(4):211-6. 2010.
- [39] TORRES-ESPÍN, A.; REDONDO-CASTRO, E.; HERNANDEZ, J.; NAVARRO, X. Immunosuppression of Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Transplantation after Spinal Cord Injury Improves Graft Survival and Beneficial Outcomes. **J. Neurotr.** 32(6): 367–380. 2015.
- [40] VON-BOHLEN, O.; VON-BOHLEN, V. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. **Cell Tissue Res.** 345(1):1-19. 2011.
- [41] WAGENAAR, N.; NIJBOER, CH.; VAN BEL, F. Repair of neonatal brain injury: bringing stem cell-based therapy into clinical practice. **Dev. Med. Child. Neurol.** 59(10): 13528. 2017.
- [42] WANKHADE, U.D.; SHEN, M.; KOLHE, R.; FULZELE, S. Advances in Adipose-Derived Stem Cells Isolation, Characterization, and Application in Regenerative Tissue Engineering. **Stem Cells Int.** 2016 (3206807): 1- 9. 2016.
- [43] WOODBURY, D.; SCHWARZ, E.J.; PROCKOP, D.J.; BLACK, I.B. Adult Rat and Human Bone Marrow Stromal Cells Differentiate Into Neurons. **J. Neurosci. Res.** 61:364–370. 2000.

[44] ZHENG, J.; HUANG, X.; WANG, H.; LIU, X.; ZHANG, T.; WANG, Y.; HU, D. The challenges and promises of allogeneic mesenchymal stem cells for use as a cell-based therapy. **Stem Cell Res. Ther.** 6:234. 2015.

[45] ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H.; HUANG, J.; FUTRELL, J.W.; KATZ, A.J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H.P.; HEDRICK, M.H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Engineer.** 7(2):211–228. 2001.



## REVISTA CIENTÍFICA

Vol, XXVIII, N° 3 \_\_\_\_\_

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada en  
Junio de 2018, por La Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela.*