



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Diferenciación de células troncales mesenquimales mediante co-
cultivo con condrocitos primarios. Estudio en borregos.**

Tesis

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL**

PRESENTA:

M. en C. Carlos Landa Solís

Tutor: Dra. Rebecca Elizabeth Franco y Bourland – INR GLII

Comité tutor: Doctor Gabriel Guízar Sahagún - IMSS

Doctor Horacio Merchant Larios – IIB/UNAM

Ciudad de México

Diciembre 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

- ◆ A mi asesora la Dra. Rebecca Franco por compartir su conocimiento, charlas, apoyo moral y académico para la realización de este trabajo.

- ◆ Al M.V.Z. Hugo Lecona Butrón. Jefe de Bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.

- ◆ Al M. en C. Valentín Martínez López. Jefe de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del INR LGII.

- ◆ A la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez. Subdirectora de investigación tecnológica del INR LGII.

- ◆ A personal del Servicio de Bioquímica del INR LGII por su disposición y apoyo.

- ◆ A la M. en C. Adriana Hernández y la Bióloga Erika Chantal por las horas de trabajo compartido.

- ◆ A mis compañeros del INR LGII en especial a M. en C. Ricardo Gómez García por su apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.

- ◆ A Dra. en C. Anell Olivos Meza por su amistad y el apoyo para la impresión de la tesis.

- ◆ A todas las borregas de la raza Suffolk que participaron en este trabajo.

DEDICATORIAS

- ❖ En memoria de Elide del Carmen Solís Chable (mi madre).
- ❖ A mi familia por todo su apoyo y cariño, en especial a mi hija Alicia.
- ❖ A Amanda por sus consejos, amor y tiempo compartido.

Resumen

Según la Organización Mundial de la Salud la osteoartritis (OA) es un problema de salud pública que podría llegar a ser la cuarta causa global de discapacidad para 2020. La incidencia de OA secundaria ha aumentado por lesiones intraarticulares por práctica deportiva así como por fracturas y traumatismos articulares en población de adultos jóvenes. Aproximadamente 50% de estos pacientes desarrollan OA en un lapso de 5 a 15 años después de la lesión y no existen tratamientos farmacológicos que modifiquen el curso de la enfermedad. El manejo de la OA está encaminado a disminuir la inflamación y dolor, mejorar la función articular, llegando al reemplazo articular protésico y hasta la artrodesis, por lo que resulta de suma importancia generar nuevas estrategias de tratamiento de OA en modelos animales que de forma segura puedan ser transferidas al tratamiento en humanos. El propósito del presente estudio fue diferenciar a condrocitos células troncales mesenquimales (CTM) de médula ósea (MO) y movilizadas a sangre periférica (CTM-SPM) de borrego cultivadas *in vitro* y estimuladas con medio condicionado (MC, medio de cultivo de condrocitos primarios). **Metodología:** A partir de borregas de la raza Suffolk de 1 a 2 años de edad se obtuvieron 20 mL de médula ósea, y después de dos meses, mediante la aplicación de una dosis diaria de 10µg del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) por kilogramo peso corporal. Se indujo la movilización de las CTM a sangre periférica de donde se obtuvieron 20 mL de sangre periférica movilizad (SPM) por punción en la vena yugular. Tanto para las muestras de MO con las de SPM se asilaron primero las células mononucleares mediante un gradiente con Ficoll, para después, usando perlas superparamagnéticas recubiertas con el anticuerpo anti-C90 se aislaron las células CTM-CD90+ de MO (MO CTM-CD90+) y de SPM (SPM CTM-CD90+). Las MO, CTM-CD90+ se expandieron en cultivo primario en medio DMEM suplementado con 10% de suero de borrego adulto (SBA), por otra parte, el medio de cultivo fue suplementado con 20% de suero fetal bovino “defnifdo” (DSFB) para

la expansión en cultivo primario de las SPM CTM-CD90+. Se estableció el inmunofenotipo por citometría de flujo de las células en primer pase y se procedió a establecer las condiciones óptimas para la diferenciación de las células previamente aisladas a condrocito en cultivo en dos dimensiones y en cultivo en un andamio biocompatible. Finalmente se estableció por RT-PCR en punto final la expresión de genes característicos del cartílago articular del borrego. **Resultados:** de los 20 mL de muestra se obtuvieron 8×10^6 MO CTM-CD90+ y 6×10^6 SPM CTM-CD90+, después de la expansión en cultivo primario. Se obtuvo para MO/SPM respectivamente: CD73+:18.4/45.1%, CD90+: 62.5/84.3% y CD105+: 34.3/68.2%. La condición óptima para la diferenciación en cultivo en monocapa de las MO CTM-CD90+ después de la inducción por 7 días en MC seguido de co-cultivo parácrino con condrocitos primarios + TGF- β 1 por 14 días, y para las SPM CTM-CD90+ fue: inducción por 7 días con MC seguido del cultivo adicionado con BMP-7 por 14 días. Cuando las SPM CTM-CD90+ fueron cultivadas en el andamio biocompatible la mejor condición para la diferenciación a condrocito fue: cultivo por 14 días en medio DMEM, adicionado con SBA al 10% + BMP-7. Todas las células diferenciadas a condrocito mostraron un patrón de expresión de genes similar al de los condrocitos primarios aislados del cartílago articular en los cóndilos femorales del borrego (COL I y II, COL X, SOX9, AGR, COMP, OCN y OPN) y no se observó la expresión del gen RUNX2, sugiriendo un fenotipo de condrocito hipertrófico. **Conclusiones:** Es factible establecer un modelo preclínico de diferenciación a condrocito de MO CTM-CD90+ y SPM CTM-CD90+ en borrego con fenotipo hipertrófico.

Abstract

According to the World Health Organization osteoarthritis (OA) is a public health problem that could become the fourth global cause of disability by 2020. The incidence of secondary has increased by intraarticular sports injuries and fractures and joint injuries in young adult population. Approximately 50% of these patients develop OA in a span of 5 to 15 years after injury and there are no drug therapies that modify the course of the disease. The management of OA is aimed at reducing inflammation and pain; improve joint function, reaching joint replacement prosthetic and even arthrodesis, so it is important to generate new strategies for treatment of OA in animal models that safely they can be transferred to the treatment in humans. The purpose of this study was to differentiate to chondrocytes mesenchymal stem cells (MSCs) from bone marrow (BM) and mobilized peripheral blood (CTM-SPM) grown sheep in vitro and stimulated with conditioned medium (CM, culture medium of primary chondrocytes). **Methodology:** From Suffolk breed sheep 1 to 2 years old were obtained 20 mL of bone marrow, and after two months, by applying a daily dose of 10µg of granulocyte colony-stimulating factor (G- CSF) to kilogram body weight. The mobilized CTM were obtained in 20 mL of peripheral blood by jugular vein puncture. For both samples the SPM and MO, the mononuclear cells were first isolated by Ficoll gradient, for later, using superparamagnetic beads coated with anti-CD90 antibody-CD90 MSCs MO + cells (CD90 + CTM-MO) and SPM (SPM-CD90 + CTM) they were isolated. The MO, CTM-CD90 + was expanded in primary culture in DMEM medium supplemented with 10% serum of adult sheep (SBA), moreover, The culture medium was supplemented with 20% fetal bovine serum "defined" (DSFB) for expansion in primary culture of CD90 + SPM-CTM. immunophenotype was established by flow cytometry of cells in first pass and proceeded to establish the optimal conditions for differentiation of cells to chondrocytes in culture in two dimensions and cultured in a biocompatible scaffold.

Finally the expression of genes characteristic of articular cartilage in sheep was established by RT-PCR endpoint. **Results:** From the 20 mL sample respectively were obtained $8 \times 10^6 + 6 \times 10^6$ MO CTM-CD90+ and $8 \times 10^6 + 6 \times 10^6$ SPM CTM-CD90+, after expansion in primary culture. Was obtained for MO / SPM respectively: CD73 +: 18.4/45.1%, CD90+: 62.5/84.3% and CD105 +: 34.3/68.2%. The optimum condition for differentiation in monolayer culture of MO CTM-CD90+ after induction for 7 days followed by CM paracrine coculture with primary chondrocytes TGF- β 1 + for 14 days, and for SPM CTM-CD90+ was: induction by 7 days followed by CM supplemented with BMP-7 for 14 days culture. When SPM CTM-CD90+ were grown on the biocompatible scaffold the best condition for chondrocyte differentiation was: I culture for 14 days in DMEM, supplemented with 10% SBA + BMP-7. All differentiated cells to chondrocyte showed an expression of genes similar to that of primary chondrocytes isolated from articular cartilage in the femoral condyles in sheep (COL I and II, COL X, SOX9, AGR, COMP, OCN and OPN) and not RUNX2 gene expression was observed, suggesting hypertrophic chondrocyte phenotype. **Conclusion:** It is feasible to establish a preclinical model of chondrocyte differentiation from MO CTM-CD90+ and SPM CTM-CD90 + in sheep with hypertrophic phenotype.

Abreviaturas

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Ácido ribonucleico	ARN
AGR	AGRECANO
Células CTM-CD90+ aisladas de MO	MO-CTM-CD90+
Células troncales hematopoyéticas	PB-HSC
Células troncales mesénquimas CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada	SPM-CTM-CD90+
Colágena I	COL I
Colágena II	COL II
Dimetil sulfóxido	DMSO
Factor de crecimiento transformante beta 1	TGF- β 1
Factor de transcripción 2 relacionado con Runt	RUNX2
Factor estimulante de colonias de granulocitos	G-CSF
Factor transcripcional 9	SOX9
Fosfato-tricálcico β	β -TCP
Grados centígrados	$^{\circ}$ C
Instituto Nacional de Rehabilitacion Luis Guillermo Ibarra Ibarra	INR GLII
Insulina-Transferrina-Selenio	ITS
Kilogramos	kg
Mad hairpin 1	MH1
Medio condicionado	MC
Medio de Eagle modificado por Dulbecco	DMEM
Médula ósea	MO
Micro gramos	μ g
Micro-molar	μ M
Mililitros	mL
Molécula de superficie de adhesión vascular 1	VCAM-1
Nanogramos	ng
Nano-molar	Nm
Osteoartritis	OA
Osteocalcina	OCN
Osteopontina	OPN
Primer pase	PC
Proteína oligomérica de la matriz del cartílago	COMP
Proteína morfogénica ósea 7	BMP-7
Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa	RT-PCR
Sangre periférica movilizada	SPM
Sistema mayor de histocompatibilidad humana	MHC-1
Solución amortiguada de fosfatos	PBS

Suero de borrego adulto

Suero fetal bovino

Suero fetal bovino "DEFINIDO"

Unidad de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa

Unidad formadora de colonias fibroblástica

7-Aminoactinomicin D

SBA

SFB

DSFB

UITTC y MR

CFU-Fs

7 AAD

Contenido	Página
Resumen	III
Abreviaturas	VII
I. Introducción	1
1.1. Revisión de la literatura	3
1.2 Características del cartílago articular	3
1.3 Generalidades de las células troncales.....	4
1.4 Las células troncales mesenquimales.....	6
1.5 Movilización de las células troncales mesenquimales de médula ósea a sangre periférica.....	7
1.6 Diferenciación de las células troncales mesenquimales a condrocito.....	8
II. Justificación	11
III. Hipótesis	12
IV. Objetivo general	12
4.1 Objetivos particulares.....	12
V. Material y métodos	13
5.1 Diseño del estudio.....	13
5.2 Mantenimiento de las borregas a su ingreso al bioterio del INR LGII.....	16
5.3 Obtención de condrocitos primarios a partir de borregos cadavéricos	16
5.4 Obtención de medio condicionado: medio de cultivo de condrocitos primarios de cóndilos femorales de borrego.....	19
5.5 Obtención de la medula ósea.....	21

5.6 Obtención de la sangre periférica movilizada.....	23
5.7 Aislamiento de células CTM-CD90+ de médula ósea y de sangre periférica movilizada.....	24
5.8 Expansión <i>in vitro</i> de las células troncales mesenquimales CD90+ aisladas de médula ósea y sangre periférica movilizada	26
5.9 Caracterización por citometría de flujo.....	26
5.10 Diferenciación con células CTM-CD90+ aisladas de médula ósea	27
5.11 Diferenciación con células CTM-CD90+ obtenidas de médula ósea y aisladas en sangre periférica y expandidas empleando medio suplementado con suero de borrego adulto.....	29
5.12 Diferenciación de CTM-CD90+ de en sangre periférica movilizada y expandidas en medio suplementado en medio con DSFB.....	32
5.12.1 Diferenciación a un fenotipo condral de células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada que previamente fueron inducidas en medio condicionado.....	35
5.13 Extracción de ARN y expresión génica de células CTM-CD90+SPM- DSFB sembradas en tres diferentes andamios.....	37
5.13.1 Extracción de ARN y expresión génica de células CTM-CD90+SPM- DSFB sembradas en BioSponge y diferenciadas a condrocito sin previa inducción con MC.....	41
5.14 Método para la extracción de ARN y evaluar la expresión génica de células en cultivo en monocapa y en un andamio en 3D.....	43

5.14.1 Extracción de ARN en células en monocapa y en células en un andamio.....	43
5.14.2 Expresión génica de células cultivadas por RT-PCR a punto final.....	47
VI. Resultados.....	50
6.1 Producción de medio condicionado a partir de condrocitos primarios de cóndilos femorales de borrego.....	50
6.2 Aislamiento de células CTM-CD90+ a partir de médula ósea y sangre periférica movilizada	51
6.2.1 Aislamiento de células CTM-CD90+ a partir de médula ósea.....	51
6.3 Expansión en cultivo <i>in vitro</i> de las células CTM-CD90+.....	54
6.3.1 Expansión en cultivo <i>in vitro</i> de las células CTM-CD90+ aisladas de médula ósea.....	54
6.3.2 Expansión en cultivo <i>in vitro</i> de las células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada.....	54
6.4 Inmunofenotipo de las células CTM-CD90+ después de ser aisladas de la médula ósea y sangre periférica movilizada	56
6.4.1 Inmunofenotipo de las células CTM-CD90+ después de ser aisladas de médula ósea.....	56
6.4.2 Inmunofenotipo de las células CTM-CD90+ después de ser aisladas de sangre periférica movilizada.....	56
6.5 Diferenciación de CTM-CD90+ aisladas de médula ósea.....	58
6.6 Diferenciación con células CTM-CD90+ movilizadas de médula ósea y aisladas en sangre periférica y expandidas empleando medio suplementado	

con suero de borrego adulto.....	62
6.6.1 Diferenciación con células CTM-CD90+ movilizadas de médula ósea y aisladas en sangre periférica y expandidas empleando medio suplementado en medio con DSFB.....	66
6.6.2 Diferenciación a un fenotipo condral de células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada que previamente fueron inducidas. (Prueba de factores de crecimiento y compuestos químicos).....	71
6.7 Extracción de ARN de células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada sembradas en tres diferentes andamios.....	74
6.7.1 Expresión de genes característicos de cartílago articular en células troncales mesenquimales CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizadas diferenciadas a cartílago en un andamio en 3D (BioSponge).....	79
VII. Discusión.....	82
VIII Conclusiones.....	85
IX Perspectivas.....	86
X Referencias.....	87
XI Anexo, artículo publicado.....	92

I. Introducción

Los condrocitos del cartílago articular son células mesenquimales especializadas que se encuentran únicamente en el cartílago, por lo que, cuando se pretende reparar este tipo de tejido la fuente más obvia, es a través de las células diferenciadas y especializadas o en aquellas que dan origen al linaje condral.¹ Sin embargo, el número de condrocitos obtenidos en biopsias es escaso, por lo que se requiere expandirlos en cultivo. Para solventar esta problemática, a través de la medicina regenerativa, los condrocitos son aislados de biopsias pequeñas de cartílago de zonas de no carga de la articulación, para posteriormente expandirlas *in vitro* y prepararlas para su implante dentro de la zona de la lesión.²

La principal limitante del cultivo de condrocitos en monocapa es que a través de múltiples repliegos, cambia el patrón de síntesis de proteínas y la morfología celular, este fenómeno es descrito en la literatura como desdiferenciación,³ caracterizada por la pérdida de la expresión de colágeno del tipo II $\alpha 1$ y el inicio de la expresión de colágeno del tipo I $\alpha 2$ y el cese de la producción de agregano, que van a desencadenar en el cambio de las características mecánicas del cartílago *in vivo*.^{2,4,5}

Por lo que en la actualidad existe la necesidad de encontrar una fuente de células troncales, que ofrezcan alta plasticidad permitan la expansión del número suficiente de células que puedan ser diferenciadas a condrocito para la reparación de zonas extensas de tejido que presenten daño, así como de obtener una fuente de células troncales poco invasiva para los pacientes.

En la primera etapa de este trabajo a partir de biopsias de médula ósea exploramos la capacidad de diferenciación a condrocitos de una población de células troncales mesenquimales CD90+ (CTM-CD90+), que se ha descrito poseen una alta capacidad de diferenciación a condrocito.⁶

En la segunda etapa del trabajo se decidió abordar una opción para hacer más eficiente la obtención de CTM-CD90+, a través de células troncales multipotentes movilizadas de medula ósea hacia sangre periférica por medio del tratamiento con el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF),^{7,8} este factor fue purificado y molecularmente clonado entre 1984 y 1986, los primeros estudios clínicos con el G-CSF iniciaron en 1986, en 1991 fue aprobado en los Estados Unidos de Norte América en pacientes con cáncer que estuvieran recibiendo quimioterapia y para la movilización de células troncales multipotentes a sangre periférica movilizadas de donde por su fácil obtención pueden ser empleadas en trasplantes.⁹ En estudios de seguimiento de hasta 5 años en donadores sanos que han recibido hasta 5 dosis del G-CSF, los efectos adversos que se han reportado se han limitado a dolor musculoesquelético sin que se observen ninguna evidencia de anomalías en la medula ósea.¹⁰

El mecanismo de acción descrito para el efecto de movilizar las células troncales mesenquimales (CTM) a sangre periférica del G-CSF, se basa en la modulación negativa de la molécula de superficie de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en las células troncales localizadas en el nicho de la medula ósea,¹¹ favoreciendo su liberación del nicho y que estas migren por espacio intramedular hacia la circulación periférica.¹² Se han identificado dos poblaciones de células troncales en la sangre periférica movilizadas (SPM), células troncales hematopoyéticas,¹³ y CTM.¹⁴ Las células troncales hematopoyéticas se han caracterizado por medio de los marcadores de superficie CD133+CD45+CD34+CD38-^{15,16} Mientras que las CTM de la médula ósea se han caracterizado con los marcadores de superficie CD105+, CD90+, CD73+, CD31-, CD34-, y CD45-.^{17,18} Para el caso particular de las CTM se ha demostrado su plasticidad al ser diferenciadas en adipocitos, condrocitos y osteoblastos.^{16,18-20}

Nuestro grupo de trabajo en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR LGII), trabajo en la búsqueda una fuente de células troncales multipotentes con la capacidad de diferenciación a condrocitos para la reparación de las lesiones en el cartílago articular causadas por la osteoartritis²¹ que son una fuente de una importante causa de discapacidad en México.²²

Por lo que antes de implementar un nuevo tratamiento en humanos buscamos en el presente estudio establecer las condiciones para la movilización, expansión in vitro y diferenciación a cartílago de células troncales multipotentes movilizadas de la médula ósea a sangre periférica en un modelo animal en borrego. Que permita montar las bases para extrapolar la tecnología que se generó como una nueva estrategia terapéutica para la reparación de las lesiones del cartílago causadas por la OA en humanos.

1.1 Revisión de la literatura

1.2 Características del cartílago articular

La integridad del cartílago es esencial para la adecuada función articular. Con frecuencia resulta lesionado por traumatismos o por condiciones de degeneración que pueden ocasionar OA; esto es particularmente frecuente en articulaciones sometidas a carga tanto en animales cuadrúpedos como en humanos. La unidad funcional de cartílago articular son los “condrocitos” los cuales sólo son cerca del 2% del total del cartílago. Además está compuesto por una matriz extracelular (MEC) compuesta de agua en un 75%, fibras de colágena en un 15% y proteoglicanos en un 10%.²³

La habilidad de la matriz extracelular para almacenar agua es debida a la carga negativa de los proteoglicanos con lo cual atraen cationes de sodio (Na+) y por ende, moléculas de agua, hidratando la matriz del cartílago,²³ además de que producen colágena tipo II que presenta una estructura de triple hélice y le confiere una gran capacidad de flexión y

extensión, sin embargo también se encuentran fibras de colágena tipo VI, IX, XI, XII y XIV,²⁴ se detectado la expresión de colágena tipo I hasta 21 días de mantener en cultivo primario a condrocitos humanos.²⁵

Estructuralmente presenta diferentes arreglos. A nivel microscópico se divide en tres zonas no mineralizadas y una mineralizada. La zona superficial donde hay una capa acelular la cual presenta gran contenido de proteoglicanos, por debajo de ésta hay otra capa con una alta densidad de condrocitos que son relativamente pequeños y alargados, donde casi no hay proteoglicanos y las fibras de se encuentran posicionadas de manera paralela lo que impide el paso de grandes moléculas y células inflamatorias hacia los condrocitos. La zona de transición se caracteriza por presentar células alargadas y redondas, las fibras no presentan un arreglo especial y el contenido de glicosaminoglicanos es alto. En la zona profunda, las células son más largas, las fibras de colágena se arreglan de manera perpendicular y el contenido de agua es bajo. La zona calcificada, que es la última que compone al cartílago articular y es la que separa al cartílago del hueso subcondral.^{23,24}

1.3 Generalidades de las células troncales

Las células troncales son células indiferenciadas con capacidad de proliferación y auto-renovación. Por estas características, las células troncales son una excelente herramienta con gran potencial en la medida regenerativa. Las células troncales en diferentes etapas del desarrollo parecen tener diferentes capacidades de auto-renovación y diferenciación. A grandes rasgos existen dos tipos de células troncales: las células troncales embrionarias y las células troncales presentes en el tejido específico o somático en individuos adultos. Además, las células troncales se pueden clasificar de acuerdo con su plasticidad que se refiere a la capacidad de dicha célula de diferenciarse a diversas

estirpes celulares. Se clasifican de la siguiente manera: totipotenciales, pluripotenciales, multipotentes y en algunos textos se han definido como unipotenciales.²⁶

Las células troncales totipotenciales son aquellas que son obtenidas en la etapa de pre-blastocisto en el desarrollo embrionario; son células indiferenciadas que pueden formar tanto las células que darán origen a un embrión como a las células que conforman al trofoblasto. Después de la tercera división celular durante el desarrollo embrionario, las células comienzan a diferenciarse. La masa de células internas que forman el blastocito son células pluripotentes.²⁶

Las células pluripotentes son células que provienen del blastocisto, una etapa de pre-implantación durante el desarrollo embrionario. El blastocisto consiste en su interior en una masa de células internas, compuestas de 30 a 34 células, las cuales son pluripotentes. Tres factores de transcripción son conocidos por ser críticos para el mantenimiento de la pluripotencia, *Oct-4*, *Nanog* y *Sox-2*. Una de las limitaciones de estas células es que no pueden ser utilizadas en su estado indiferenciado directamente en los trasplantes celulares, ya que pueden producir teratomas. Otro problema es que su uso ha sido objeto de controversias bioéticas al provenir de embriones de humano.

Con la obtención en el laboratorio de las células troncales pluripotentes inducidas que son células somáticas como fibroblastos reprogramadas mediante la inducción de genes que contribuyen a la proliferación y mantenimiento de la pluripotencia (*Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*). Estas células presentan un comportamiento similar a las células pluripotentes. Una de las limitantes de estas células es que al ser reprogramadas pueden llegar a producir teratomas al ser implantadas en animales de experimentación en el laboratorio.²⁷

Las células troncales presentes en tejidos específicos en individuos adultos encuentran más restringidas en cuanto a su diferenciación hacia otras estirpes, por lo que se les

denomina multipotentes;²⁶ sin embargo, se ha reportado en la literatura que algunos tipos de células troncales adultas presentan factores críticos del mantenimiento de la pluripotencia como Oct3/4 y Sox2, por lo que se les puede denominar como pluripotentes.²⁸ Por otra parte las células unipotentes, a pesar de que son denominadas células troncales, no se les debería llamar así, ya que sólo cumplen con la condición de ser auto-renovables y, por lo tanto, no cumplen con de las criterios mínimos para considerarse como células troncales.²⁶

1.4 Las células troncales mesenquimales

En el siglo XIX, Tavassoli y Crosby,²⁹ demostraron el potencial osteogénico de la médula ósea (MO). Cohnheim,³⁰ fue el primero que sugirió la presencia de las células no hematopoyéticas en la MO. Sin embargo, no fue hasta hace escasos 50 años que Friedenstein y cols,³¹ lograron identificar dos tipos de células troncales en la MO.³² Una de ellas y más abundante las denominaron células troncales hematopoyéticas y a la segunda población células troncales de la MO estromales, ya que se describieron como una unidad formadora de colonias fibroblásticas.³¹ Después, demostraron que dichas células eran capaces de generar células de hueso,³³ cartílago,³⁴ grasa y tejido conectivo fibroso.^{35,36} En 1991, Caplan denomina a estas células como células troncales mesenquimales (CTM).³⁴

Las CTM no solo se encuentran en la MO también se han identificado en tejido adiposo,³⁷ sangre de cordón umbilical, sangre periférica movilizada,¹⁴ líquido amniótico,³⁸ pulpa dentaria,³⁹ tendones,⁴⁰ vellosidades coriónicas,⁴¹ membrana sinovial,⁴² y músculo esquelético,⁴³ entre otros. Las principales características de las CTM son las siguientes:⁴⁴

- 1) Potencial de diferenciación a multilínea en condiciones *in vitro* a diversos linajes celulares (hueso, cartílago, grasa, ect).

- 2) Disponibilidad en múltiples tejidos (MO, cordón umbilical, sangre periférica movilizada, placenta, tejido adiposo, etc.)
- 3) No causan reacción inmunológica.⁴⁵

Fenotípicamente, las CTM expresan una serie de marcadores de superficie no específicos (CD73, CD90 y CD105), que nos permiten diferenciar este tipo celular de otros tipos celulares por medio de citometría de flujo. Las CTM no expresan marcadores de superficie hematopoyéticos como: CD45, CD34, CD14 o CD11. Tampoco expresan moléculas co-estimulantes como: CD80, CD86 o CD40. Se ha reportado que pueden existir diferencias mínimas en la expresión de ciertos marcadores entre las CTM humanas y otra especie animal.⁴⁶

Una de las propiedades de las CTM es la inmunosupresión, a pesar de que las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad humana (MHC-1) activan las células T, en ausencia de moléculas co-estimulantes, no se genera una respuesta secundaria y, por ende, las células T se encuentran anérgicas.⁴⁷ También se ha demostrado que las CTM tienen propiedades inmunomoduladores que intervienen en la maduración y función de las células dendríticas. También se ha descrito que las CTM inhiben in vitro la proliferación de células B, la diferenciación y quimiotaxis de las células inmunocompetentes.⁴⁸

1.5 Movilización de las células troncales mesenquimales de médula ósea a sangre periférica.

Para el aislamiento de las CTM del organismo, la técnica más empleada hasta ahora es la punción de la MO, la cual se ha descrito como traumática para los pacientes y necesitan de estudios de logística para el manejo de los pacientes y de las muestras ya que implica una intervención quirúrgica con todos los riesgos que implica. De tal forma que el perfeccionamiento de la técnica de obtención de las CTM a partir de la MO representaría

un avance en el bienestar de los pacientes.⁴⁹ Una de las estrategias que se han planteado para optimizar la obtención de CTM ha sido el empleo del G-CSF,⁵⁰ para la movilización de las CTM de MO a la sangre periférica.

El G-CSF es inducido por las células hematopoyéticas de forma natural cuando son expuestas a proteínas de paredes bacterianas, endotoxinas y citosinas inflamatorias. Éste se puede encontrar de forma endógena producido por monocitos, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células del estroma de la MO. Administrado de forma exógena, ya sea por vía intravenosa o subcutánea, su distribución es principalmente a MO, glándulas suprarrenales, riñones e hígado.⁵¹ Es un inmunomodulador que induce la proliferación y diferenciación de la células progenitoras de granulocitos, favoreciendo principalmente la producción de neutrófilos y acortando el tiempo que requieren los neutrófilos para madurar.⁵²

El uso del G-CSF se ha descrito en pequeñas especies para disminuir la duración de la neutropenia por infecciones de origen viral principalmente, así como, para la movilización de células troncales hematopoyéticas y CTM,⁵³ siendo administrado por vía intravenosa o subcutánea.^{54,55} En grandes especies de ha descrito su uso en el tratamiento y profilaxis de neutropenia causada por septicemia, endotoxemia e hipoplasia linfoide inducida por fármacos.

1.6 Diferenciación de las células troncales mesenquimales a condrocito.

La diferenciación de las CTM hacia condrocito puede lograrse *in vitro* modificando las condiciones de los cultivos mediante el uso de factores de crecimiento durante su proliferación. Las mejores señales para inducir la condrogénesis son miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) incluyendo β 1, β 2 y β 3 junto con la activación del factor transcripcional SOX9.⁵⁶

El SOX9 regula la expresión de la Col2α1 que es el principal componente de la matriz extracelular de los condrocitos articulares.⁵⁷ Cuando el TGF-β activa a TβR-I mediante la formación de un complejo ligando-receptor con el receptor de tipo II, SMAD2/3 son fosforilados por el TβR-I activado, para luego ser transportado al núcleo y de esta forma modulan la asociación entre SOX9 y p300. SOX9 específicamente se une al intrón 1 del gen de Col2α1 y regula su transcripción,⁵⁸ (ver figura 1).

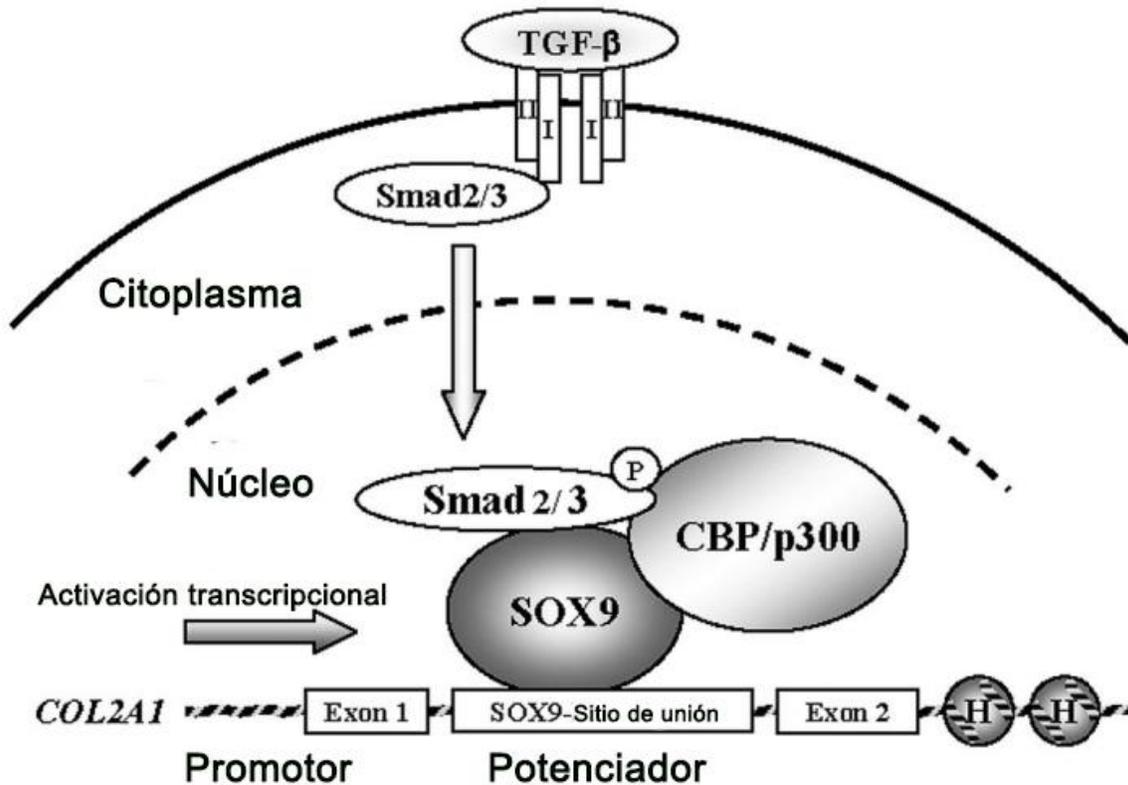


Figura 1. Representación esquemática. Presentación de eventos moleculares durante la condrogénesis primaria. TGF-β activa a TβR-I mediante la formación de un complejo ligando-receptor con el receptor de tipo II, SMAD2/3 son fosforilados por TβR-I activado, para luego ser transportado en el núcleo y de esta forma modulan la asociación entre SOX9 y p300. SOX9 específicamente se une al intrón 1 del gen de Col2α1 y regula su transcripción, (imagen modificada de lo publicado por Furumatsu y cols).⁵⁸

Se ha descrito que los miembros de la familia del TGF- β también estimulan la vía de MAPK durante la condrogénesis.⁵⁹ Así MAPK estimula la expresión de Col2a1 y SOX9 y estas dos vías son importantes para la expresión del gen de agregano el mayor proteoglicano en el cartílago.⁶⁰ En modelos animales ha descrito la diferenciación de CTM que fueron movilizadas a sangre periférica y posteriormente diferenciadas a condrocitos *in vitro*, en pequeñas especie como el conejo.¹⁴

Uno de los mecanismos de estimulación que se ha descrito para activar la condrogénesis es la presencia de proteínas SMAD, SMAD2 y SMAD3. Los cuales al ser fosforilado por el receptor de TGF- β 1, forman un complejo heteromérico asociándose con SMAD4. Este complejo se transloca al núcleo y regula la expresión de genes blanco a través de la unión directa a elementos de unión de SMAD a secuencias de ADN. La actividad de unión al ADN es dependiente de dominios de homología Mad hairpin 1 (MH1) de SMAD3 y SMAD4. No obstante el MH2 de SMAD3 ha sido reportada que se asocia con varios factores de transcripción tales como Runx2 y MyoD actuando como factores de transcripción críticos para miogénesis.⁵⁸

II. Justificación

Las lesiones del cartílago articular continúan siendo un reto para la medicina moderna, ya que en el adulto el cartílago tiene escasa capacidad de reparación espontánea y predisponen a la aparición temprana de OA. Esta patología afecta tanto a animales como a humanos. Es una patología que causa dolor crónico y puede llegar a provocar incapacidad funcional.⁶¹ En Estados Unidos se reporta que cerca de 46.4 millones de personas padecen OA.^{20,62} En América del Norte se espera que el número de los pacientes con OA pase de 2.9 millones (1991) a 6.5 millones para el año 2030.⁶³ Por esta razón, es importante generar estrategias que permitan la reparación de las lesiones del cartílago y evitar el progreso de la enfermedad articular. El implante de condrocitos es una de las estrategias que actualmente se emplean para la reparación del cartílago articular, obtenido de biopsias de cartílago no dañado. Sin embargo este método se encuentra limitado por el tamaño de la lesión que puede reparar que obliga al uso de abundantes condrocitos cuya expansión lleva a su desdiferenciación. Por ello es que en el presente trabajo proponemos definir las condiciones óptimas de aislamiento y cultivo de células troncales de MO así como aquellas movilizadas a sangre periférica, dirigir las hacia un fenotipo condral, las cuales al ser cultivadas en un andamio adecuado que conduzca a la reparación del defecto condral, para luego sembrarlas sobre un andamio adecuado en el sitio de la lesión para la reparación del defecto condral. Produciendo tejido de nueva formación con una composición bioquímica y un comportamiento biológico similar al cartílago articular nativo.

III. Hipótesis

Las CTM de borrego obtenidas de MO y SPM pueden ser diferenciadas a un fenotipo condral manteniendo características morfológicas y moleculares propias de condrocitos de cartílago articular en cultivo en dos dimensiones o un andamio biocompatible.

IV. Objetivo General

Aislar células troncales multipotentes obtenidas de MO y SPM de borregos, cultivarlas y diferenciarlas *in vitro* a un fenotipo condral bajo diferentes condiciones cultivo en pozos en monocapa y adherirse a un andamio biodegradable comercial, corroborando su morfología celular y expresión génica al termino del proceso de diferenciación.

4.1 Objetivos Particulares

Demostrar que las CTM-CD90+ de MO, y las CTM-CD90+ de SPM de borrego, pueden ser inducidas a condorcitos en medio de cultivo condicionado de condrocitos articulares primarios de borrego.

Establecer si las SPM CTM-CD90+ presentan características morfológicas y de expresión génica similares a condrocitos articulares de borrego cuando son sembradas y diferenciadas en un andamio biocompatible (Biosponge).

V. Material y métodos

5.1 Diseño del estudio

Estudio Experimental en el que se emplearon 3 borregas, sanas de la raza Suffolk, machos de entre 1 y 2 años de edad de aproximadamente 67 a 80 kg de peso (figura 2). Los animales fueron adquiridos del rancho los Manueles en el estado de Querétaro de donde fueron transportados a las instancias del bioterio del INR LGII. Su manejo y mantenimiento se realizó con estricto apego a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-1999) para el uso de animales de laboratorio, además que el proyecto fue aprobado el comité de investigación del INR GLII, con el número 17/13.



Figura 2. Fotografía de los tres borregas después de la cuarentena (20 días), en las instalaciones del boterito del INR LGII.

A la par de la compra de las borregas se adquirieron las articulaciones de borregos cadavéricos para la obtención de condrocitos primarios los cuales fueron crio-preservados para luego ser usados en los co-cultivos parácrinos y para la obtención de medio condicionado.

De cada borrega se obtuvo MO y después de un mes se realizó la intención de SPM mediante la aplicación de una dosis diaria de filgrastim 10µg/kg administrado tres días, para después mediante la un gradiente con Ficoll aislar las células mononucleares y con perlas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal anti-CD90 al hacerlas pasar por una columna de separación LS, se obtuvo la población de células de MO y SPM C90+, se realizó la caracterización del inmunofenotipo por citometría de flujo, así como su expansión *in vitro* para su posterior crio-preservación, para su posterior uso en los ensayos de diferenciación.

Primero se inició con los experimentos de diferenciación de las células CD90+ aisladas de la MO, en donde las células fueron inducidas al cultivarse 7 días con medio condicionado para ser cultivados por 14 días con co-cultivo parácrino con condrocitos primarios de cartílago articular, con o sin TGF-β1 y medio condicionado y de esta forma encontrar la mejor condición de diferenciación de las células a condrocito.

Las células CD90+ aisladas de SPM primero se intentó replicar las condiciones experimentales de la MO al probar células expandidas con suero de borrego adulto y después se replicó el experimento de diferenciación con las células CD90+ aisladas de SPM expandidas con suero fetal definido con o sin TGF-β1 y medio condicionado, después se probó con estas mismas células BMP-7, dexametasona y el suplementó compuesto por transferrina, insulina y selenio; para de esta forma establecer la mejor condición experimental para la diferenciación de las CD90+ aisladas de SPM que fueron expandidas con suero fetal bobino definido.

Se probaron tres andamios para el cultivo en tres dimensiones de las células CD90+ aisladas de SPM:

- a) BioSponge (Biograft, cat.16100515), andamio comercial de hueso trabecular desmineralizado humano.
- b) Polímero (1), diseñado y caracterizado por la M en C. Adriana Hernández Rangel en el INR LGII, constituido por 3% de alginato y 0.1% de fosfato beta tricálcico (β -TCP).
- c) Polímero (2), diseñado y caracterizado por la M en C. Adriana Hernández Rangel en el INR LGII, constituido por 3% de alginato y 1% de β -TCP y 0.3% de glucosa.

Se procedió a realizar la diferenciación de las células CD90+ aisladas de SPM, en el andamio BioSponge sin previa sin inducción con medio condicionado al cultivarse directamente con TGF- β 1 o BMP-7, para establecer la mejor condición de cultivo para de diferencian a condrocito de las CD90+ aisladas de SPM en un andamio bioabsorbible en tres dimensiones.

5.2 Mantenimiento de las borregas a su ingreso al bioterio del INR LGII

A su llegada al bioterio del INR GLII fueron puestas en cuarentena (20 días). Durante este periodo el personal del bioterio monitorio su ingesta de alimento, agua y signos vitales. Las borregas se estabularon en una sección especialmente modificada para su estancia en las instalaciones del bioterio a una temperatura ambiente entre 20 y 25 °C, con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y fueron alimentadas *ad libitum* con una dieta a base de: 60% maíz, 10% de soya, 6% de melaza, 2.5% de base de engorda, 21.5% de alfalfa. El heno de avena y la alfalfa llegaron al bioterio en pacas para después ser triturados para su consumo. La base de engorda será en granulado de la marca rural Cow en bolsas de 25 kg.

5.3 Obtención de condrocitos primarios a partir de borregos cadavéricos

Antes de iniciar con los procesos experimentales con las borregas, se procedió a la obtención de condrocitos articulares primarios a partir de borregos cadavéricos con el propósito de generar un banco de condrocitos criopreservados para su uso en experimentos de co-cultivo parácrino y generación de medio condicionado.

Condiciones experimentales:

- a) Las muestras se recolectaron en el rastro municipal de Tlalnepantla en el estado de México, ubicado en Avenida Río Lerma 6, San Javier, 54030 Tlalnepantla, EDO. MEX. Se recolectaron de 3 piernas de borrego, que fueron sacrificados a partir de las 5 AM y las piezas después de ser procesadas fueron puestas a disposición para su recolección aproximadamente a las 9 AM, las que se mantuvieron en refrigeración, sin piel hasta el momento en que nos fueron entregadas.

- b) En un recipiente de plástico del tipo “pet” de 50 cm de largo por 40 de ancho 45 de alto se transportaron las piezas en hielo para mantener las piezas frías hasta el momento de su procesamiento en las instalaciones del INR GLII. Cada pieza pesó de 3.5 kg y para evitar el riesgo de contaminación se mantuvieron completas hasta su abordaje en el quirófano del bioterio del INR GLII.
- c) Una vez en las instalaciones del bioterio del INR GLII, en el quirófano empleando guanteas estériles, bata quirúrgica estéril, cubre bocas y gorro, sobre un campo estéril y con las ayuda de dos campos estériles en rollados se colocaron la piernas de forma articulada en un ángulo de aproximadamente 35 grados. Se procedió a lavar la zona de la articulación de la rodilla exhaustivamente con una solución jabonosa de yodo y se removió el exceso del antiséptico con una gasa estéril. Enseguida se colocaron los campos estériles dejando expuesta la zona de interés. Debido a que la cápsula de la articulación en ovinos se encuentra muy expuesta, el abordaje fue de forma directa con una navaja de bisturí del número 20, realizando un corte sagital gusto debajo de la patela, procurando cortar los ligamentos patelo-lateral, patelo-intermedio y patelo medial, hasta dejar expuestos los cóndilos femorales.
- d) Con una navaja de bisturí del número 20 se procedió a rasurar la superficie del cóndilo obteniendo algo parecido a obleas de cartílago que se colectaron en tubos estériles de polipropileno de 50 mL, de fondo cónico, con 10 mL de medio, DMEM/F12 suplementado con 10 % de antibiótico-antimicótico.
- e) Las muestras se transportaron a la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa (UITTC y MR), en donde bajo condiciones estériles dentro de la campana de flujo laminar las muestras de cartílago se procesaron de la siguiente manera:

- f) Las muestras se lavaron con 5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS, marca GIBCO), con antibiótico antimicótico (marca GIBCO) al 10% dos veces. Se lavaron nuevamente con medio DMEM/F12, suplementado con antibiótico antimicótico al 10%. En una caja Petri de 60x100 mm de plástico, se depositó el tejido con el medio y con ayuda de una navaja de bisturí, se fragmentó el cartílago en la caja Petri. Los fragmentos se transfirieron a un tubo de 50 mL conteniendo 10 mL de medio DMEM/F12 con antibiótico antimicótico al 1% y colagenasa del tipo (Worthington) al 0.3%.
- g) Se colocó el tubo con la muestra en agitación constante de 150 rpm (en un agitador orbital, marca THERMO) a 37°C durante 4.5. Después se centrifugó la muestra a 300xg durante 12 min. Se retiró el sobrenadante y se re-suspendió el botón celular obtenido en 5 mL de medio DMEM/F12 con antibiótico al 1% y se centrifugó la muestra a 300xg durante 12 min. Se retiró el sobrenadante y se re-suspendió el botón celular obtenido. Para luego agregar 2 mL de medio DMEM/F12 con suero de borrego adulto (SBA, Biowest) y 1% de antibiótico antimicótico.
- h) De esta suspensión se tomó una alícuota de 10 µL y se colocó en un pozo de una placa de 96 pozos, que se mezcló con 10 µL de azul tripano. De esta suspensión se tomaron 10 µL que se colocaron en la cámara de Neubauer para realizar conteo celular.
- i) Del total de las células contadas en las 5 áreas de la cámara se realizó la siguiente ecuación:

$$= \frac{\text{Número total de células viables}}{5} \times 2 \times 10,000 \div (\text{el volumen en mL de medición})$$

Las células se congelaron en crio-tubos en alícuotas de 0.5×10^6 en suero fetal bovino suplementado con 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma). Los crio-tubos se almacenaron en un crio-tanque sumergido nitrógeno líquido a -196°C .

5.4 Obtención de medio condicionado: medio de cultivo de condrocitos primarios de cóndilos femorales de borrego.

De condrocitos articulares primarios obtenidos de ovinos cadavéricos.

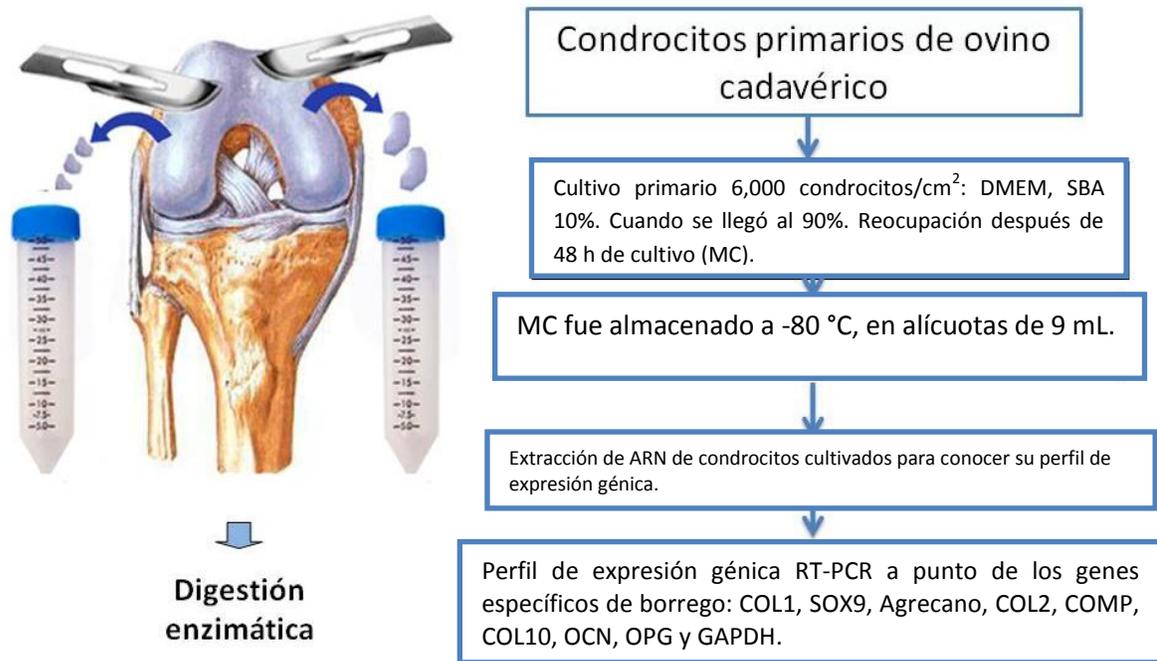


Figura 3. Esquema para la obtención de MC. Es el medio de cultivo de condrocitos articulares primarios obtenidos de ovinos cadavéricos.

Condiciones experimentales:

- a) Se obtuvieron condrocitos primarios previamente aislados de cóndilos femorales mediante digestión mecánico-enzimática, criopreservados en nitrógeno líquido, a una densidad de medio millón de células por mL de medio de criopreservación (90% de SFB con 10% de DMSO).

- b) Se procedió a descongelar en baño María los criotubos suficientes para obtener 9 millones de células (18 crio-tubos).
- c) Una vez descongelados los criotubos se colectó el contenido en un tubo de 15 mL de cultivo de fondo cónico el cual se centrifugó por 10 min a 300xg para retirar el medio de criopreservación.
- d) Retirado el medio de criopreservación el botón celular se re-suspendió en el medio de expansión necesario para obtener una densidad celular de 900,000 células por mL. Se colocó 1 mL de la re-suspensión en frascos de cultivo de 150 cm² (un total de 10 frascos) para después agregar 24 mL de medio de expansión por cada frasco de cultivo. La composición del medio de expansión fue:

Medio DMEM (Gibco; Cat. 11995-065), conteniendo 4.5g/L de D-glucosa, L-glutamina y 110 mg/L de piruvato de sodio), 10% de suero de borrego adulto (SBA, BIOWEST; Cat. S2350-500) y 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco, Cat. 15240-096).

- e) Se procedió hacer cambios de medio cada dos días (25 mL de medio) hasta que las células alcanzaron el 90 % de confluencia.
- f) Cuando las células alcanzaron la confluencia deseada, se procedió a retirar el medio fresco en su totalidad y se agregaron 30 mL del medio de expansión fresco. Este medio después se almacenó como MC a -80°C en alícuotas de 9 mL previa filtración a través de una membrana de 0.22 µm para esterilizar y eliminar restos de la matriz extracelular.

5.5 Obtención de la médula ósea

La obtención de la MO de las borregas se realizó en el quirófano a través de la cresta iliaca según se describe a continuación:



Figura 4. Toma de MO. La toma se realizó con anestesia total del animal, en la cresta iliaca, empleando una aguja concéntrica Jamshidi diseñada específicamente para toma de médula. Se colectaron 20 mL de MO en tubos heparinizados, para su transporte al laboratorio de la UITTC y MR para su procesamiento.

- a) Cada borrega fue pre-anestesiada utilizando una dosis de acepromacina de 0.1 mg/kg de peso corporal por vía endovenosa (EV). [Acepromacina viene en una presentación en frasco de 100 mL a una concentración de 5 mg/mL]. Posteriormente se canalizó la vena radial para la vía administración del

anestésico. La vía se mantuvo abierta con el paso de una solución salina a goteo lento.

- b) Enseguida se anestesió a la borrega utilizando propofol (un anestésico de corta duración) a una dosis inicial de 1 mg/kg de peso corporal vía EV y se colocó al animal en la mesa quirúrgica. [El propofol viene en ampolletas de 20 mL a una concentración de 10 mg/mL]. Se profundizó el estado de anestesia mediante la administración continua de propofol a la misma dosis. En caso de dar señales de estarse despertando la borrega durante el procedimiento quirúrgico se le administró con la misma dosis a criterio más propofol.
- c) Se rasuró la zona de punción y se lavó la zona exhaustivamente con una solución jabonosa de yodo; se removió el exceso del antiséptico con una gasa estéril.
- d) Enseguida se colocaron campos estériles dejando expuesta la zona de toma de MO.
- e) Se embrocó la zona de toma de MO utilizando la camisa de una aguja concéntrica Jamshidi, diseñada específicamente para toma de MO.
- f) Enseguida se localizó el ala dorsal del ilión y se perforó con la aguja central del Jamshidi para aspirar la MO que se recogió en una jeringa de 20 mL.
- g) La MO se transfirió a tubos de vidrio heparinizados de 12x75 mm y se mezcló con la heparina.
- h) Las muestras de MO se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio la UITTC y MR para su procesamiento.
- i) Después de la toma de MO, la borrega se regresó a su corral donde fue monitoreada por el personal del bioterio del INR LGII hasta su recuperación.

5.6 Obtención de la sangre periférica movilizada

Transcurrido un mes de la toma de MO de cada borrego se procedió a la obtención de SPM, mediante la aplicación de una dosis diaria del G-CSF $10\mu\text{g}/\text{kg}$ administrado tres días, al cabo de los cuales se colectaron 20 mL de SPM, como se describe a continuación:

- a) Se rasuró la zona del surco yugular y se presionó hacia la parte distal de surco de la yugular para hacer patente el vaso sanguíneo.



Figura 5, Toma de SPM, la muestra se toma con el animal de pie, sin anestesia, con previo rasurado de la zona de la toma de muestra, en el cuello del animal en donde por palpación se localizó la vena yugular de donde se tomó la muestra con un equipo de venopunción (vacutainer BD), se tomaron 20 mL de SPM la cual se colecto en tubos heparinizados de 12x75 mm.

- b) Se procedió a la antisepsia de la zona utilizando solución de yodo y alcohol al 70%. Se lavó la zona 3 veces.

- c) Se retiró el remanente de estas soluciones antisépticas con gasa limpia.
- d) Para la venopunción se utilizó una aguja de calibre 16-18 G. Se tomaron 20 mL.
- e) Se extrajo la muestra haciendo presión negativa en la jeringa para llenar el barril con la sangre. Se hizo presión con ayuda de una gasa con alcohol en el punto de incisión de la aguja retirándola suavemente. Finalmente se vertió la sangre en 6 tubos de vidrio heparinizados de 12x75 mm. Las muestras se mezclaron agitándolas gentilmente antes de enviarlas a la UITTC y MR.

5.7 Aislamiento de células CTM-CD90+ de médula ósea y de sangre periférica movilizada.

Se aislaron las células mononucleares (CMN) de las muestras de MO y SMP, por gradiente en Ficoll de 400 kDa de peso molecular.

Haciendo una dilución 1:2 de la muestra de MO o SPM, con PBS y colocando 25 mL de la mezcla cuidadosamente sobre 15 mL de Ficoll en un tubo de 50 mL de fondo cónico, la muestra se centrifugó por 300xg por 35 min, obteniéndose la capa de células mononucleares (CMN), en la interface entre el Ficoll y el sobreañádadle acuoso.

A partir de las CMN se aislaron células CTM-CD90+, por medio del equipo de separación celular magnética (Miltenyi, cat. 130-042-303) empleando perlas magnéticas recubiertas con el anticuerpo monoclonal anti-CD90 (Miltenyi, cat. 130-096-253) y columnas de separación LS (Miltenyi cat. 130-096-253), Del número total de células CTM-CD90+ que se obtuvieron, se hicieron alícuotas de 1×10^5 células para su caracterización por citometría de flujo y su almacenamiento en nitrógeno líquido (a -196°C).

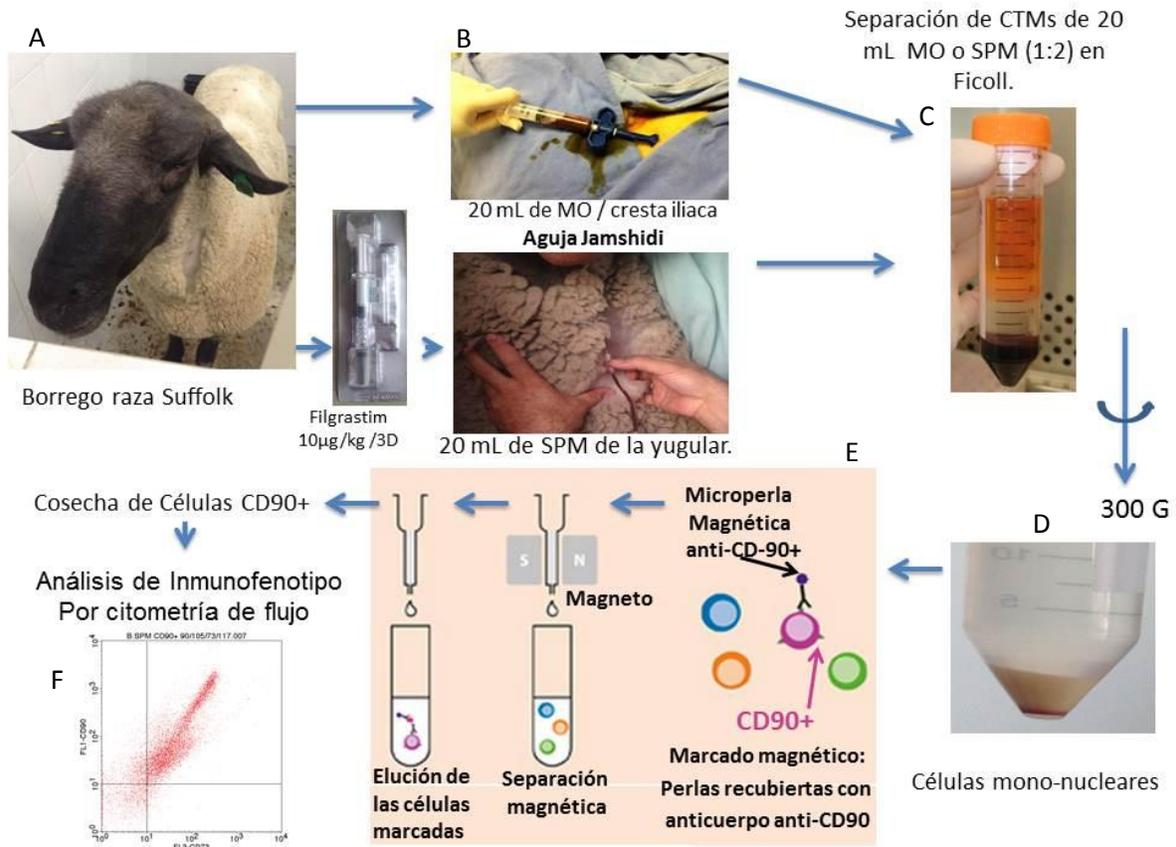


Figura 6. Diagrama del proceso de aislamiento de las células CTM-CD90+. Siguiendo el sentido de las flechas. A) Borrega de la raza Suffolk; B) Tomo de la MO y la SPM; C) Separación de las células mononucleares mediante el uso de una gradiente con Ficoll; D) Botón celular obtenido después de la superación con Ficoll de las células mononucleares; E) Aislamiento de la población de células CD90+, mediante el uso de superparamagneticas recubiertas con el anti-CD90; F) Análisis del inmunofenotipo de las células CD90+ cosechas a través de la separación magnética por citometría de flujo.

5.8 Expansión *in vitro* de las células troncales mesenquimales CD90+ aisladas de médula ósea y sangre periférica movilizada

Para efectuar los experimentos de diferenciación se descongelaron dos alícuotas de 1×10^5 las células CTM-CD90+ de MO se expandieron en cultivo primario en cajas tratadas para favorecer la adherencia celular de 150 cm^2 (Cornig, cat. 430824) empelando el medio DMEM suplementado con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

Para la expansión de las células CTM-CD90+ obtenidas de SPM se probaron dos condiciones: A) cultivo primario en cajas de 150 cm^2 (Cornig) empelando el medio DMEM suplementado con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, y B) cultivo primario en cajas de 150 cm^2 empleando el medio DMEM suplementado con Suero fetal bovino Definido 10% (DSFB, HyClone, cat.SH30070.02) y 1 % de antibiótico/antimicótico, según lo reportado por Favaron y cols en el 2014.²¹

5.9 Caracterización por citometría de flujo

Se emplearon alícuotas de 5×10^5 células CTM-CD90+ de MO y SPM para determinar la expresión de marcadores de superficie de por citometría de flujo. Los datos fueron adquiridos en un citómetro de flujo BD FACSCalibur y analizados por el software Cell Quest PRO™ (Becton Dickinson) con una media de 10, 000 eventos. A continuación se explica el procedimiento de marcaje: Las células CTM-CD90+ fueron lavadas con PBS. Una porción de aproximadamente 2.5×10^4 células fueron colocadas en tubos de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson). Se les añadieron 10 μL de la suspensión de anticuerpos (tres anticuerpos por tubo, total de 2 tubos) que se dejan incubando 30 minutos a 4°C . Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 Y CD105, todos de la marca BD Pharmigen™.

5.10 Diferenciación con células CTM-CD90+ aisladas de médula ósea

Este ensayo tuvo como propósito diferenciar CTM CTM-CD90+ de MO de ovino adulto a linaje condral por inducción en MC de condrocitos primarios de cartílago articular de ovino adulto. Seguido de co-cultivo parácrino con condrocitos primarios de cartílago articular y TGF- β 1 recombinante de humano (Miltenyi, cat. 130-095-066. Al término del proceso de diferenciación. Se caracterizaron las células por morfología y expresión génica por RT-PCR a punto final de genes propios del cartílago articular.

Condiciones experimentales:

Los experimentos se realizaron en cajas de cultivo de 6 pozos como se muestran a continuación:

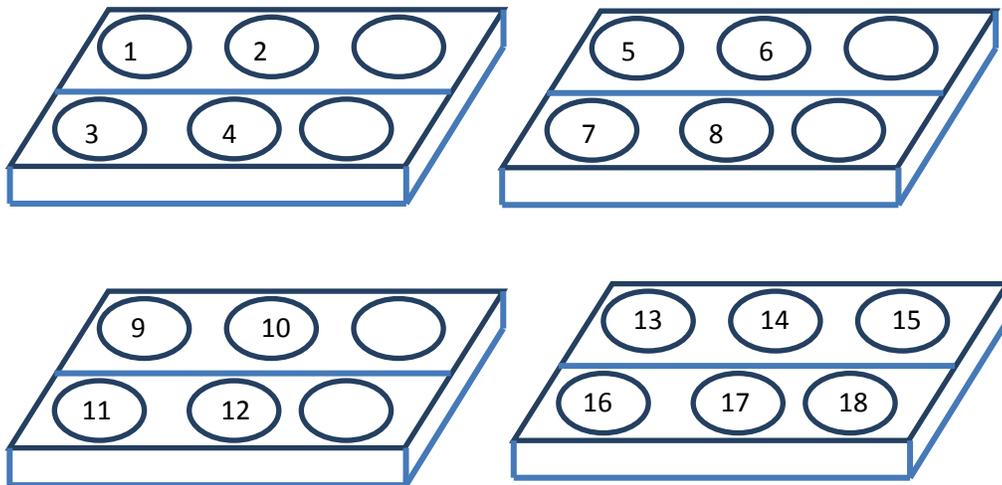


Figura 7, Diagrama de la organización de las condiciones del cultivo. De los pozos 1 al 8 se realizó el experimento por 7 días de forma directa con el TGF- β 1 y MC. De los pozos del 9 al 18, se realizó el experimento con la previa inducción con el MC y el subsecuente cultivo con co-cultivo parácrino con condrocitos primarios de cartílago articular, con o sin TGF- β 1 y MC.

Descripción de las condiciones de cultivo:

Seguimiento a 7 días

De los pozos 1 al 8 se realizó seguimiento por 7 días

Las condiciones fueron las siguientes:

Pozos 1 y 2: células CTM-CD90+ de MO (100,000 células), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

Pozos 3 y 4: células CTM-CD90+ de MO (100,000 células), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Pozos 5 y 6: células CTM-CD90+ de MO (100,000 células), cultivadas en MC.

Pozos 7 y 8: células CTM-CD90+ de MO (100,000 células), cultivadas en MC, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Al término de los periodos de incubación se extrajo el ARN de las células de cada pozo y por RT-PCR en punto final, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO, COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP).

Pozos del 9 al 18: Fueron inducidos cultivándolos inicialmente por días en MC y diferenciados a condrocitos por 14 días en las condiciones que se explican a continuación:

Pozos 9 y 10: células CTM-CD90+ de MO inducidas (100,000 células), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

Pozos 11 y 12: células CTM-CD90+ de MO inducidas (100,000 células), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Pozos del 13 al 15: células CTM-CD90+ de MO inducidas (100,000 células), co-cultivadas con 50,000 condrocitos primarios en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

En el pozo 15 se usó membrana del inserto de policarbonato para permitir la extracción del ARN de los condrocitos.

Pozos del 16 al 18: células CTM-CD90+ de MO inducidas (100,000 células), co-cultivadas con 50,000 condrocitos primarios en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

En el pozo 18 se usó membrana del inserto de policarbonato para permitir la extracción del ARN de los condrocitos.

Al finalizar del periodo de diferenciación se extrajo el ARN de cada pozo y por RT-PCR, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO, COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP).

5.11 Diferenciación con células CTM-CD90+ movilizadas de médulas óseas y aisladas en sangre periférica y expandidas empleando medio suplementado con suero de borrego adulto

El propósito de este experimento fue Diferenciar CTM CTM-CD90+ aisladas de SPM de ovino adulto expandidas en cultivo primario con SBA al 10% a linaje condral por inducción en medio de cultivo condicionado de condrocitos primarios de cartílago articular de ovino adulto y co-cultivo parácrino con condrocitos primarios de cartílago articular y TGF- β 1 recombinante de humano. Caracterizar las células diferenciadas por morfología y expresión génica por RT-PCR a punto final de genes propios del cartílago articular.

Condiciones experimentales:

Los experimentos se realizaron en cajas de cultivo de 6 pozos como se muestran a continuación:

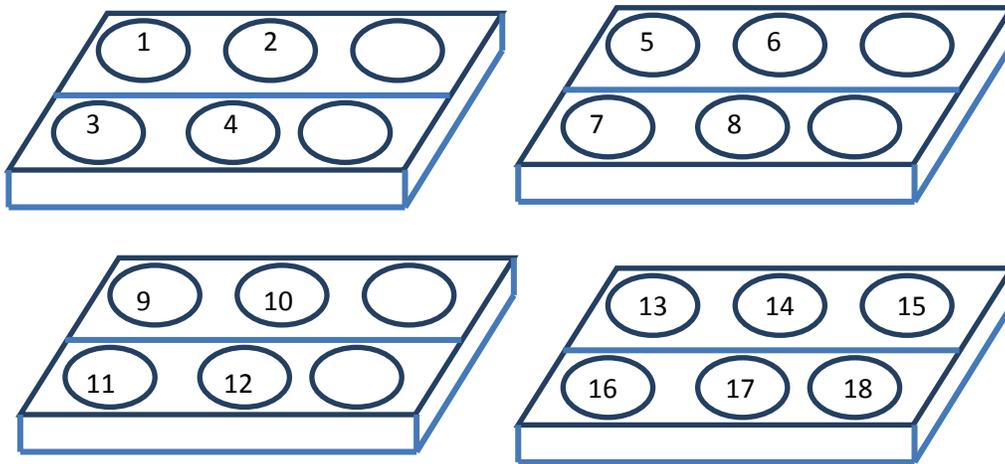


Figura 8. Diagrama de la organización de las condiciones del cultivo. De los pozos 1 al 8 se realizó el experimento por 7 días de forma directa con el TGF- β 1 y MC. De los pozos del 9 al 18, se realizó el experimento con la previa inducción con el MC y el subsecuente cultivo con co-cultivo parácrino con condrocitos primarios de cartilago articular, con o sin TGF- β 1 y MC.

Descripción de las condiciones de cultivo:

Seguimiento a 7 días:

De los pozos 1 al 8 se realizará seguimiento por 7 días

Las condiciones fueron las siguientes:

Pozos 1 y 2: células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

Pozos 3 y 4: células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Pozos 5 y 6: células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células), cultivadas en medio condicionado.

Pozos 7 y 8: células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células), cultivadas en medio condicionado, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Al término de los periodos de incubación se extrajo el ARN de las células de cada pozo y por RT-PCR en punto final, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO, COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP).

Pozos del 9 al 18: Fueron inducidos cultivándolos inicialmente por días en MC y diferenciados a condrocitos por 14 días en las condiciones que se explican a continuación:

Pozos 9 y 10: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

Pozos 11 y 12: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Pozos del 13 al 15: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células), co-cultivadas con 50,000 condrocitos primarios en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

En el pozo 15 se empleará la membrana del inserto de policarbonato para permitir la extracción del ARN de los condrocitos.

Pozos del 16 al 18: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células), en cultivo paracrino con 50,000 condrocitos primarios en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

En el pozo 18 se empleó una membrana del inserto de policarbonato para permitir la extracción del ARN de los condrocitos.

Al finalizar del periodo de diferenciación se extrajo el ARN de cada pozo y por RT-PCR, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO, COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP).

5.12 Diferenciación de CTM-CD90+ de en sangre periférica movilizada y expandidas en medio suplementado en medio con DSFB

Se diferenciaron a linaje condral CTM-CD90+ aisladas de SPM de ovino adulto expandidas en cultivo primario con 20% de suero fetal bovino “DEFINDO” (DSFB) de la marca HyClone (cat. SH30070.02), por inducción en MC y co-cultivo parácrino ambos con condrocitos primarios, fueron caracterizados por morfología y expresión génica por RT-PCR a punto final.

Condiciones experimentales:

Los experimentos se realizaron en cajas de cultivo de 6 pozos como se muestran a continuación:



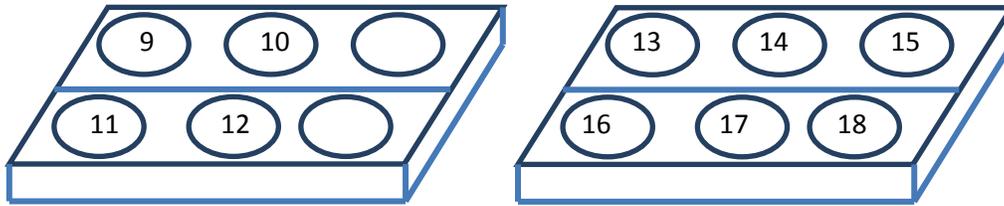


Figura 9, Diagrama de la organización de las condiciones del cultivo. El experimento se realizó empleando CTM-CD90+ de SPM expandías con DSFB. De los pozos 1 al 8 se realizó el por 7 días de forma directa con el TGF- β 1 y MC. De los pozos del 9 al 18, se realizó el experimento con la previa inducción con el MC y el subsecuente cultivo con co-cultivo parácrino con condrocitos primarios de cartílago articula, con o sin TGF- β 1 y MC.

Seguimiento a 7 días:

De los pozos 1 al 8 el tiempo de cultivo fue por 7 días

Condiciones de cultivo (cambios de medio cada 2 días):

Pozos 1 y 2: células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células expandías en medio con DSFB), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

Pozos 3 y 4: células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células expandías en medio con DSFB), fueron cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Pozos 5 y 6: células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células expandías en medio con DSFB), cultivadas en MC.

Pozos 7 y 8: células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células expandías en medio con DSFB), cultivadas en MC, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Al término de los tiempos de cultivo se extrajo el ARN de las células diferenciadas y por RT-PCR, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO (AGR), COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), OPN, OCN, COLX y RUNX2.

Pozos del 9 al 18: Se realizó inducción de las células CTM-CD90+ de SPM (100,000 células), cultivándolas por 7 días con MC y luego someterlas a las siguientes condiciones de cultivo por 14 días más.

Pozos 9 y 10: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células expandías en medio con DSFB), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

Pozos 11 y 12: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células expandías en medio con DSFB), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

Pozos del 13 al 15: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células expandías en medio con DSFB), en co-cultivo parácrino con 50,000 condrocitos primarios en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico.

En el pozo 15 se empleó la membrana del inserto de policarbonato como soporte de condrocitos primarios para permitir su extracción del ARN de los condrocitos.

Pozos del 16 al 18: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células expandías en medio con DSFB), en co-cultivo parácrino con 50,000 condrocitos primarios en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, mas TGF- β 1 (10 ng/mL).

En el pozo 18 se emplearon la membrana del inserto de policarbonato para permitir la extracción del ARN de los condrocitos.

Al término de los tiempos de cultivo se extrajo el ARN de las células diferenciadas y por RT-PCR, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO (AGR), COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), OPN, OCN, COLX y RUNX2.

5.12.1 Diferenciación a un fenotipo condral de células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada que previamente fueron inducidas en medio condicionado.

En esta serie experimental se probó el potencial de los factores de crecimiento: TGF- β , BMP-7 y el de las moléculas: Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) así como dexametasona, para la diferenciación a una fenotipo condral de las células CTM-CD90+ de SPM, previamente fueron inducidas en MC.

Condiciones experimentales:

Los experimentos se realizaron en cajas de cultivo de 6 pozos como se muestran a continuación:

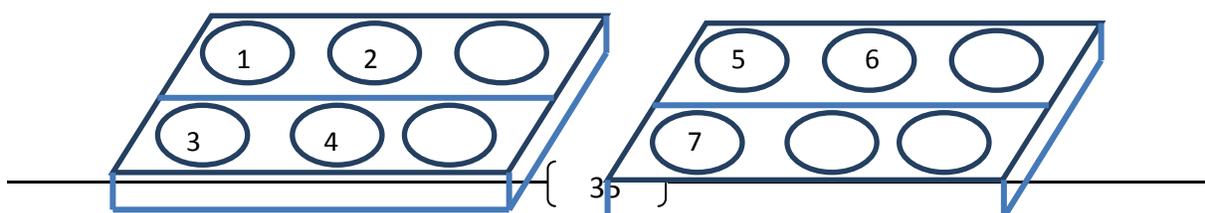


Figura 10. Diagrama de la organización de las condiciones del cultivo. Figura 9, Diagrama de la organización de las condiciones del cultivo. El experimento se realizó empleando CTM-CD90+ de SPM expandías con DSFB, que después fueron cultivadas por 7 días en MC. De los pozos 1 y 2 las células fueron cultivadas por 14 días en medio suplementado con ITS al 1%. Los pozos 3 y 4 las células fueron cultivadas por 14 días en medio suplementado con BMP-7 (100 ng/mL). En los pozos 5 y 6 las células fueron cultivadas por 14 días en medio suplementado con dexametasona (100 nM); y por último en el pozo 7 se cultivaron las células por 14 días en medio suplementado con BMP-7 (100 ng/mL) y TGF- β 1 (10 ng/mL).

De los pozos 1 al 7 se sembraron 100,000 células CTM-CD90+ de SPM en pase 1 (previamente expandías en medio con DSFB al 10%. Se mantuvieron en cultivo en MC por 7 días. Se realizaron cambios de medio cada 2 días.

Pozos 1 y 2: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células expandías en medio con DSFB), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, más 1% de ITS.

Pozos 3 y 4: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células expandías en medio con DSFB), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, adicionado con BMP-7 (100 ng/mL).

Pozos 5 y 6: células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células expandías en medio con DSFB), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, adicionado con dexametasona (100nM).

Pozo 7. Células CTM-CD90+ de SPM inducidas (100,000 células expandidas en medio con DSFB), cultivadas en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, adicionado con BMP-7 (100 ng/mL) y TGF- β 1 (10 ng/mL).

Al término de los tiempos de cultivo se extrajo el ARN de las células diferenciadas y por RT-PCR, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO (AGR), COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), OPN, OCN, COLX y RUNX2.

5.13 Extracción de ARN y expresión génica de células CTM-CD90+SPM-DSFB sembradas en tres diferentes andamios.

El ARN de células CTM-CD90+SPM-DSFB cultivadas por 7 días en tres andamios biocompatibles hechos a base de compuestos bio-compatibles:

- d) BioSponge (Biograft, cat.16100515), andamio comercial de hueso trabecular desmineralizado humano (ver figura 11).
- e) Polímero (1), diseñado y caracterizado por la M en C. Adriana Hernández Rangel en el INR LGII, constituido por 3% de alginato (Sigma, cat. 180947) y 0.1% de fosfato beta tricálcico (β -TCP.Sigma, cat. 13204).
- f) Polímero (2), diseñado y caracterizado por la M en C. Adriana Hernández Rangel en el INR LGII, constituido por 3% de alginato y 1% de β -TCP y 0.3% de glucosa (Sigma, cat. G8270).



Figura 11. Datos de control de calidad del lote del andamio comercial Biosponge que se emplearon para realizar los experimentos.

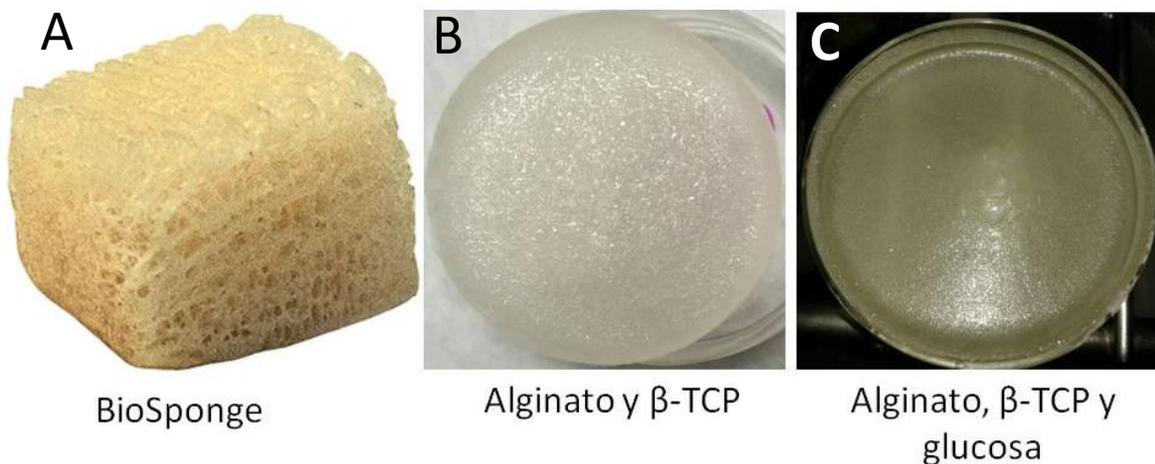


Figura 11.1. Fotografía de los andamios empleados en el experimento. A) BioSponge, e un andamio elaborado a partir de la matriz ósea desmoralizada de huesos humanos, posee poros de 2000 a 100 micras y de forma comercial se obtiene liofilizado. B) Andamio elaborado a partir de 3% de alginato y 0.1% β -TCP, elaborado con el método de gelación con cloruro de calcio, con poros de 200 a 100 micras. C) Andamio elaborado a partir de 3% de alginato y 1% de β -TCP y 0.3% de glucosa, elaborado con el método de gelación con cloruro de calcio, con poros de 100 a 50 micras.

Condiciones experimentales:

- a) Se descongelaron 2 crio-tubos con 0.5×10^6 células CTM-CD90+SPM-DSFB y se cultivaron durante 7 días en medio de cultivo DMEM con SBA al 10% y 1% de antibiótico antibiótico/antimicótico, en una caja de 75 cm^2 .
- b) Llegando a confluencia (90%) se procedió a despegarlas las CTM-CD90+SPM-DSFB de las cajas de cultivo empleado acutasa (Gibco, cat. A1110501). Se empleó acutasa en lugar de la tripsina, debido a que no necesita de lavados, neutralización ya que no daña las paredes celulares y de esta forma ayuda a conservar la viabilidad celular durante la manipulación de las células troncales en cultivo.⁶⁴ Una vez separadas las células de las cajas de cultivo se concentraron por centrifugación (10 min por 300xg) las células en un tubo de fondo cónico de 50 mL. Se eliminó el sobrenadante se re-suspendió con $100 \mu\text{L}$ de medio DMEM con SBA al 10% y 1% de antibiótico/antimicótico.
- c) Con la ayuda de un equipo "COR Precision Targeting System" (Johnson & Johnson) de 6 mm de diámetro se perforaron los polímeros 1, 2 y BioSponge, obteniéndose taquetes de 6 mm de espesor.
- d) Dentro de la campana de flujo laminar se prepararon triplicados de cada andamio, en un pozo (de una caja de 6 pozos), la cara lateral y la cara inferior (cara en donde el

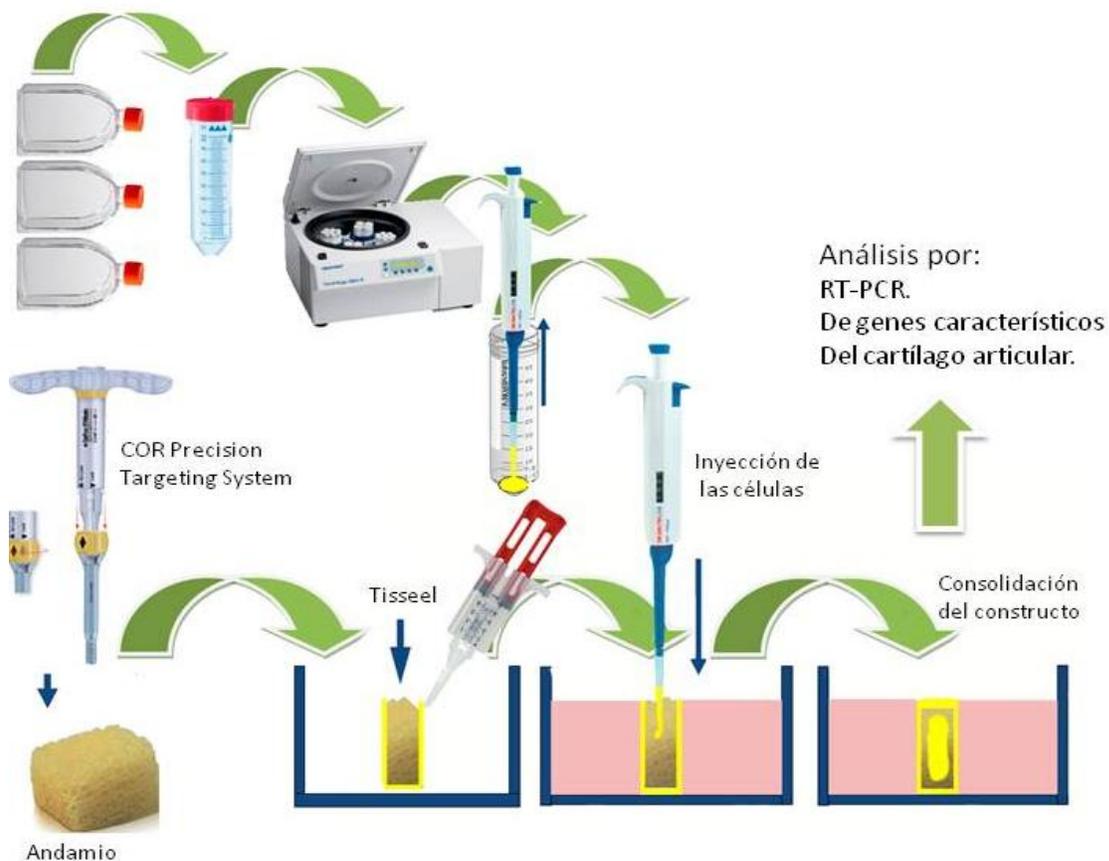


Figura 12. Esquema de la elaboración del constructo. Primero se expanden células CTM-CD90+SPM-DSFB, para luego por centrifugación para obtener un botón celular el cual con una micropipeta es colocado dentro de unos de los andamios (polímero 1,2 o BiosPonge), los cuales previamente fueron recubiertos con el pegamento de fibrina solo dejando la cara superior sin cubrir por donde se inyectaron las células. Para finalizar se llena con medio el pozo hasta casi cubrir el andamio, en donde permaneció por 14 días en cultivo.

e) taquete quedo adherido a la pozo) del taquete se recubrieron con el pegamento a base de fibrina humana "tisseel" (BAXTER, cat.3400518), formando un reservorio que impida que las células salgan del taquete y favorezca la adhesión de la células al

mismo (no se recubrió la cara superior del taquete), el pegamiento tardó en polimerizar aproximadamente 5 min.

- f) Empleando una micropipeta de 200 μ L, se introdujo la punta hasta la mitad de los taquetes por la cara superior (no recubierta con pegamento de fibrina) dispensando lentamente la solución celular, para después añadir medio de cultivo en los pozos de cultivo hasta apenas sumergir la capa superior del constructo.
- g) Se mantuvieron los constructos por 14 días en cultivo. Después se evaluaron la cantidad y calidad del ARN que se extrajo de las células por RT-PCR, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO (AGR), COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), OPN, OCN, COLX y RUNX2.

5.13.1 Extracción de ARN y expresión génica de células CTM-CD90+SPM-DSFB sembradas en BioSponge y diferenciadas a condrocito sin previa inducción con MC.

El propósito de este experimento fue demostrar de la expresión de genes característicos de cartílago articular en CTM aisladas de SPM que fueron sembradas en un andamio comercial en 3D (BioSponge) y diferenciadas a cartílago sin previa inducción con MC.

Condiciones experimentales propuestas: Los experimentos se realizaron en cajas de cultivo de 6 pozos como se muestran a continuación:

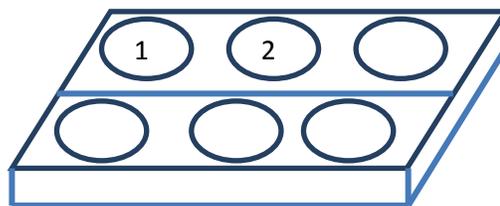


Figura 13. Diagrama de la organización de las condiciones del cultivo. El experimento se realizó empleando CTM-CD90+ de SPM expandidas con DSFB, sin previa inducción con MC. En el pozo 1, las células sembradas en el andamio fueron cultivadas por 14 días en

medio suplementado con BMP-7 (100 ng/mL). En el pozo 2, las células sembradas en el andamio fueron cultivadas por 14 días en medio suplementado con TGF- β 1 (10 ng/mL).

Condiciones experimentales

- a) Se descongelaron 2 crio-tubos almacenados en nitrógeno líquido conteniendo 0.5×10^6 células SPM CTM-CD90+ en una caja de 150 cm^2 , hasta llegar a confluencia (en confluencia obtuvieron 4×10^6 por caja) y se cultivaron en medio DMEM y suero fetal bovino definido al 20% y 1% de antibiótico/antimicótico.
- b) Con la ayuda de un equipo "COR Precision Targeting System" (Johnson & Johnson) de 6 mm de diámetro se perforó el andamio (6 mm de diámetro y 5 mm largo). Dentro de la campana de flujo laminar en un pozo de una caja de 6 pozos la cara lateral e inferior del taquete fue recubierta con el pegamento a base de fibrina humana "tisseel" (BAXTER), con el cual se formara un reservorio que impida que las células salgan del taquete y favorezca la adhesión de la células al mismo (el pegamento tarda en polimerizar aproximadamente 5 min).
- c) Se sembraron 2.5×10^5 células previamente expandidas en cada andamio que también previamente se pre-acondicionó para el cultivo en un pozo de una caja de seis pozos (se emplearon un total de 4 andamios previamente cortados, por duplicado para los pozos 1 y 2), como se describe a continuación: Una vez separadas las células de la caja de 150 cm^2 de cultivo se concentraron por centrifugación en un tubo de fondo cónico de 50 mL, eliminado el sobrenadante se re-suspendieron con 100 μL de medio de cultivo. Con la ayuda de una micropipeta de 200 μL introduciéndola hasta la mitad del taquete por la cara superior que no fue cubierta con el pegamento de fibrina (tisseel) lentamente se dispensó la solución celular, para después cubrir con medio de cultivo la totalidad del constructo.

- d) Para la diferenciación de las células a cartílago por 14 días en el pozo 1 los dos andamios con las células CTM-CD90+ de SPM y se cultivaron por 14 días en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, adicionado con BMP-7 (100 ng/mL). En pozo 2 los dos andamios con las células CTM-CD90+ de SPM y se cultivaron por 14 días en medio DMEM con SBA al 10% y 1 % de antibiótico/antimicótico, adicionado con TGF B1 10 ng/mL.
- e) Después del periodo de cultivo se extrajo el ARN de las células y por RT-PCR, se evaluó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO (AGR), COL2A1, proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), OPN, OCN, COLX y RUNX2.

5.14 Método para la extracción de ARN y evaluar la expresión génica de células en cultivo en monocapa y en un andamio en 3D

5.14.1 Extracción de ARN en células en monocapa y en células en un andamio

Preparativos

- a. Se prendió la centrifuga y se enfrió a 4°C.
- b. Se limpió todo el material y equipo con una gasa con solución RNaseZap (cat. AM9780. Ambion) para inactivar DNAsas y ARNasas.
- c. Se utilizaron guantes estériles y limpiarlos con la solución anterior

Por pozo:

Extracción de ARN a partir de células cultivadas a confluencia en cajas de 6 pozos.

- a. Se agregó 1 mL de Trizol (Cat.15596-026 Lot. 1392922 INVITROGEN) por pozo.

- b. Se mezclaron las células en el reactivo y se dejar reposar por 5 min a temperatura ambiente.
- c. La mezcla se transfirió a un tubo de 1.5 mL estéril.
- d. Se añaden 200 μ L de cloroformo por tubo (Cat. 2432.1 Lot. 40K0199 SIGMA) por pozo.

Extracción de ARN a partir de células cultivadas en un andamio.

- a. Al término del período de incubación se sumerge el andamio en nitrógeno líquido dentro de un mortero de cerámica (el mortero de cerámica previamente se enjuagó con agua tratada con DPEC, se limpió con una gasa que estuvo empapada en RNaseZap, se guardó en una bolsa de papel y se almacenó hasta su uso a -80°C) y se maceró la muestra con un pistilo de cerámica (el pistilo recibió el mismo tratamiento que la muestra). Dentro del nitrógeno líquido el andamio puede permanecer almacenado indefinidamente.
- b. Retirado el nitrógeno líquido se pasó el macerado a un tubo de 1.5 mL estéril y se mezcló la muestra con 1 mL de Trizol (Cat.15596-026 Lot. 1392922 INVITROGEN) por pozo.
- c. Se mezcló y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente y se pasó la mezcla a tubos de 1.5 mL estériles.
- d. Se añadieron 200 μ L de cloroformo por mL de trizol.

Por tubo

- a. Se agitó el tubo vigorosamente por 15 segundos; y se dejó reposar por 3 min a temperatura ambiente.
- b. Se centrifugó el tubo por 15 min a 11.913 rpm a 4°C .

- c. Tomar cuidadosamente la fase acuosa evitando el contacto con la fase intermedia de ADN y se colocó el sobrenadante en un tubo libre de AARNsas y DNAsas (tubos tipo Eppendorf, estériles de 1.5 mL).
- d. A la fase acuosa se le agregó 500 μL isopropanol (Cat. I-0398 Lot. 28H3527 SIGMA) por cada mL de Trizol utilizado
- e. Se mezcló y se incubó por 10 min a temperatura ambiente
- f. Se centrifugó a 11.913 rpm por 10 min en frío 4°C
- g. Se decantó el sobrenadante
- h. Al precipitado se le añadió 1 mL etanol al 75% (Cat. E7023 Lot 41796KM SIGMA) por cada mL de Trizol utilizado
- i. Se re-suspendió la pastilla con agitación en el vortex para lavar el precipitado
- j. Se centrifugó a 11.913 rpm por 5 min en frío a 4°C
- k. Se decantó el sobrenadante cuidadosamente, asegurándose de no perder la pastilla
- l. Se secó el precipitado dentro de la campana de flujo laminar a temperatura ambiente
- m. Se re-suspendió la pastilla con 50 μL de agua grado biología molecular libre de DNAsas y ARNsas (el volumen de agua depende del tamaño de la pastilla de 20 a 50 μL)
- n. El ARN es estable por más de un año almacenado a -80°C.
- o. Se toman 2 μL de ARN para medir espectrofotométricamente En un NanoDrop 2000 marca Thermo Scientific para medir su concentración y grado de pureza del ARN en agua atreves de la relación de Abs 260/280 \Rightarrow 1.8 - 2.0 Y Abs 260/230 \Rightarrow 1.8 - 2.0 [se considera puro]. La secuencia de pasos para la medición del ARN se realizó colocando 1 μL de agua estéril libre de ARNsas y DNAsas en el pedestal

del equipo y se midió como blanco; se limpió el pedestal cuidadosamente con un pañuelo Kleenex, y se colocó 1 μ L de agua estéril libre de ARNsas y DNAsas, en el pedestal y se leyó como si fuera una muestra (blanco), se limpió el pedestal cuidadosamente con un pañuelo Kleenex, y se colocó 1 μ L de la muestra de la solución de ARN.

Secuencia de pasos para la electroforesis de una de agarosa al 2%:

Para la detección de la integridad de ARN, empleando 5 μ L de la solución de ARN: Se limpió la cámara de electroforesis, el peine a utilizar (para hacer los pozos en el gel) y el molde para el gel con la solución del RNaseZAP y se enjuagó con agua tratada con DEPC. Se preparó un gel de agarosa al 2% pesando 0.5g de agarosa (Agarosa GIBCO BRL ultra pure Cat. 1515-019 Lot. 1000671 Life Technology), que se colocó en un matraz Erlenmeyer y al que se añadió 25 mL TAE 1X LIBRE DE ARNsas y DNAsas, este se calentó sobre el mechero hasta que se disolvió la agarosa (llegando a ebullición); se retiró del mechero y se agregó 1.5 μ L de bromuro de etidio (BrEt, 5mg/mL); se mezcló perfectamente y se decantó en el molde del gel colocándolo sobre una plancha fría, se dejó solidificar (10 a 15 min), una vez solidificado se coloca en la cámara de electroforesis que previamente se había llenado con la solución TAE 1X libre de ARNsas y DNAsas. (SIGMA T8280-L Lote.031M8202). El gel se cargó agregando 5 μ L de cada una de las muestras con 2 μ L de colorante el cual se mezcló sobre un trozo de parafilm, de donde se tomó para colocarlo en el poro del gel que correspondiera. Se corrió el gel a 80V por 60 min. Enseguida se fotografió el gel con un transiluminador con luz UV y se imprime la foto.

5.14.2 Expresión génica de células cultivadas por RT-PCR a punto final

Los genes analizados fueron: COL1A1, SOX9, AGRECANO (AGR), COL2A1, COMP, OPN, OCN, COLX, RUNX2 y GAPDH como gen constitutivo.

La técnica se desarrolló de la siguiente manera:

Se limpió todo el material y equipo con una gasa empapada con solución ARNseZap. Se empleó el siguiente material y equipo: campana de flujo laminar, micro pipetas, exterior de las cajas con micro-puntas libres de ARNsas y ADNsas, bolsas con tubos estériles de 200 uL y gradillas. El equipo de RT-PCR utilizado es el EPICENTRE MasterAmp™ RT-PCR de alta sensibilidad (cat. RT71225 y RT712100). Empleó una sola enzima en un solo tubo, de sistema continuo para la amplificación de secuencias blanco de un molde de ARN μ . Es un método sencillo y sensible para la determinación de patrones de expresión

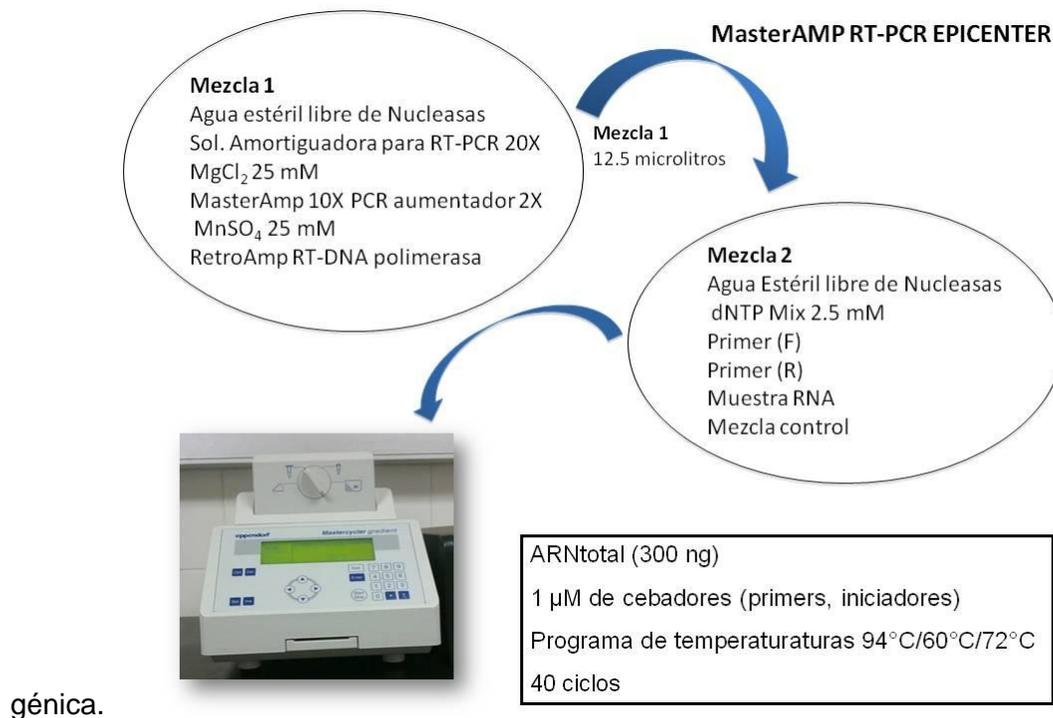


Figura .14. Protocolo usado para la RT-PCR con el método MasterAmp™ RT-PCR de alta sensibilidad.

El equipo incluye la enzima “MasterAmp RetroAmp™ RT ADN polimerasa”, una, enzima termoestable altamente eficiente y MasterAmp 10X PCR amplificador (con betaína). El uso de una polimerasa termoestable permite la transcripción inversa se lleve a cabo a una temperatura elevada, minimizando los efectos de ARN secundario. La presencia de betaína (trimetilglicina) en el MasterAmp 10X PCR amplificador mejora asimismo sustancialmente el rendimiento y la especificidad de la amplificación de muchas secuencias blanco, especialmente las que contienen un alto contenido de G + C. La betaína reduce la temperatura de fusión de regiones ricas de G + C a una temperatura similar a regiones que contienen uniones A + T. Esto da lugar a la desestabilización de regiones de doble cadena que limitan la acción de la polimerasa, lo que aumenta el rendimiento, la longitud del producto de la reacción. Además, la betaína también puede mejorar la PCR mediante la protección de las ADN polimerasas impidiendo el daño por desnaturalización térmica.

Se colocó en hielo frappé los tubos para la realización de las mezclas de reacción (figura 14). El volumen que se utilizó para cada una de las mezclas fue variable, dependió del número de reacciones y del volumen final de ARNtotal con una concentración de 300 ng por tubo. La concentración de los oligonucleótidos indicadores fue de 1 μ M.

Hecha la mezcla fue agitada suavemente el tubo donde se llevara a cabo la reacción asegurándonos de que toda la mezcla se encuentre en el fondo del tubo (si es necesario bajar la mezcla) y se colocó en el termociclador (mastercyclear grandienet marca Eppendorf) bajo las siguientes condiciones:

Programa 0015

T1 60°C por 20 min (retrotranscripción).

T2 94°C por 30 seg (desnaturalización).

T3 60°C por 30 seg (alineación de primers).

T4 72°C por un min (extensión)

Repetir T2-T4 50 ciclos.

T5 1 ciclo de 72°C por 5 min (extensión final).

T6 se mantiene a 4°C al terminar.

De forma paralela los análisis fueron repetidos empleando el equipo Tetro One-setep RT-PCR (Bioline, cat. BIO-65046), este equipo solo necesita 30 ciclos y 150 nano gramos de muestra para un óptimo resultado por lo que resulto más eficiente en cuanto a obtención del CAND y cantidad de ARN para cada reacción.

El equipo de síntesis de Tetro-ADNc Tetro contiene la altamente sensible transcriptasa inversa, oligo (dT) y los componentes necesarios para generar cDNA de alta calidad a partir de ARN. La primera hebra de ADNc que se genera es ideal para PCR y se puede utilizar en una variedad de otras aplicaciones, tales como los análisis del ARN celular, caracterización de variantes de empalme de ARN, y la generación y clonación de cDNA.

El equipo de síntesis de ADNc Tetro está optimizado para reacciones de transcriptasa reversa (RT) en un amplio rango de concentraciones de ARN total (10 pg-2µg), de modo que los ADNc de longitud y de baja abundancia se pueden detectar mediante amplificación después de la síntesis de ADNc. El equipo contiene la enzima oligo (dT) y hexámeros al azar como cebadores. Los componentes del equipo son completamente optimizados para generar los máximos rendimientos de ADNc de longitud completa después de la reacción de la RT.

VI. Resultados

6.1 Obtención de medio condicionado condrocitos primarios de cóndilos femorales de borrego cadavérico.

Se obtuvieron 300 mL de MC que fueron filtrados en un filtro estéril del 22 μm se procedió a almacenar en alícuotas de 9 mL en tubos de cultivo de 15 mL. Se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento del su empleo en cultivo.

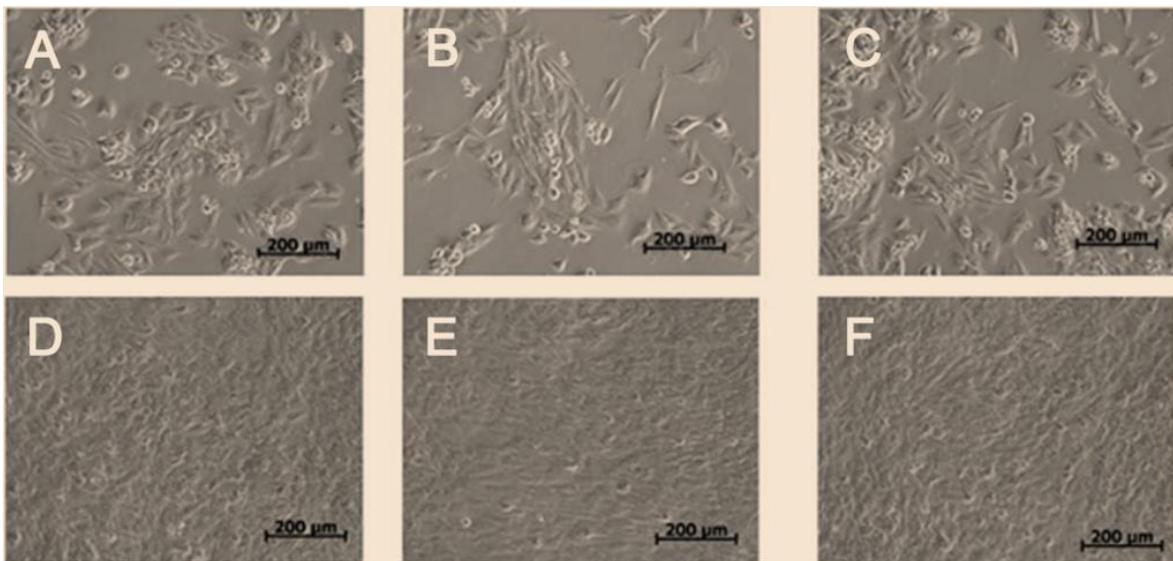


Figura 14. Fotografía de los controles de proliferación de los condrocitos aislados en cada articulación de las borregas. Se cultivaron una alícuota de 50,000 células por pozo en una caja de seis, medio DMEM, SBA 10% y 1% de antibiótico/antimicótico, el cultivo para la obtención duro 19 días. Las borregas donadoras del cartílago articular fueron de raza criolla de aproximadamente 2 años de edad de entre 60 a 80 kg de peso corporal. Figura A y D) Primera muestra (A) dos días de cultivo, (D) 19 días de cultivo, se obtuvieron 4.2×10^6 células y se almacenaron 8 crio- tubos de 1 mL; figura B y E) Segunda muestra (B) dos días de cultivo, (E) 19 días de cultivo, se obtuvieron 3.3×10^6 células y se almacenaron

6 crio- tubos de 1 mL; y figura C y F) Primera muestra (C) dos días de cultivo, (F) 19 días de cultivo, se obtuvieron 6.4×10^6 células y se almacenaron 12 crio- tubos de 1 mL.

6.2 Aislamiento de células CTM-CD90+

6.2.1 Aislamiento de células CTM-CD90+ a partir de médula ósea

De los 20 mL de MO obtenidos de médula ósea de la borrega donde se obtuvieron 20 mL de SPM y después de la separación por el gradiente de Ficoll se obtuvieron en promedio 49×10^6 células monucleares las que sometieron a la separación con las perlas magnéticas recubiertas con el anti-CD90 y se obtuvieron 6.8×10^6 de células CTM-CD90+.

6.2.2 Aislamiento de células CTM-CD90+ de sangre periférica movilizada

Después de 24 horas la segunda dosis del G-CSF se obtuvo un aumento significativo en las poblaciones de leucocitos, granulocitos y monocitos (ver figura 15).

El segundo día después de la primera dosis del G-CSF se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa para el marcador de superficie CD34 con en relación con el basal, se estableció tomar la muestra el tercer día después de la primera dosis ya que el marcador de superficie CD90 obtuvo el mayor porcentaje de células positivas con respecto al basal (ver figura 16).

De los 20 mL de SPM y después de la separación por el gradiente de Ficoll se obtuvieron en promedio 16×10^6 células monucleares las que sometieron a la separación con las perlas magnéticas recubiertas con el anti-CD90 y se obtuvieron 8.2×10^6 de células CTM-CD90+.

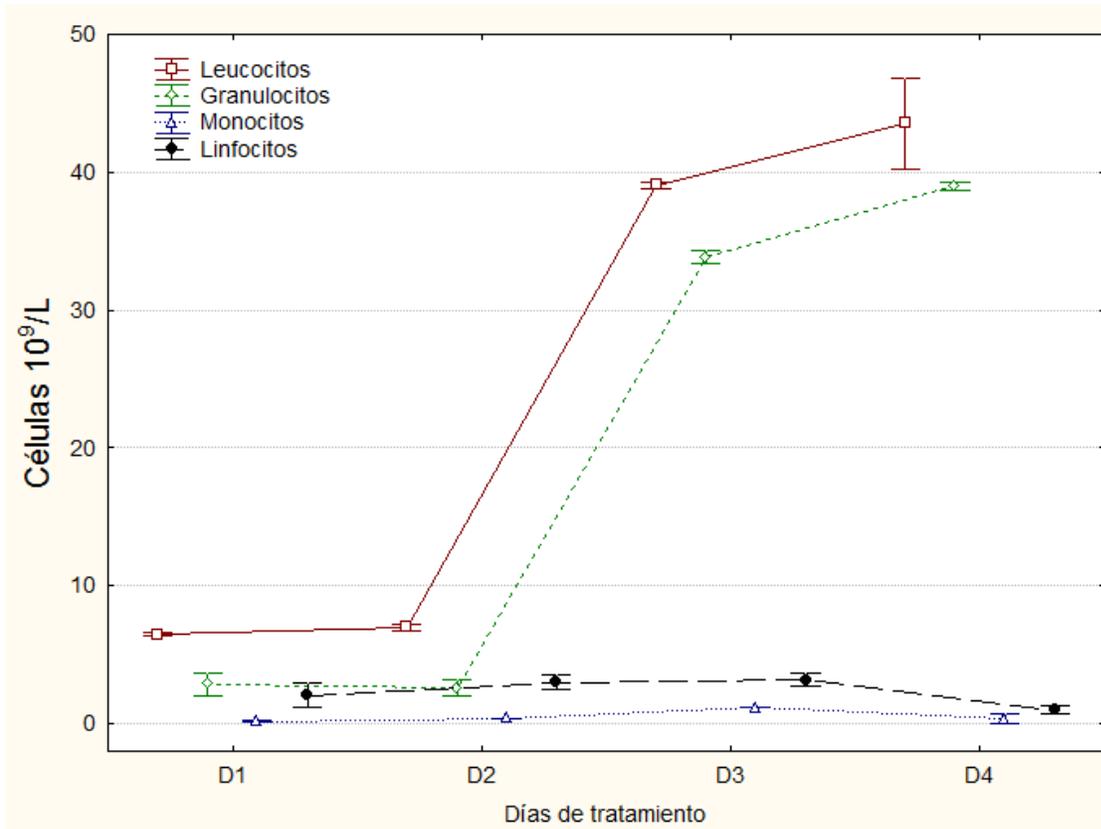


Figura 15. Comportamiento de las células hematopoyéticas durante el tratamiento con el G-CSF durante tres días, el D1 es la mediación basal antes de iniciar el tratamiento, de los D2 al D4 son las mediciones durante el tratamiento, (n=3 borregas de la raza Suffolk),

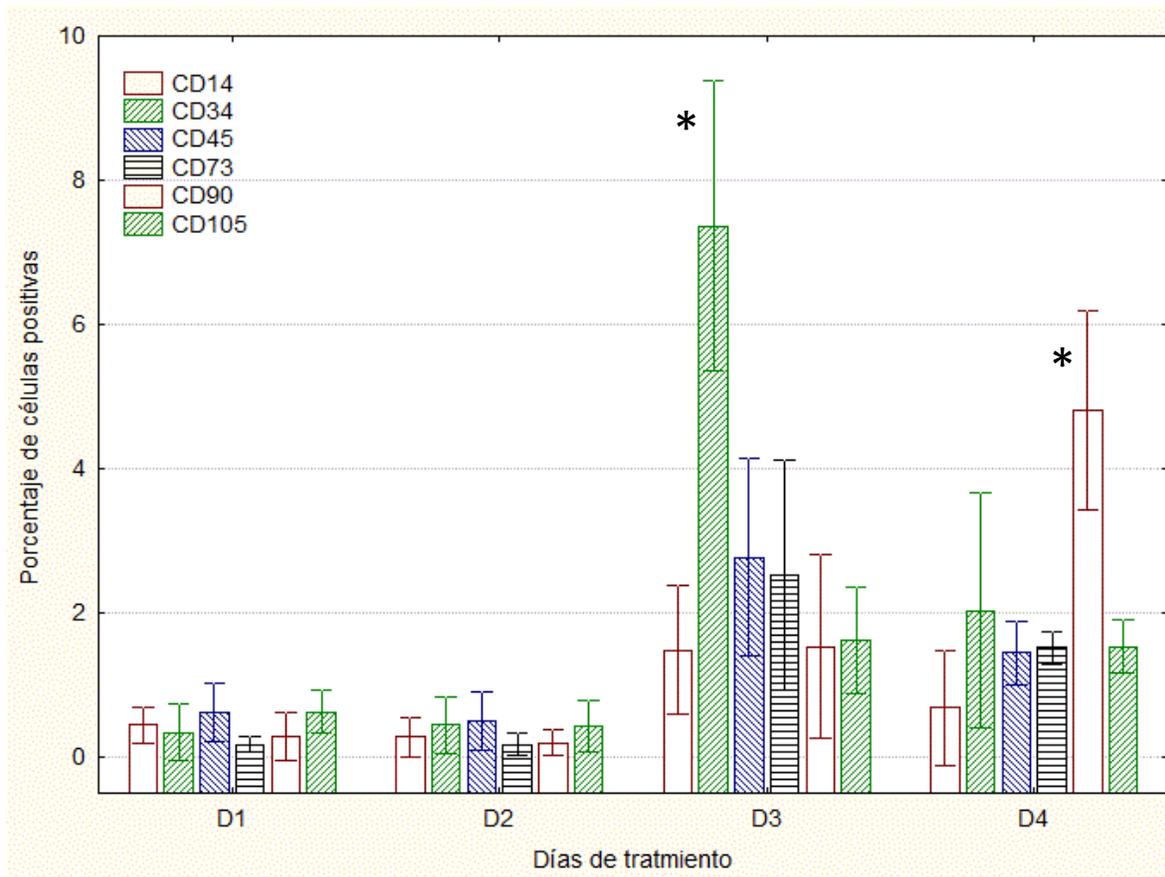


Figura 16. Comportamiento de los marcadores de células hematopoyéticas y CMT recuperadas en SPM durante el tratamiento con el G-CSF durante tres días. D1 es la mediación basal antes de iniciar el tratamiento, de los D2 al D4 son las mediciones durante el tratamiento con el fármaco, (n=3 borregas de la raza Suffolk).

* Diferencia estímicamente significativa, $p < 0.05$, prueba U de Mann-Whitney.

6.3 Expansión en cultivo *in vitro* de las células CTM-CD90+

6.3.1 Expansión en cultivo *in vitro* de las células CTM-CD90+ aisladas de médula ósea

Las células aisladas de MO después del seguimiento en cultivo primario mostraron un morfología alargada cuando se cultivaron con medio DMEM suplementado con 10% de suero de borrego adulto (ver figura 17.1).

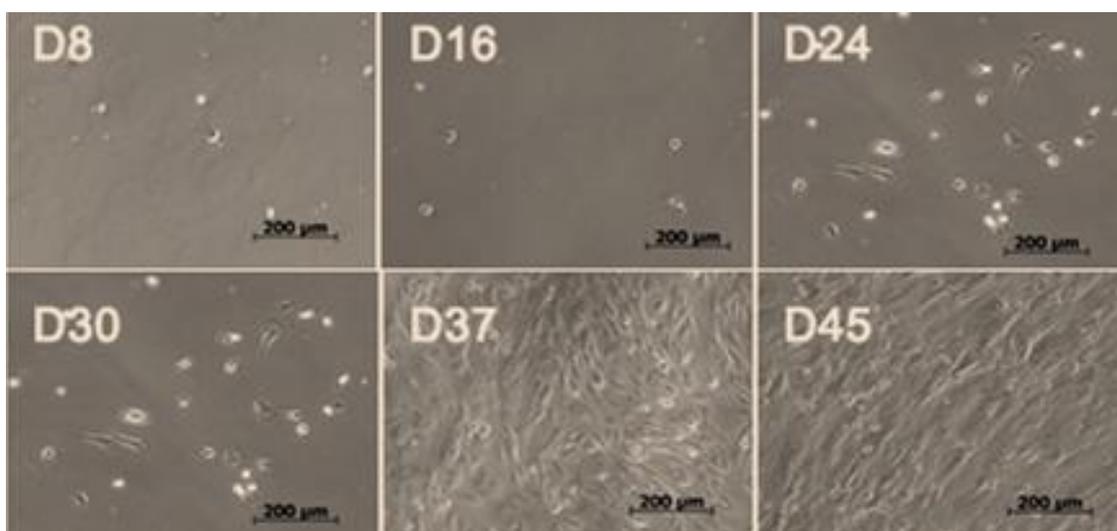


Figura 17.1. Fotografía del cultivo del día 8 (D8) al día 45 (D45) de las células CTM-CD90+ aisladas de médula ósea, cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero de borrego adulto.

6.3.2 Expansión en cultivo *in vitro* de las células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada

Las células CTM-CD90+ aisladas de la SPM que fueron cultivadas en medio DMEM y suplementadas con 10 % de suero fetal bovino proliferaron presentando una morfología redondeada (ver figura 17.2). Solo cuando se cultivaron en medio DMEM suplementado con 20% DSFB se observó una morfología alargada fibroblastoide (ver figura 17.3).

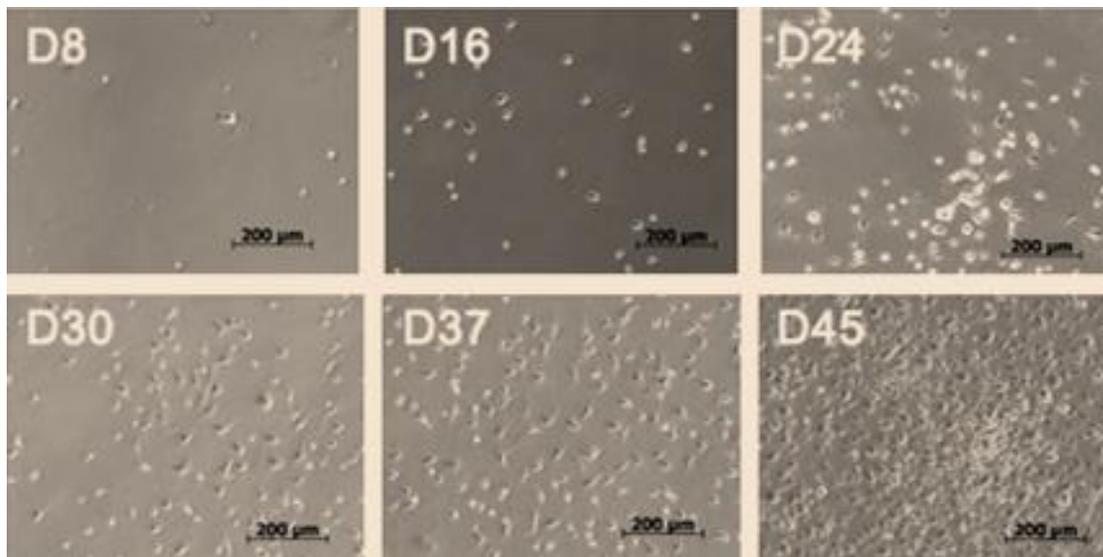


Figura 17.2. Fotografía del cultivo del día 8 (D8) al día 45 (D45) de las células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada, cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero de borrego adulto.

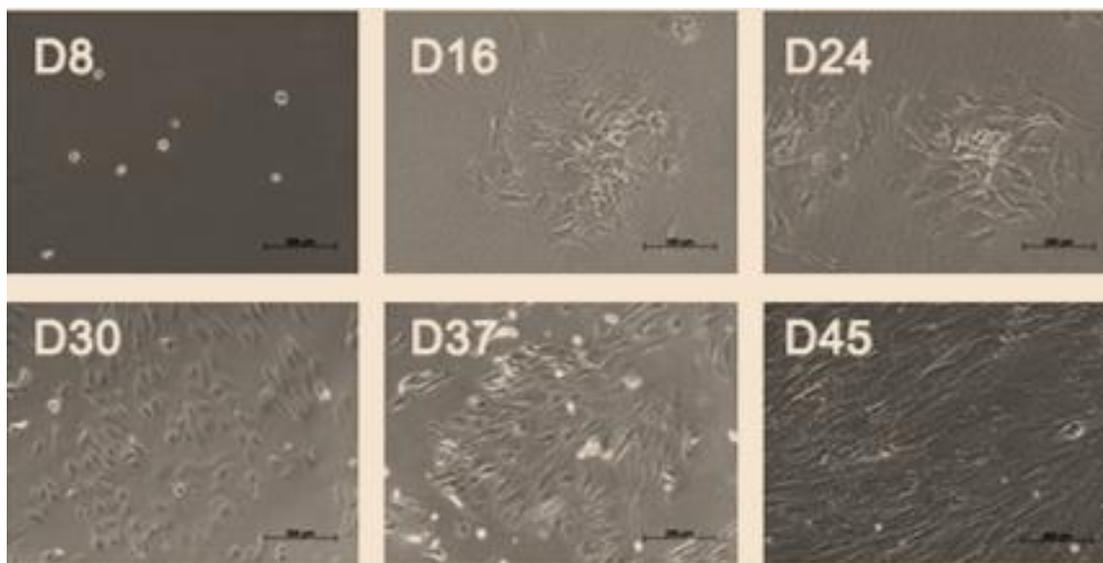


Figura 17.3. Fotografía del cultivo del día 8 (D8) al día 45 (D45) de las células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada, cultivadas en medio DMEM suplementado con 20% de suero fetal bovino "DEFINIDO".

6.4 Inmunofenotipo de las células CTM-CD90+ después de ser aisladas de la médula ósea y sangre periférica movilizada.

Se logró establecer el inmunofenotipo de las células CTM-CD90+ aisladas de médula ósea y sangre periférica movilizada con el panel de anticuerpos para células hematopoyéticas maduras CD45 Y CD14, células troncales hematopoyéticas CD34 y células troncales mesenquimales CD73, CD90, CD105.

6.4.1 Inmunofenotipo de las células CTM-CD90+ después de ser aisladas de médula ósea

Después de que se obtuvo la muestra de MO el marcador predominante fue el CD34 esta tendencia continua que se aislaron las células mononucleares por medio del gradiente de Ficoll. Cuando se realizó la separación de las células CD90+ con la ayuda de las perlas superparamagnéticas los porcentajes de los marcadores para células hematopoyéticas CD14, CD34 y CD45 disminuyeron a menos del 8%, mientras que los marcadores para células CTM: CD73, CD90 y CD105 en conjunto superaron el 50% de las células aisladas (ver figura 18), esta tendencia se mantuvo en el cultivo primario en donde por morfología se observaron celular alargadas semejantes a fibroblastos (ver figura 17.1).

6.4.2 Inmunofenotipo de las células CTM-CD90+ después de ser aisladas de sangre periférica movilizada

A partir de la muestra de SPM recién aislada se estableció que todos los marcadores evaluados (CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 y CD105) estaban por debajo del 10%. Después de que se aislaron las células mononucleares por medio del gradiente de Ficoll el marcador CD14 se incrementó por encima del 35%. Después de la separación de las células CD90+ con las perlas superparamagnéticas los marcadores para las células hematopoyéticas descendieron por debajo del 10 %, mientras que los marcadores de

CTM en conjunto se incrementaron hasta el 80% y en cultivo primario se incrementaron por arriba del 95% (ver figura 19).

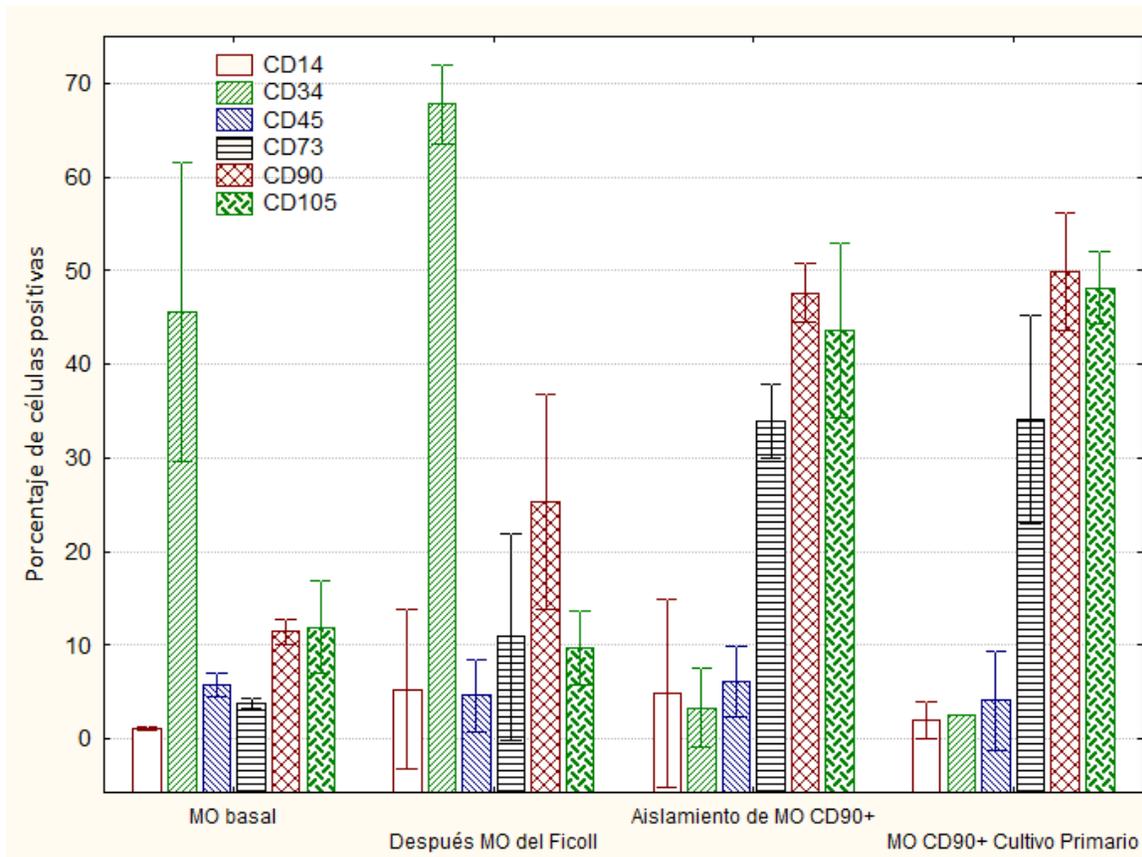


Figura 18, inmunofenotipo de las células aisladas de MO establecido por citometría de flujo de las muestras obtenidas de tres borregos de la raza Suffolk.

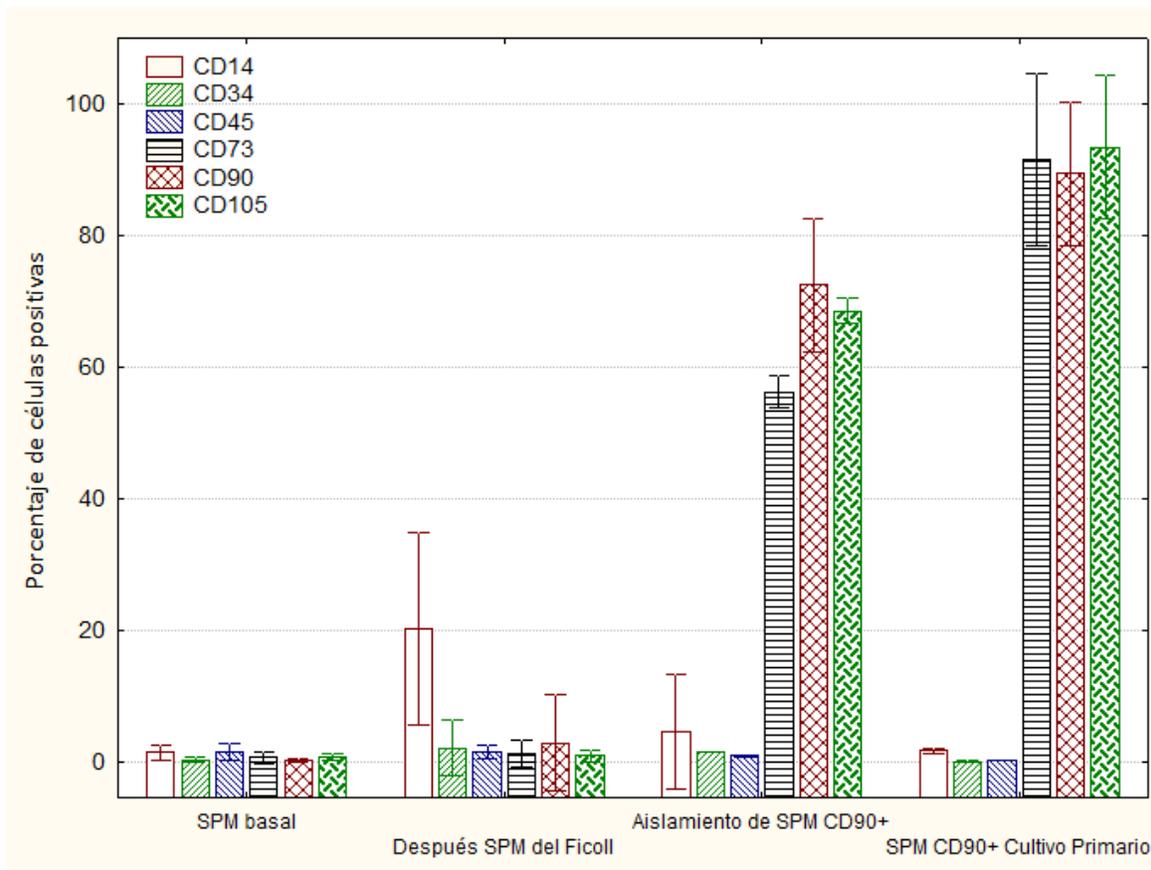


Figura 19. Inmunofenotipo de las células aisladas de SPM establecido por citometría de flujo de las muestras obtenidas de tres borregos de la raza Suffolk.

6.5 Diferenciación de CTM-CD90+ aisladas de médula ósea

Las CTM CTM-CD90+ pre-diferenciadas mostraron una morfología heterogénea fibroblastoide y poligonal (ver figura 20). Al término de su co-cultivo con los condrocitos primarios aislados de cóndilo femoral/ TGF β -1 todas las células mostraron morfología poligonal. La expresión génica de agrecano definió el estado de diferenciación de las CTM-CD90+ MO (ver figura 21).

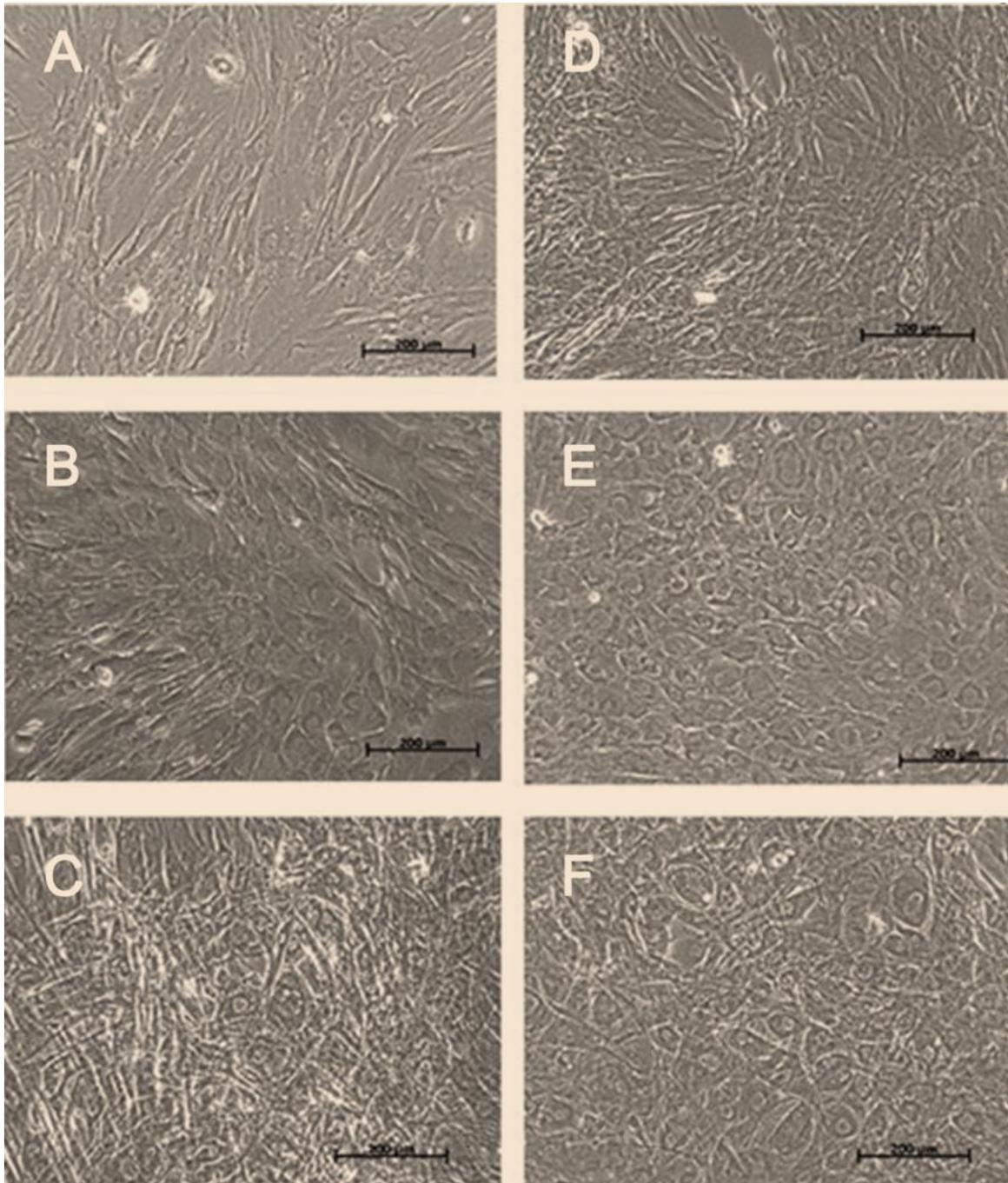


Figura 20. Prediferenciación de las células CTM-CD90+ MO por cultivo con MC por 7 días. A) Células después de la inducción con MC por 7 días; B) células a 4 días de cultivo con 10% de SBA después de la inducción con MC; C) células a 14 días de cultivo con 10% de SBA después de la inducción con MC; D) células después de la inducción con MC por 7 días; E) células a 4 días de cultivo con 10% de SBA después de la inducción con MC + TGF β -1 (10ng/mL); F) células a 14 días de cultivo con 10% de SBA después de la inducción con MC + TGF β -1 (10ng/mL).

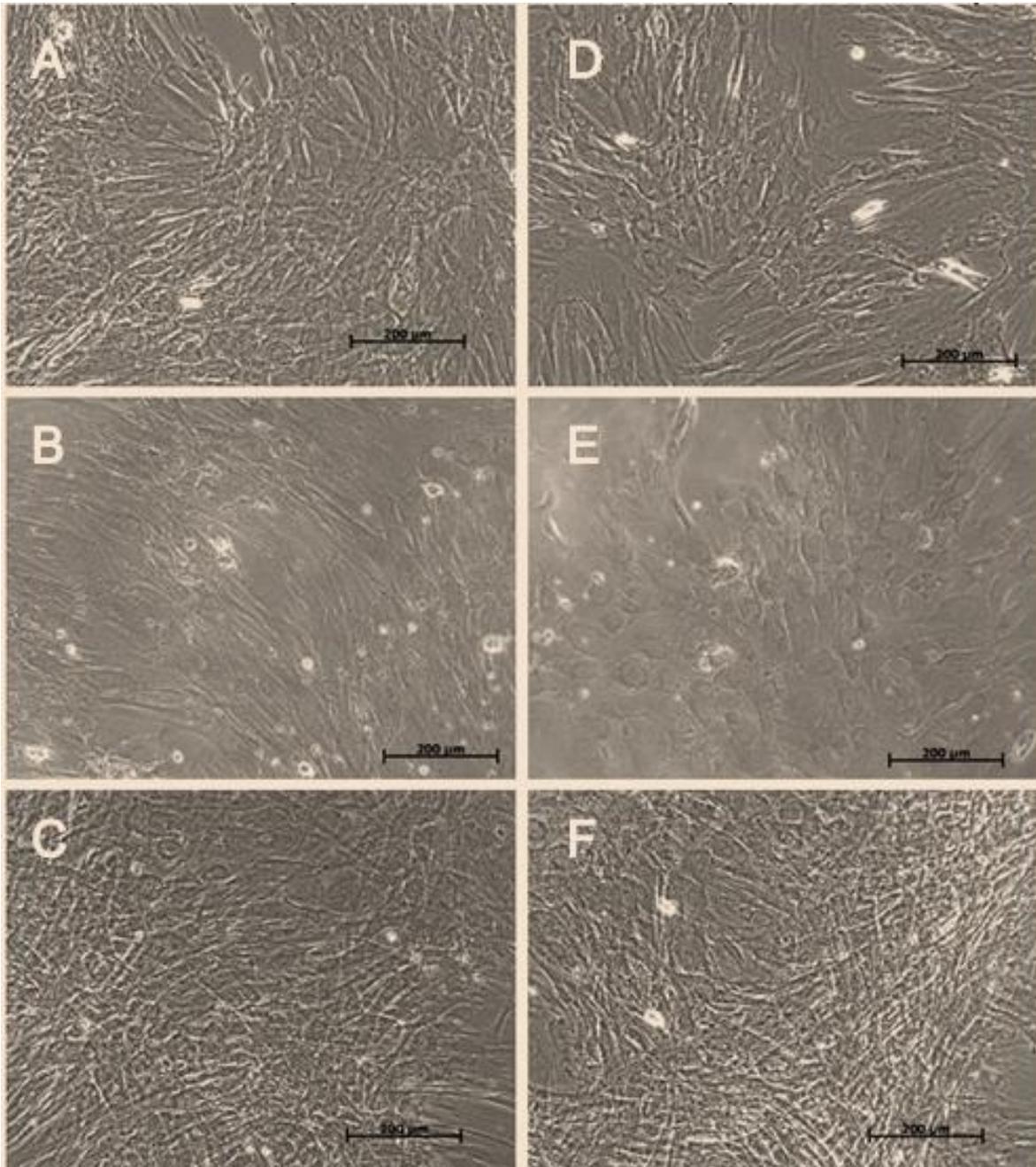


Figura 21. Diferenciación de las células CTM-CD90+ MO previamente inducidas con MC. A) Células después de la inducción con MC por 7 días; B) células inducidas a 4 días de cultivo con 10% de SBA en cocultivo parácrino; C) células inducidas a 14 días de cultivo con 10% de SBA en cocultivo parácrino; D) células después de la inducción con MC por 7 días; E) células inducidas a 4 días de cultivo con 10% de SBA en cocultivo parácrino + TGF β -1 (10ng/mL); F) células inducidas a 14 días de cultivo con 10% de SBA en cocultivo parácrino + TGF β -1 (10ng/mL).

Por morfología y expresión génica de agregano demostramos la diferenciación a condrocitos hipertrofos de CTM CTM-CD90+ aisladas de MO de ovino adulto por preferenciación en MC de condrocitos primarios aislados de cóndilo femoral (ver figura 22) y co-cultivo parácrino con condrocitos primarios de ovino y TGF β -1 (ver figura 23).

Condición de cultivo	GADPH (101 PB)	Col II α 2 (154 PB)	Col I α 1 (119 PB)	Agregano (123 PB)	Sox 9 (162 PB)	COPM (153 PB)
Condros P0 en caja T150						
Condros PO CC, SBA 10%.						
Condros PO CC, SBA 10%, TGF-B1						

Figura 22. Expresión génica por RT-PCR de los condrocitos empleados antes y después de 14 días de co-cultivo parácrino durante el desarrollo del experimento (se usaron 150 ng de ARN, 1m μ M de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE).

Condición de cultivo	GADPH (101 PB)	Col II α 2 (154 PB)	Col I α 1 (119 PB)	Agregano (123 PB)	Sox 9 (162 PB)	COPM (153 PB)
MO-CTM-CD90+, INDU SBA 10%						
MO-CTM-CD90+, INDU SBA 10%, TGF-B1						
MO-CTM-CD90+, INDU CC						
MO-CTM-CD90+, INDU CC TGF- B1						

Figura 23. Expresión génica por RT-PCR de las células MO-CTM-CD90+, previamente inducidas por 7 días, con medio condicionado y cultivadas, sin o con TGF- β 1, con o sin co-cultivo paracrino con condrocitos primarios de borrego adulto (se usaron 150 ng de ARN, 1m μ M de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE).

También se evaluó la expresión de genes característicos de hueso e hipertrofia: GADPH, RUNX2, OCN, COLX, COL1 y OPN, en las células de MO CD90+, que fueron inducidas por 7 días con MC y luego cocultivas con condrocitos primarios de borrego adulto con

SBA 10% más TGF- β 1 10 ng/mL (ver figura 24), en donde encontramos que solo el gen de RUNX2 no se expresa en esta condición de cultivo donde previamente se demostró la expresión de COL2A1.

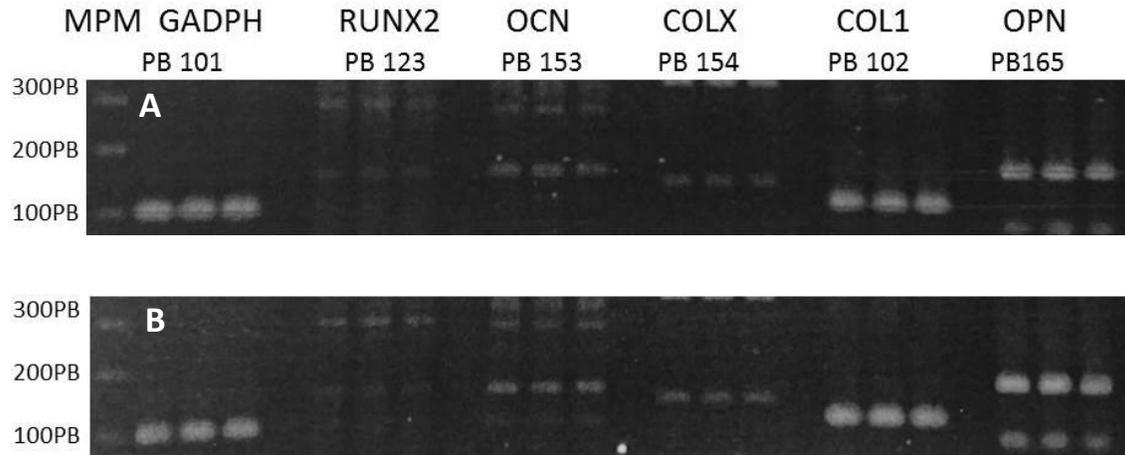


Figura 24. Expresión de genes de hueso e hipertrofia: GADPH, RUNX2, OCN, COLX, COL1 y OPN por RT-PCR. A) células MO-CTM-CD90+, previamente inducidas por 7 días, con medio condicionado y cultivadas en cocultivo parácrino con condrocitos primarios de borrego adulto más TGF- β 1 10 ng/mL; B) condrocitos primarios aislados de cartílago articular de borrego (se usaron 150 ng de ARN, 1m μ M de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE).

6.6 Diferenciación con células CTM-CD90+ movilizadas de médula ósea y aisladas en sangre periférica y expandidas empleando medio suplementado con suero de borrego adulto

Al parecer el uso del SBA no favoreció el desarrollo, crecimiento y proliferación de las CTM-CD90+ SPM, inclusive cuando fueron cultivadas con TGF- β 1 a una concentración de 10 ng/mL (ver figura 25); se observó el mismo efecto cuando se realizó la inducción con MC por 7 días con o sin TGF- β 1 a una concentración de 10 ng/mL (ver figura 26).

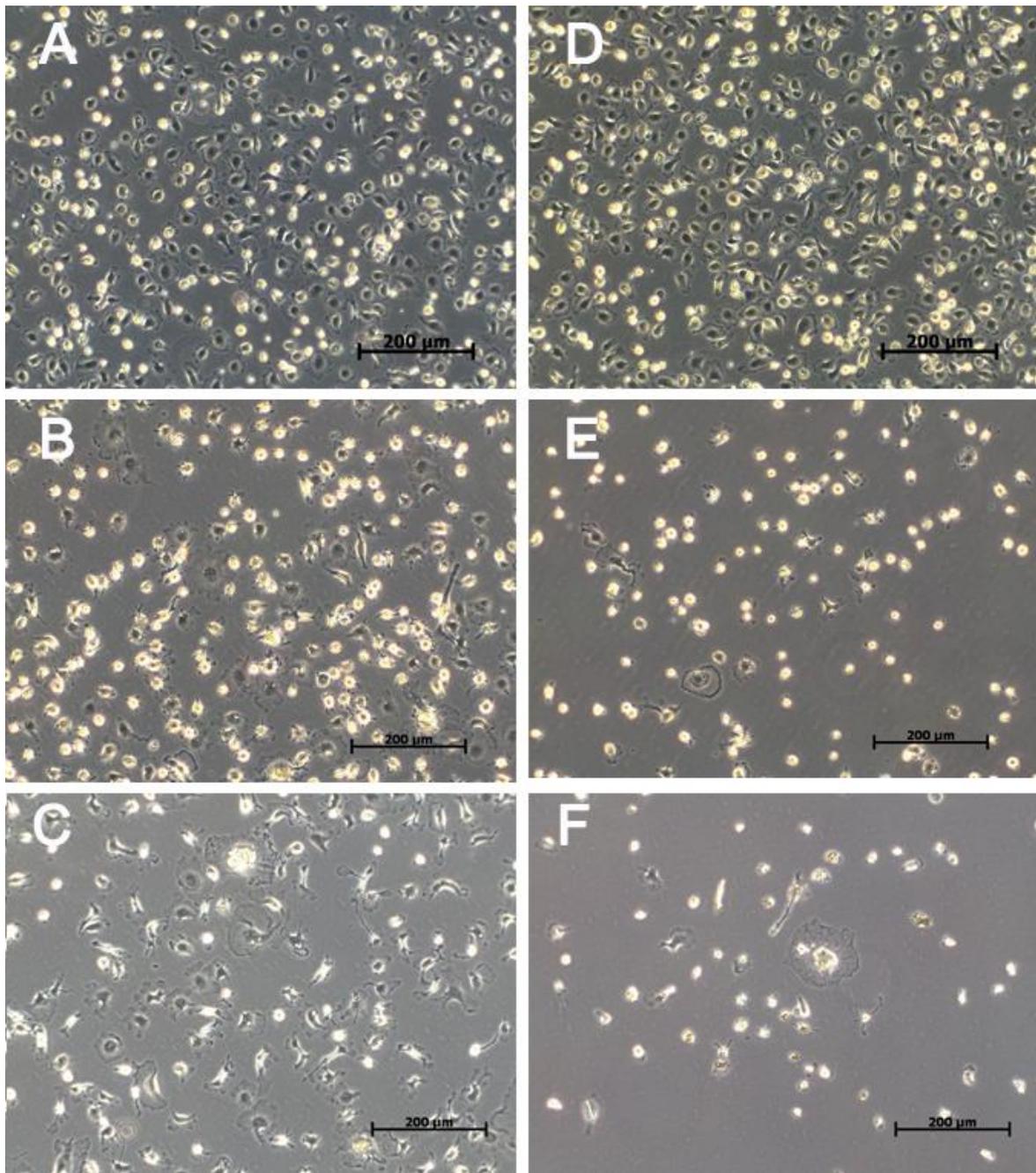


Figura 25. Expansión y prediferenciación de las células CTM-CD90+ SPM por cultivo con SBA por 7 días. A) células expandidas en cultivo primario con 10% SBA; B) células a 4 días de cultivo en pase 1 con 10% de SBA; C) células a 7 días de cultivo en pase 1 con 10% de SBA; D) células expandidas en cultivo primario con 10% SBA; E) células a 4 días de cultivo primario con 10% de SBA + TGF β -1 (10ng/mL); F) células en cultivo primario a 7 días de cultivo con 10% de SBA + TGF β -1 (10ng/mL).

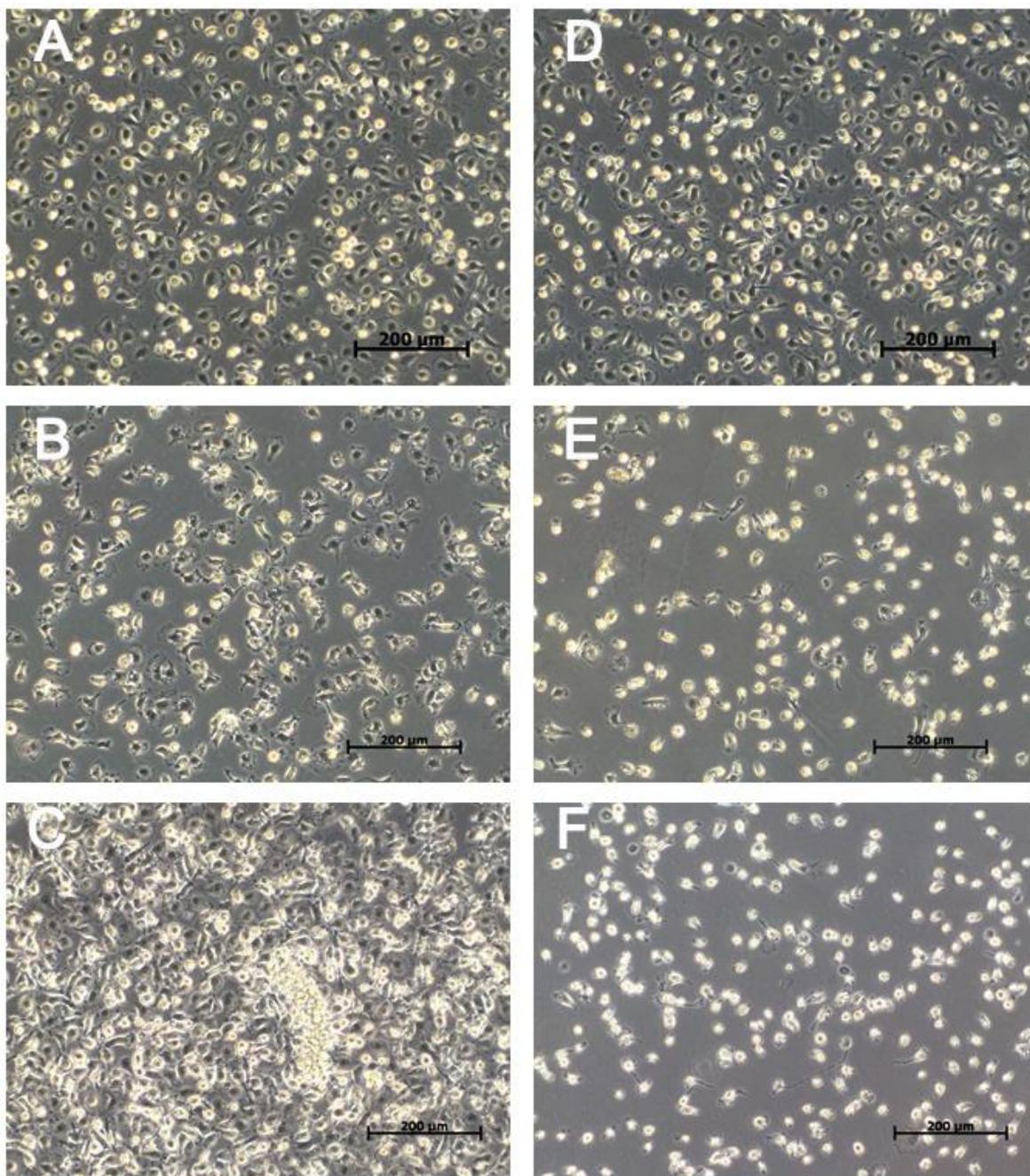


Figura 26. Prediferenciación de las células CTM-CD90+ SPM por cultivo con MC por 7 días con o sin TGF β -1 (10ng/mL). A) células expandidas en cultivo primario con 10% SBA; B) células a 4 días de cultivo en pase 1 con MC; C) células a 7 días de cultivo en pase 1 con MC; D) células expandidas en cultivo primario con 10% SBA; E) células a 4 días de cultivo primario con MC + TGF β -1 (10ng/mL); F) células en cultivo primario a 7 días de cultivo con MC + TGF β -1 (10ng/mL).

Como resultado del análisis de expresión no se obtuvo en cantidad y calidad suficiente ARN para llevar a cabo el análisis en las CTM-CD90+ SPM cultivadas con 10% de SBA, así como cuando se cultivaron con TGF β -1 (10ng/mL); solo se puede obtener suficiente ARN cuando se cultivaron con MC y con MC+ TGF β -1 (10ng/mL), en estas células se puede observar la expresión del gen constitutivo GADPH y AGR (ver figura 27).

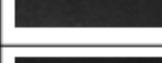
	Sin Medio Condicionado		Con Medio Condicionado	
	Cond 1	Cond 2	Cond 3	Cond 4
GADPH	-----	-----		
AGR	-----	-----		
COMP	-----	-----		
COL II	-----	-----		
COL I	-----	-----		
SOX-9	-----	-----		

Figura 27. Expresión génica por RT-PCR de las células CTM-CD90+ SPM (expandidas con 10% SBA). Cond 1) células cultivadas por 7 días con 10% de SBA; Cond 2) células cultivadas por 7 días con 10% de SBA + TGF- β 1. Cond 3) células cultivadas por 7 días con MC; Cond 4) células cultivadas por 7 días con MC + TGF- β 1 (en las Cond 1 y Cond 2 no se obtuvo suficiente ARN para llevar a cabo el análisis de expresión génica. Se usaron 150 ng de ARN, 1m μ M de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE.

6.6.1 Diferenciación con células CTM-CD90+ movilizadas de médula ósea y aisladas en sangre periférica y expandidas empleando medio suplementado en medio con DSFB.

Las células CTM-CD90+ movilizadas a SPM y que fueron expandidas con 20% de suero fetal bovino “definido” (DSFB), proliferaron exitosamente en cultivo primario con una morfología semejante a fibroblastos (ver figura 28 D). Cuando las células expandidas en medio con DSFB fueron cultivadas por 7 días en primer pase con DSFB, se mantuvo la morfología similar a fibroblasto (ver figura 28 B) y bajo la misma condición con DSFB pero cuando se agregó TGF- β 1 se empezaron a observar células con morfología redondeada (ver figura 28 C). Cuando las células se mantuvieron en primer pase por 7 días con MC se mantuvo la morfología parecida a fibroblasto (ver figura 28 E). Finalmente como parte de este experimento se cultivaron las células en primer pase por 7 días con MC + TGF- β 1, como resultado de esta condición experimental se obtuvieron células con una morfología mixta entre alargadas semejantes a fibroblasto (ver figura 28 F) y redondeadas semejantes a la morfología de los condrocitos en cultivo primario aislados de cóndilo femoral (ver figura 28 A).

Como parte completaría de este experimento se indujeron células CTM-CD90+ SPM por 7 días al cultivarlas con MC, para primero cultivar las células por 14 días con 10% de SBA en donde se mantuvo una morfología mixta de células como fibroblasto y redondeadas. Cuando las células fueron cultivadas por 14 días con 10% de SBA + TGF- β 1, cocultivo parácrino con condrocitos primarios con 10% SBA y cocultivo parácrino con condrocitos primarios con 10% SBA + TGF- β 1, no se observaron cambios en la morfología antes descrita (ver figura 29).

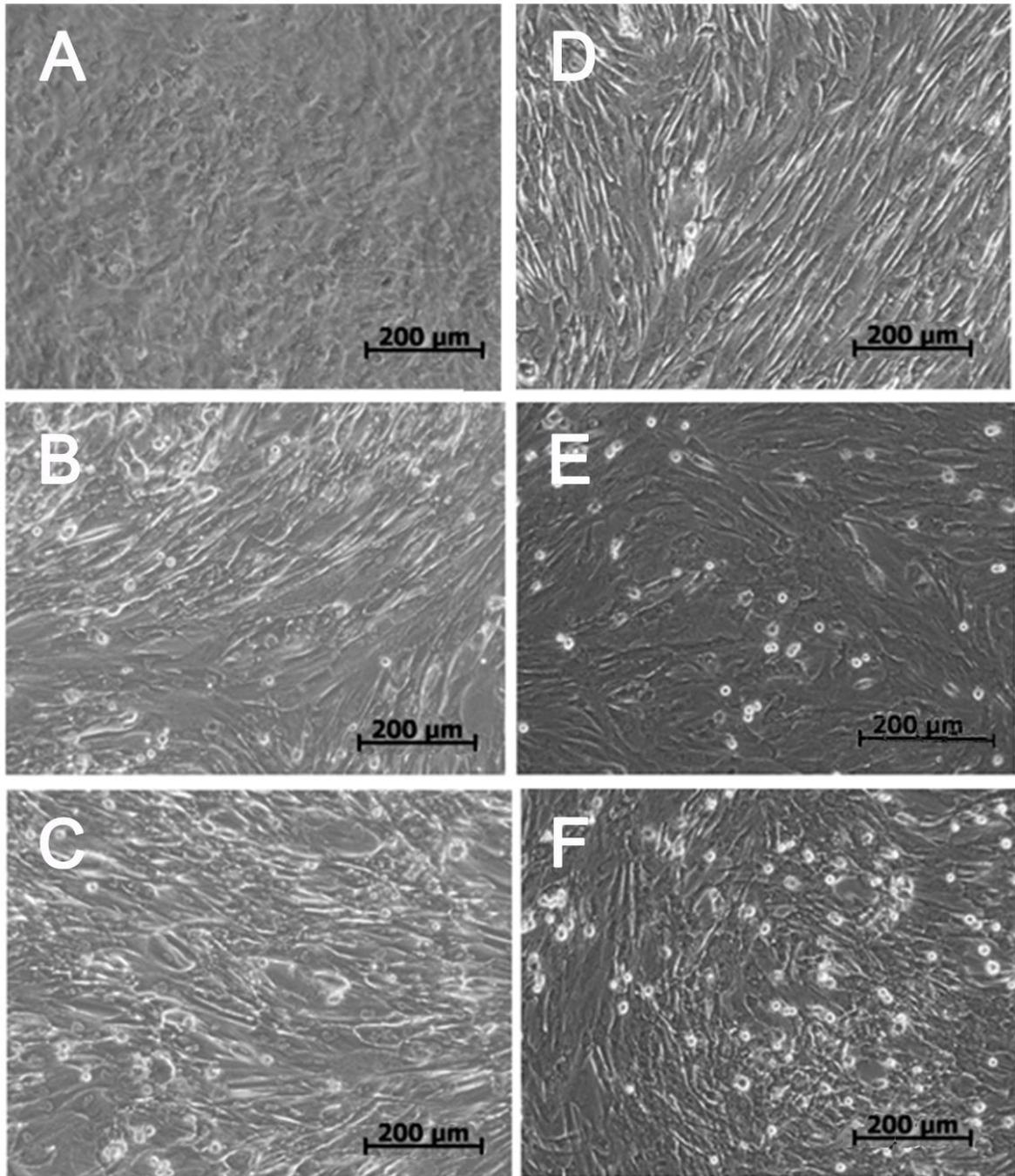


Figura 28. Imagen de la morfología de condrocitos de cartílago articular, y células CTM-CD90+ SPM bajo diferentes condiciones de cultivo. A) condrocitos primarios aislados de cóndilo femoral; B) células CTM-CD90+ SPM en primer pase cultivadas por 7 días con DSFB; C) células CTM-CD90+ SPM en primer pase cultivadas por 7 días con DSFB+TGF- β 1; D) células CTM-CD90+ SPM en cultivo primario cultivadas con DSFB; E) células CTM-CD90+ SPM en primer pase cultivadas por 7 días con MC; F) células CTM-CD90+ SPM en primer pase cultivadas por 7 días con MC+ TGF- β 1.

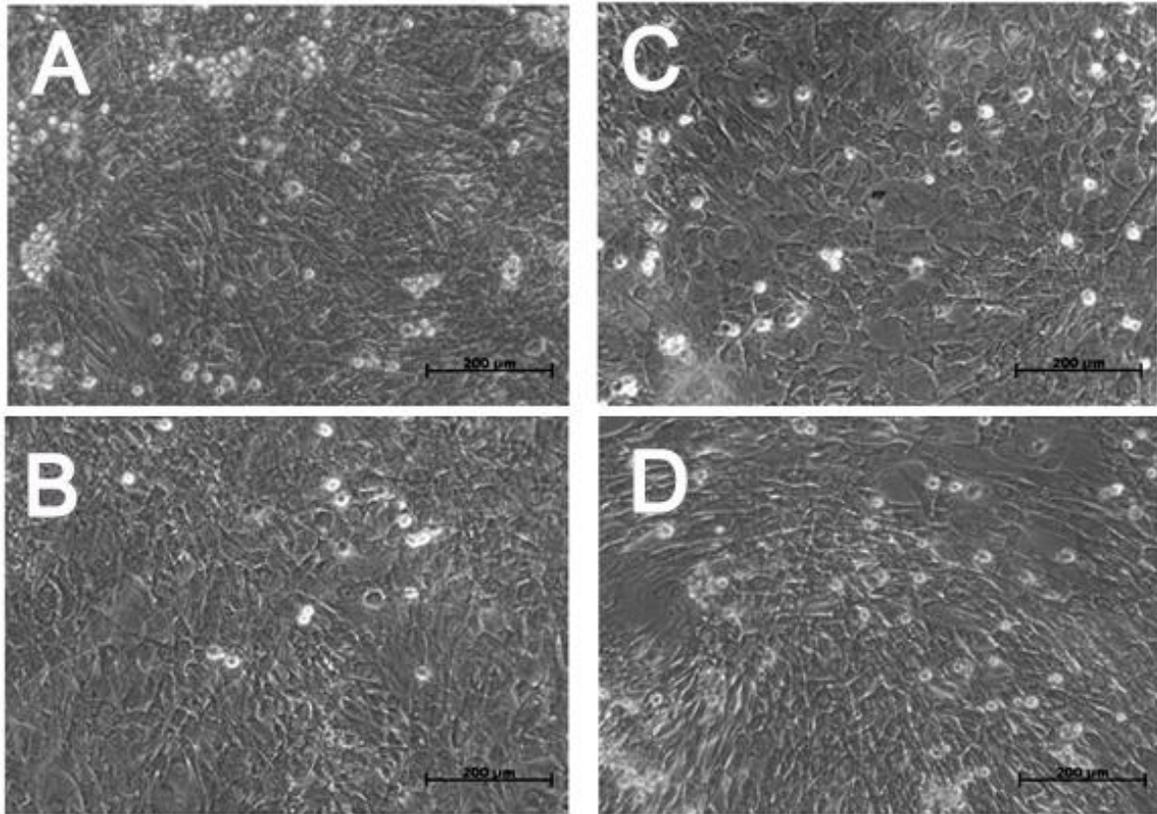


Figura 29. Imagen de la morfología del seguimiento a 14 días de las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las células CTM-CD90+ SPM, con previa inducción con MC por 7 días, (las células de dónde se originó el experimento fueron expandidas en cultivo primario con SFB “DEFINIDO”). A) células CTM-CD90+ SPM cultivarlas por 7 días con MC; B) células cultivas por 14 días con 10% de SBA + TGF- β 1; C) cocultivo parácrino con condrocitos primarios con 10% SBA; D) cocultivo parácrino con condrocitos primarios con 10% SBA + TGF- β 1.

Las células CTM-CD90+ de SPM inducidas (7 días de cultivo con MC), que se cultivaron con SBA 10% por 14 días en observó la expresión de los genes: COL1A1, SOX9, AGR y COMP, mientras que se observa una banda muy tenue de COL2A1. Cuando las células CTM-CD90+ de SPM indicadas se cocultivaron con CPCA y SBA, solo se observó la expresión de los genes COL1A1 y SOX9, mientras que se observó una banda muy tenue AGR y COMP (ver figura 30).

	Cond 1	Cond 2	Cond 3	Cond 4
GADPH				
AGR				
COMP				
COL II				
COL I				
SOX-9				

Figura 30. Expresión génica por RT-PCR de las células SPM-CTM-CD90+ (expandidas con SBA “DEFINIDO”), previamente inducidas por 7 días, con medio condicionado y cultivadas, sin o con TGF- β 1. Cond 1) células SPM-CTM-CD90+ cultivadas por 7 días con 20% de DSFB; Cond 2) células SPM-CTM-CD90+ cultivadas por 7 días con 20% de DSFB + TGF- β 1; Cond 3) células SPM-CTM-CD90+ cultivadas por 7 días con MC; y Cond 4) células SPM-CTM-CD90+ cultivadas por 7 días con MC + TG.F- β 1 (se usaron 150 ng de ARN, 1mM de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE).

Cuando se aplicó la condición de cultivo con SBA10%+ TGF-B1, se observó la expresión de los genes COL1A1, SOX9 y AGR, y bandas muy tenues para COL2A1 y COMP. Por último cuando las células fueron se co-cultivadas con SBA + TGF- β 1, solo se observó la expresión de los genes: COL1A1 y SOX9 y una banda muy tenue de AGR y COMP (ver figura 31).

	Cond 1	Cond 2	Cond 3	Cond 4	Cond 5	Cond 6
GADPH						
AGR						
COMP						
COL II						
COL I						
SOX-9						

Figura 31. Imagen del análisis de expresión génica del seguimiento a 14 días de las condiciones experimentales (las células de dónde se originó el experimento fueron expandidas en cultivo primario con SFB “DEFINIDO”). Cond 1) células SPM-CTM-CD90+ inducidas por 7 días con MC + 14 días de 10% de SBA; Cond 2) células SPM-CTM-CD90+ inducidas por 7 días con MC + 14 días de 10% de SBA + TG.F-β1; Cond 3) células SPM-CTM-CD90+ inducidas por 7 días con MC + 14 días de cocultivo parácrino con condrocitos primarios; Cond 4) células SPM-CTM-CD90+ inducidas por 7 días con MC + 14 días de cocultivo parácrino con condrocitos primarios + TG.F-β1; Cond 5 y Cond 6) condrocitos primarios de cartílago articular (se usaron 150 ng de ARN, 1mM de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE).

6.6.2 Diferenciación a un fenotipo condral de células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada que previamente fueron inducidas. (Prueba de factores de crecimiento y compuestos químicos)

El propósito de este experimento fue corroborar lo descrito en la literatura en donde se han empleado varios factores de crecimiento pertenecientes a la familia del TGF y BMP para diferenciar las CTM, así como también varios compuestos químicos que pueden favorecer la diferenciación a un linaje condral.^{41,65}

Como resultado del seguimiento por 14 días de las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las células CTM-CD90+ aisladas de SPM, con previa inducción con MC por 7 días. Para el cultivo con ITS las células presentaron una morfología redondeada (ver figura 32 A), semejante a las de los condrocitos primarios (ver figura 28 A); se observó la expresión los genes COL1A1, COMP y SOX9, así como bandas tenues para COL2A1 y AGR (ver figura 33). Para la condición de cultivo donde se empleó TGF-B1 más BMP-7, la morfología celular se mantuvo semejante a fibroblastos (ver figura 32 C), se encontró la expresión de los genes COL1A1, COL2A1, SOX9 y COMP pero no la expresión de AGR (ver figura 33). De igual forma en la condición en donde se empleó dexametasona más TGF-B1, la morfología celular se mantuvo semejante a fibroblastos y se encontró la expresión de los genes COL1A1, COL2A1, SOX9 y COMP pero no la expresión de AGR (ver figura 33). Solo en la condición donde se empleó el BMP-7, las células presentaron una morfología redondeada semejante a las de los condrocitos primarios (ver figura 32 B), y se encontró la expresión de COL1A1, COL2A1, SOX9, COMP y AGR (ver figura 33), expresión similar a la que encontramos en el cultivo primario de condrocitos de cartílago articular de borrego (ver figura 31, Cond 5 y Cond 6).

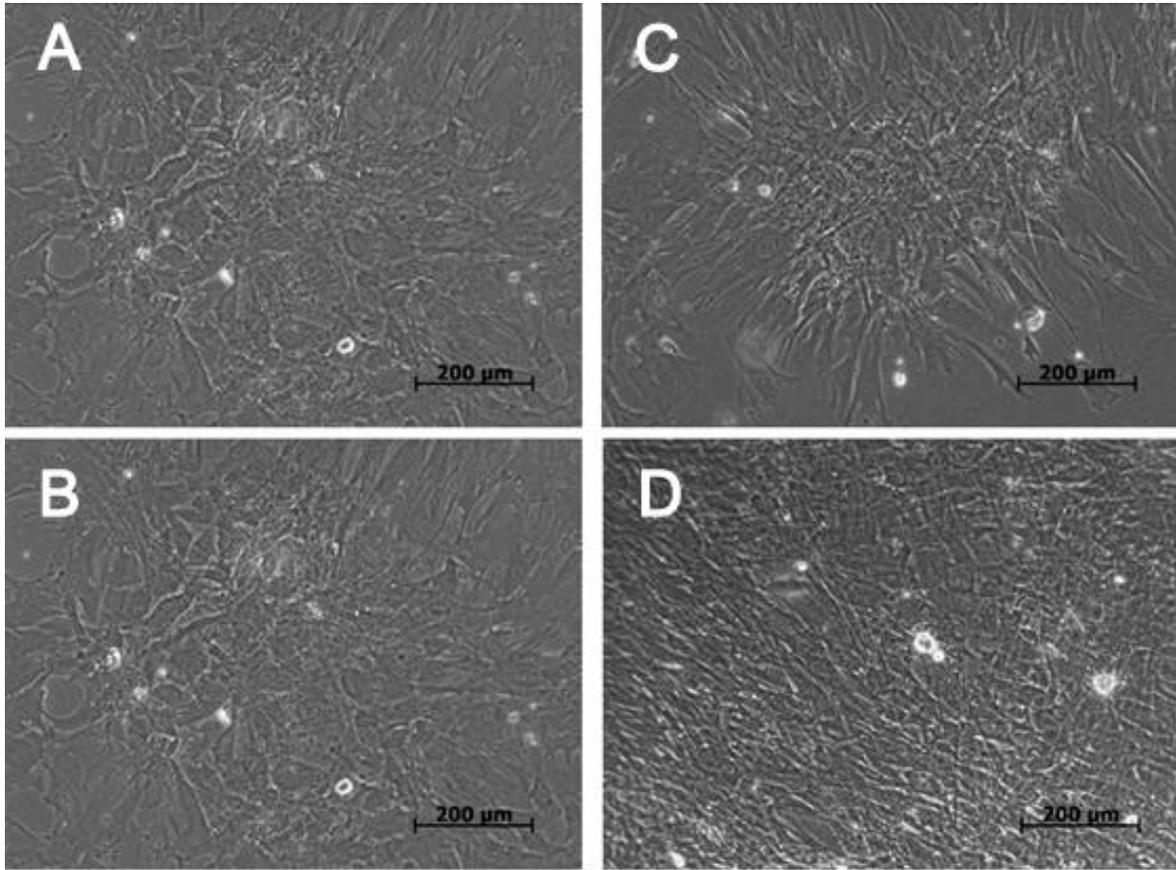


Figura 33. Imagen de la morfología del seguimiento a 14 días de las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las células CTM-CD90+ aisladas de SPM, con previa inducción con MC por 7 días, (las células de dónde se originó el experimento fueron expandidas en cultivo primario con SFB “definido”). A) células CTM-CD90+ SPM, inducidas y cultivadas 14 días con ITS; B) células CTM-CD90+ SPM, inducidas y cultivadas 14 días con BMP-7; C) células CTM-CD90+ SPM, inducidas y cultivadas 14 días con BMP-7 + TGF-β1; y D) células CTM-CD90+ SPM, inducidas y cultivadas 14 días con dexametasona + TGF-β1.

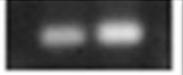
	Cond 1	Cond 2	Cond 3	Cond 4
GADPH				
AGR				
COMP				
COL II				
COL I				
SOX-9				

Figura 33. Análisis de la expresión de genes en las condiciones de diferenciación después del seguimiento a 14 días de las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las células CTM-CD90+ aisladas de SPM, con previa inducción con MC por 7 días, (las células de donde se originó el experimento fueron expandidas en cultivo primario con SFB “definido”). Cond 1) células CTM-CD90+ SPM, inducidas y cultivadas 14 días con ITS; Cond 2) células CTM-CD90+ SPM, inducidas y cultivadas 14 días con BMP-7; Cond 3) células CTM-CD90+ SPM, inducidas y cultivadas 14 días con dexametasona + TGF- β 1; y Cond 4) células CTM-CD90+ SPM, inducidas y cultivadas 14 días con BMP-7 + TGF- β 1 (se usaron 150 ng de ARN, 1m μ M de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE).

6.7 Extracción de ARN de células CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada sembradas en tres diferentes andamios

Se probaron los tres siguientes andamios:

- A. BioSponge (andamio comercial).
- B. Andamio 1, hecho en el INR LG II. Está constituido por 3% de alginato y 0.1% de β -TCP.
- C. Andamio 2, hecho en el INR LG II. Está constituido por 3% de alginato y 1% de β -TCP y 0.3% de glucosa.

En cada andamio se sembraron 2.5×10^5 células CTM CD90+ SPM previamente expandidas con 20% DSFB y cultivadas con 10% de SBA en medio DMEM por 14 días (ver figura 34).

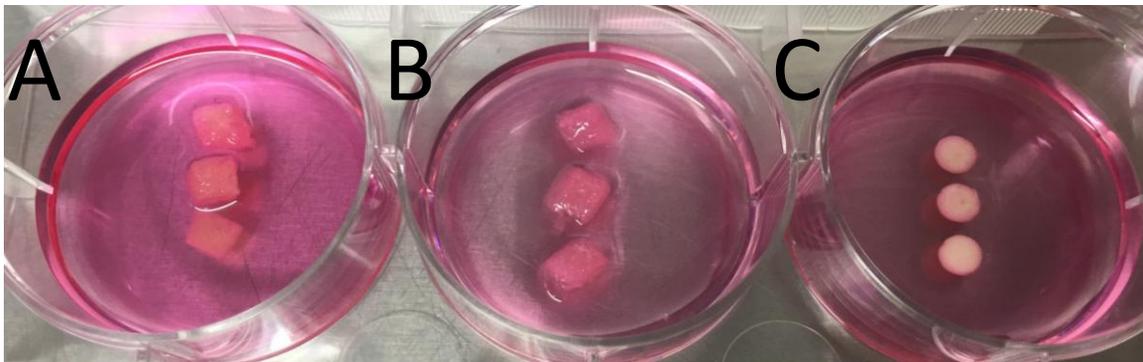


Figura 34. Fotografía del cultivo de los diferentes andamios con los que se evaluó la extracción de ANR. Andamio A) BioSponge sembrado con SPM CTM-CD90+; B) Andamio 1, hecho en el INR LG II, está constituido por 3% de alginato y 0.1% de β -TCP sembrado con SPM CTM-CD90+; y C) Andamio 2, hecho en el INR LG II, está constituido por 3% de alginato y 1% de β -TCP y 0.3% de glucosa sembrado con SPM CTM-CD90+.

Después de los 14 días de cultivo se evaluó la viabilidad celular al teñir las células con calceína se encontraron células viables en los tres andamios como se muestra en la figura 35.

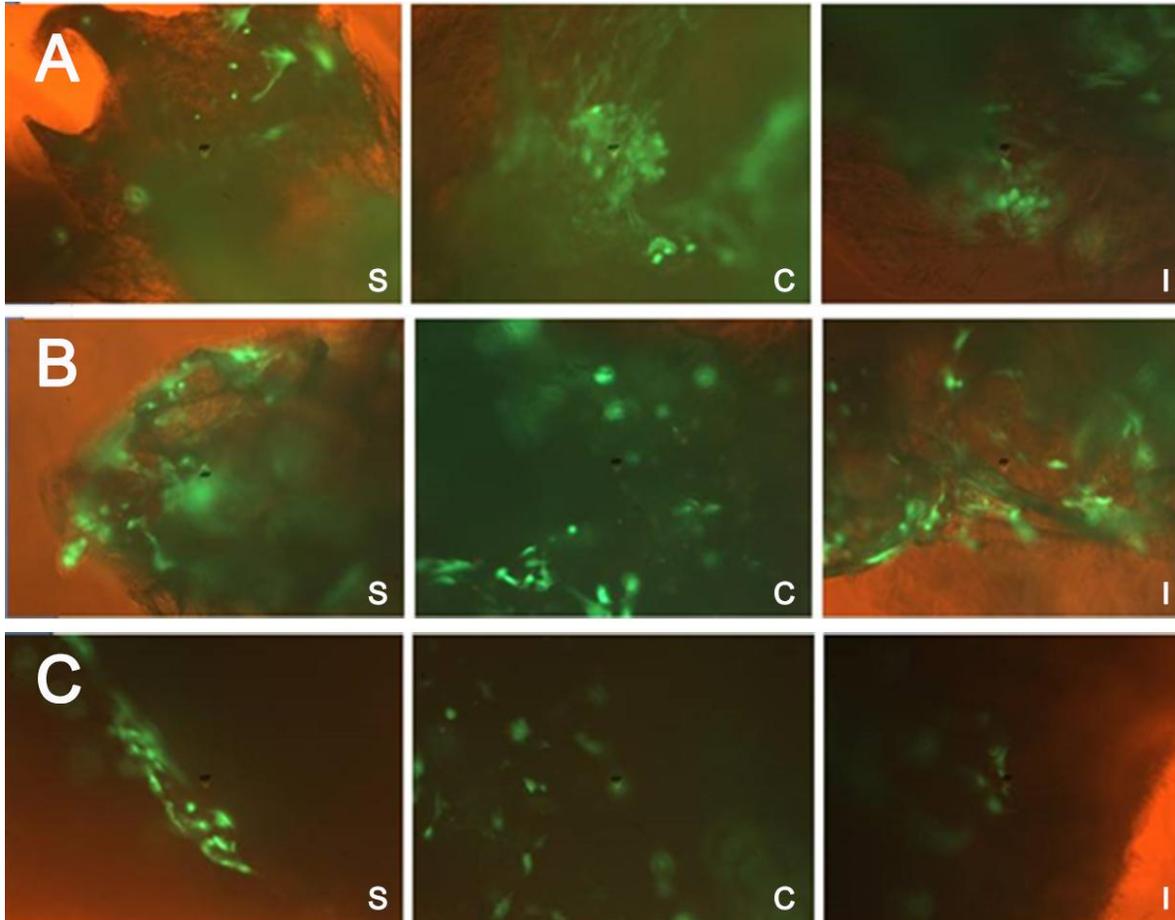


Figura 35. Viabilidad de las células CTM-CD90+ SPM sembradas en los tres andamios que se evaluaron, las células viables teñidas por la calceína se observan de color verde. A) BioSponge (andamio comercial); B) andamio 1, hecho en el INR LG II. Está constituido por 3% de alginato y 0.1% de β -TCP; y C) andamio 2, hecho en el INR LG II. Está constituido por 3% de alginato y 1% de β -TCP y 0.3% de glucosa (S= parte superior del andamio, C= parte central del andamio y I= parte inferior del andamio).

En los tres andamios se realizó una inmunofluorescencia para la proteína colágena del tipo 1 α 2 (COL1A2) que se detectado en las células CTM-CD90+ SMP, encontrándose la expresión positiva de esta proteína en las células cultivadas en los tres andamios (ver figura 36).

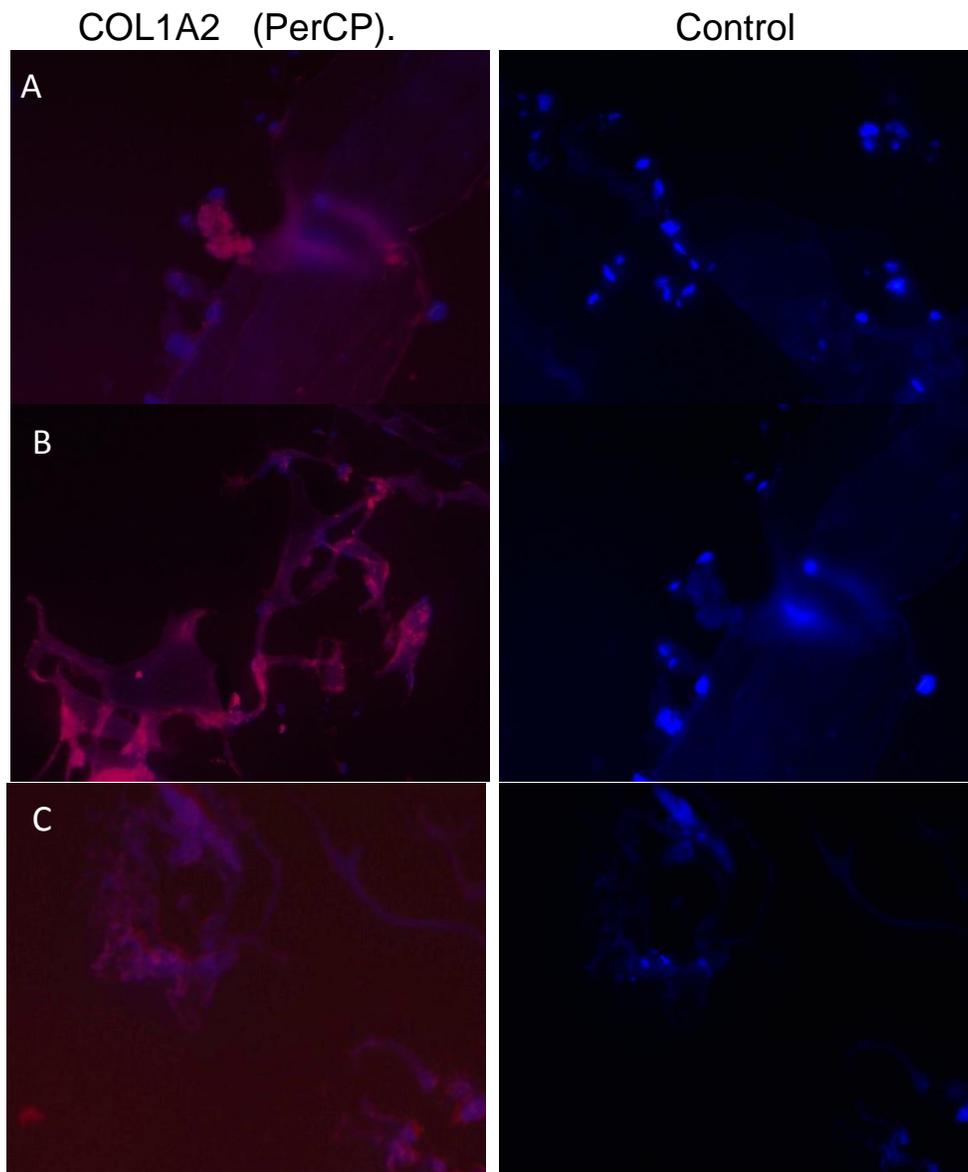


Figura 36. Inmunofluorescencia se estableció la expresión de de colágena del tipo 1 α 2 (COL1A2 marcada con PerCP de color rosa) y los núcleos se observan teñidos con azul (tenidos con DAPI). A) BioSponge (andamio comercial); B) andamio 1, hecho en el INR LG II. Está constituido por 3% de alginato y 0.1% de β -TCP; y C) andamio 2, hecho en el INR LG II. Está constituido por 3% de alginato y 1% de β -TCP y 0.3% de glucosa (S= parte superior del andamio, C= parte central del andamio y I= parte inferior del andamio).

Al momento de hacer la extracción de ARN, éste solo se pudo extraer en cantidad y calidad para el análisis de expresión de genes en los andamios A y C (ver figura 37).

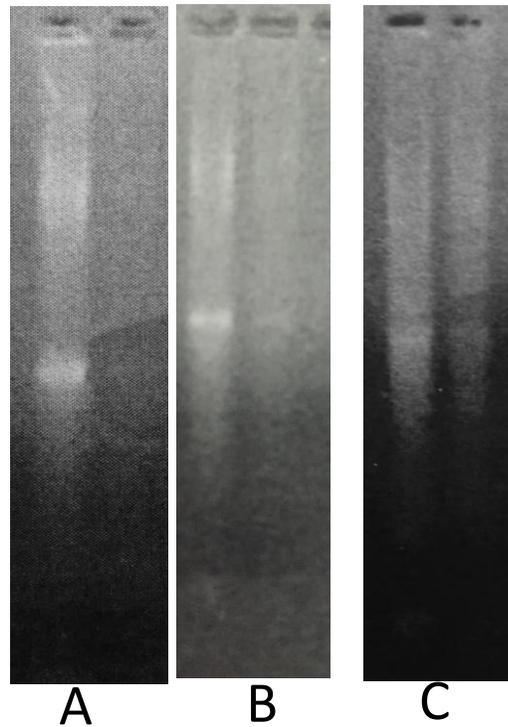


Figura 37. Imagen de los geles donde se evaluó la calidad de la extracción ARN de los andamios que se probaron. A) BioSponge más SPM CTM-CD90+; B) Andamio hecho en el INR LG II, está constituido por 3% de alginato y 0.1% de β -TCP más SPM CTM-CD90+; y C) Andamio 2 hecho en el INR LG II, está constituido por 3% de alginato y 1% de β -TCP y 0.3% de glucosa más SPM CTM-CD90+.

También se avaluó la expresión de genes: COL1A1, SOX9, AGRECANO (AGR), COL2A1, COMP y GAPDH como gen constitutivo, de los andamios en donde se pudo extraer el suficiente ARN. Para BioSponge se encontró la expresión de COL1A1, SOX9, AGR, COMP y GAPDH, para los andamios A y B solo se detectó la expresión de COL1A1 (ver figura 38).

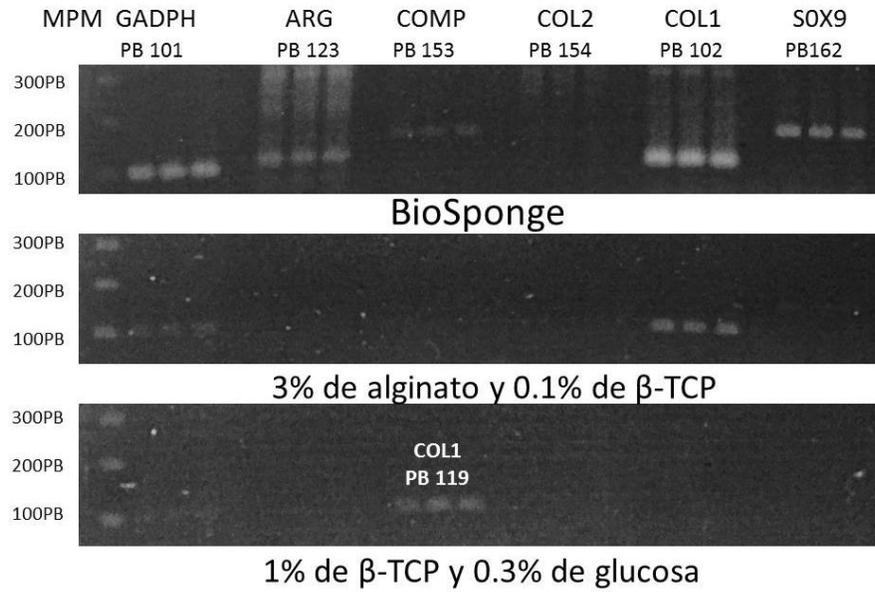


Figura 38. Imagen del análisis de expresión de los tres andamios que se evaluaron (Se usaron 150 ng de ARN, 1m μ M de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE).

Para complementar el estudio se realizó el análisis de expresión de los genes: RUNX2, OCN, COLX, COL1, OPN y GADPH como gen constitutivo. A partir de una muestra de ARN que se extrajo de dos muestras de hueso de un fémur de borrego cadavérico (ver figura 39).

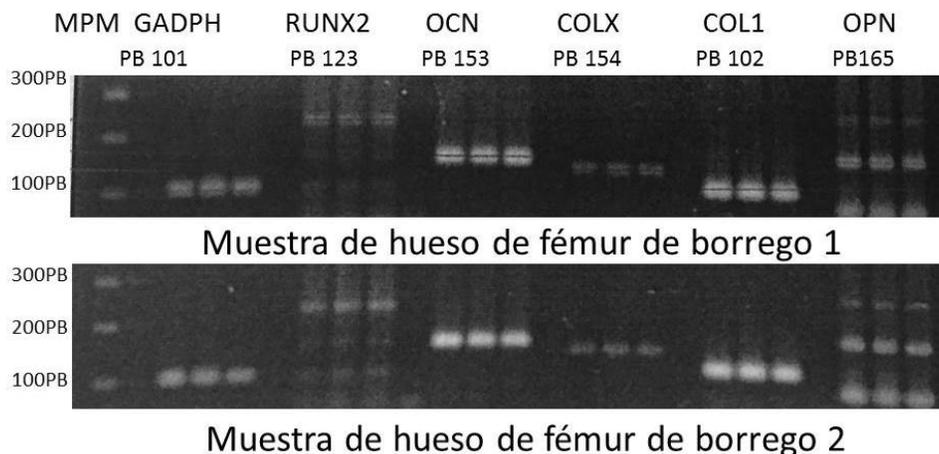


Figura 39. Imagen del análisis de expresión del ARN que se extrajo de hueso del fémur de borrego (Se usaron 150 ng de ARN, 1m μ M de primers, 30 ciclos con equipo Tetro-One setp BIOLINE).

6.7.1 Expresión de genes característicos de cartílago articular en células troncales mesenquimales CTM-CD90+ SPM diferenciadas a cartílago en un andamio en 3D (BioSponge).

Como resultado de este ensayo se logró demostrar que células CTM-CD90+ SPM expandidas en 20% de DSFB en primer pase sembradas sobre el BioSponge (ver figura 40), pueden ser diferenciadas a un fenotipo de condrocito hipertrófico.

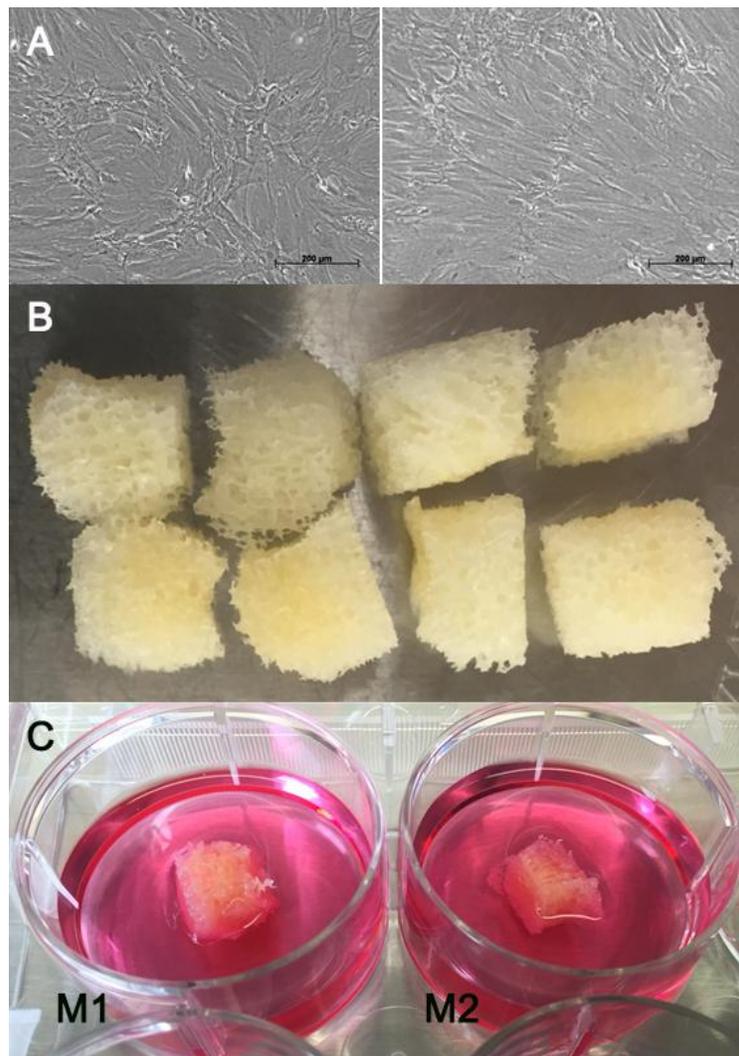


Figura 40. Imagen A) células CTM-CD90+ SPM expandidas en 20% de DSFB en primer pase en monocapa; B) cortes del andamio BioSponge de 16x16 mm antes del cultivo; C) BioSponge sembrado con CTM-CD90+ SPM, M1= cultivado con BMP-7 y M2= cultivado con TGF- β 1.

Como resultado del cultivo de las CTM-CD90+ SPM en segundo pase en el BioSponge con BMP-7 se encontró la expresión los genes característicos de cartílago articular que previamente fueron establecidos (COL1A1, SOX9, AGR y COL2A1 (ver figura 41). Así también se encontró la expresión de los genes colágena X, osteocalcina y Osteopontina. Por otra parte no se encontró la expresión del gen del Factor de transcripción 2 relacionado con Runt (RUNX2). Lo que indica que en la expresión de genes las células en cultivo presentan un fenotipo de condrocito hipertrófico (ver figura 42).

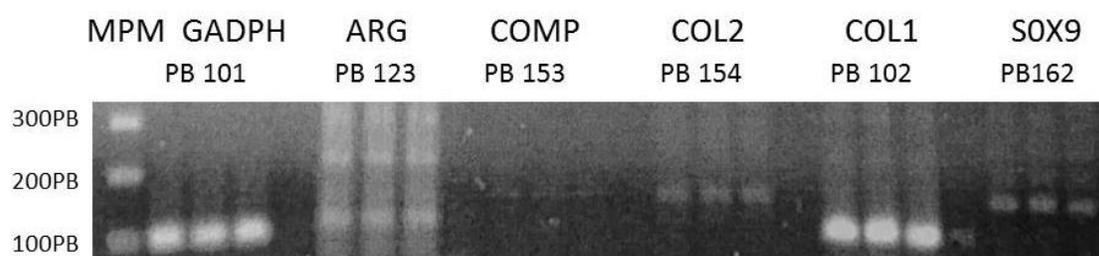


Figura 41. Análisis de expresión de genes característicos de condrocitos articulares de borrego con las SPM CTM-CD90+ sembradas en el andamio BioSponge, durante 14 días en cultivo con medio DMEM SBA 10% + BMP-7 a una concentración de 100ng/mL.

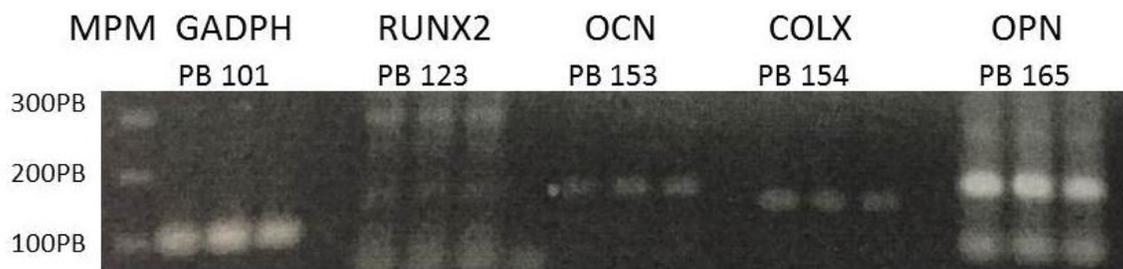


Figura 42. Análisis de expresión de genes característicos de hueso de borrego con las SPM CTM-CD90+ sembradas en el andamio BioSponge, durante 14 días en cultivo con medio DMEM SBA 10% + BMP-7 a una concentración de 100ng/mL.

Cuando las células CTM-CD90+ SPM en segundo pase en el BioSponge fueron cultivadas por 14 días con TGF- β 1, solo se obtuvo la expresión de los genes AGR, COL1 (ver figura 43) y OPG (ver figura 44).

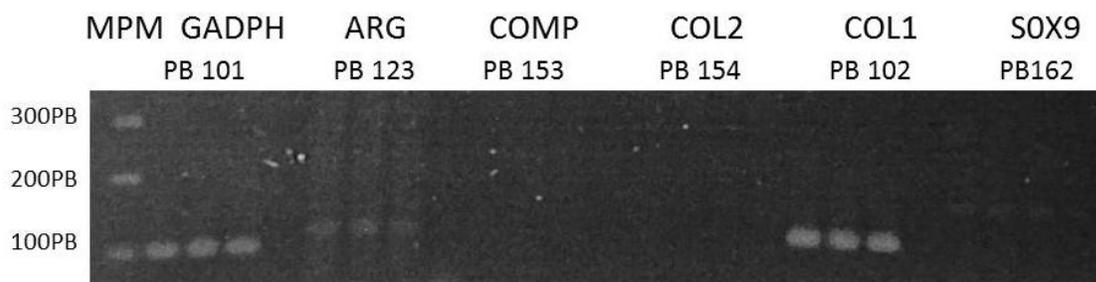


Figura 43. Análisis de expresión de genes característicos de condrocitos articulares de borrego con las SPM CTM-CD90+ sembradas en el andamio BioSponge, durante 14 días en cultivo con medio DMEM SBA 10% + TGF- β 1 a una concentración de 10ng/mL.

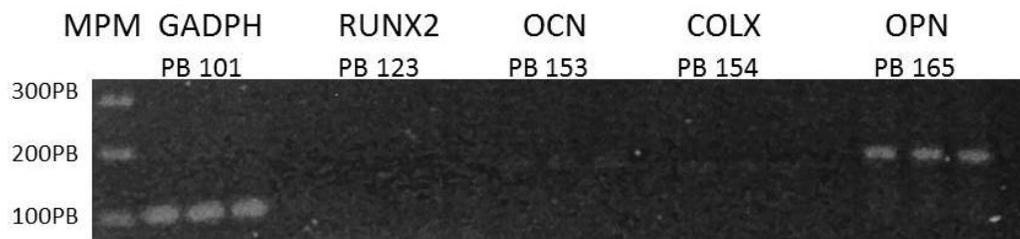


Figura 44. Análisis de expresión de genes característicos de hueso de borrego con las SPM CTM-CD90+ sembradas en el andamio BioSponge, durante 14 días en cultivo con medio DMEM SBA 10% + TGF- β 1 a una concentración de 10ng/mL.

VII. Discusión

Este estudio describe el desarrollo de un modelo de diferenciación de CTMs a la línea condral, en un modelo pre-clínico proporcionando las bases para el desarrollo de nuevas estrategias en el tratamiento quirúrgico de las lesiones condrales focalizadas en rodilla previniendo así el desarrollo de Osteoartritis temprana en pacientes jóvenes.

Recientemente, las CTMs han tomado auge en el área de la ingeniería tisular, siendo la médula ósea la fuente principal de ésta línea celular, considerándose como el estándar de oro.⁶⁶ Por razón, en la primera etapa del estudio se aisló y se diferenció a condrocito una población de CTM CD90+ obtenidas de la médula ósea por punción de la cresta iliaca en las borregas.

Al igual que lo reportado en CTM C90+ aisladas de otros tejidos como el líquido sinovial.⁶ El perfil de expresión génica que encontramos en las CTM CD90+ MO corresponde al de células que ya se encuentran comprometidas hacia el linaje condral. Ya que antes de la diferenciación de las CTMs CD90+ MO mostraron la expresión de genes característicos de cartílago articular: COL2A1, SOX9 y COPM, así como los genes relacionados con la hipertrofia COL1A1, OCN, COLX y OPN. Sin embargo, la expresión del gen de AGR se observó después de la inducción con MC y el cocultivo parácrino con condrocitos primarios en medio suplementado con TGF- β 1 por 14 días. La expresión de los genes COL1A1, OCN, COLX y OPN no se perdió después del proceso de diferenciación obteniéndose un fenotipo condrocito hipertrófico, lo que concuerda con lo reportado por Hwang y cols (2011).⁶⁷

Una vez estandarizados los cultivos y la diferenciación de las CTMs aisladas de MO. Como una segunda etapa de este estudio se realizó un proceso de movilización celular con la administración de G-CSF (recombinante humano) para el aislamiento de CTMs de sangre periférica con el objetivo de optimizar una fuente celular que reduzca los índices

de morbilidad y dolor post-operatorio originado en la toma de médula ósea de la cresta iliaca.

A pesar de que la homología reportada del G-CSF humano y del borrego es del 81%, después la segunda dosis del G-CSF conseguimos duplicar el conteo de leucocitos en la circulación sistémica de las borregas, similar a lo reportó por Juthier cols. (2006).⁶⁸

Durante el tratamiento para la movilización con el G-CSF el primer marcado de superficie que se incrementó después de la segunda dosis fue el CD34 lo que deja de manifiesto que el tratamiento afecta primero la población de células troncales hematopoyéticas del nicho en la MO, debido a la inhibición de las proteínas VCAM-1 y CXCR4 y la producción de la metaloproteinasa 9, que facilitan que las células troncales primero puedan desanclarse del nicho de la médula ósea y luego penetrar a los vasos sanguíneos para llegar a la circulación sistémica.¹¹

Al cuarto día (después de la tercera dosis del G-CSF) el marcador CD90 se incrementó de forma significativa, lo que favoreció su aislamiento por medio del anticuerpo anti-CD90 acoplado a perlas superparamagnéticas.

Por otra parte, el aislamiento de las CTMs en sangre periférica movilizada se ha reportado en varias especies de mamíferos incluyendo cerdos,⁶⁹ conejos,¹⁴ perros,⁷⁰ ratones,⁷¹ ratas,⁷² y seres humanos⁷³. La presencia de las CTMs en tejidos tan variados, habla de la capacidad de las CTM de adaptarse a diversos nichos tisulares. La aportación de nutrientes puede ser alta como en la médula ósea o mínima como en el limbo de la córnea. Contando con esta evidencia, nosotros empleamos un medio de cultivo estándar (DMEM) suplementado con suero de borrego adulto. Esto como una primera estrategia para la expansión de las CTMs CD90+ SPM y que resulto exitosa cuando se expandieron

las CTMs CD90+ MO. Sin embargo las células adquirieron una morfología esférica y poco adherente que solo proliferaron cuando se cultivaron con MC.

Al tratar de diferenciar a condrocito las CTMs CD90+ SPM cultivadas en SBA bajo el mismo esquema que las CTM, CD90+ de MO, solo se obtuvo la expresión del constitutivo GADPH y AGR.

Se ha reportado que la morfología esférica en las CTMs inhibe la polimerización de la actina en los microfilamentos intracelulares, la expresión de Sox9 y la posterior síntesis de las proteínas características del cartílago articular (COL2A1 y AGR). Por esta razón el cambio de la forma esférica a fibroblastoide resulta crucial para lograr su diferenciación a condrocito.^{74,75}

Favaron y cols. (2014), reportaron exitosamente el empleo de suero fetal bovino “definido” para la proliferación de CTMs con morfología fibroblastoide.²¹ Por lo que se decidió emplear esta condición de cultivo para la expansión *in vitro* de las CTMs CD90+ SPM. Después de la expansión *in vitro* obtuvimos CTMs CD90+ SPM con morfología fibroblastoide, que mantuvieron la expresión de los marcadores de superficie: CD73, CD90 y CD105, en más del 90% de las células en cultivo en primer pase.

El perfil de expresión las CTMs CD90+ SPM expandidas con SFB “definido” mostraron los genes: ARG, COL1A1, SOX9, COMP, OCN, COLX y OPN. Desconocemos la razón por la que no se obtuvo la expresión de COL2A1 cuándo se intentó diferenciar las CTMs CD90+ SPM a condrocito bajo el mismo esquema que las CTMs CD90+ MO empleando TGF- β 1.

Según lo reportado mediante el empleo de protocolos alternativos para la diferenciación a condrocitos de CTMs.⁷⁶ Decidimos usar BMP-7 para la diferenciación en monocapa de las CTMs CD90+ SPM expandidas con SFB “definido”. Como resultado, se obtuvo la

expresión del gen COL2A1, junto con los genes característicos de cartílago articular e hipertrofia observados desde la expansión en SFB “definido” de CTM CD90+ SPM.

Cuando las CTMs CD90+ SPM fueron sembradas en el andamio en 3D Biosponge, estas mantuvieron el mismo perfil de expresión génica de las células expandidas con SFB “definido” en monocapa.

Después de la diferenciación de las CTMs CD90+ SPM sembradas en el Biosponge (2,5 mm) con el BMP-7 en SBA 10% y 14 días de cultivo, al igual que en el cultivo de diferenciación en monocapa se obtuvo un perfil de expresión génica de condrocito hipertrófico, similar al que encontramos en condrocitos primarios recién aislados del cartílago articular de borrego en donde se identificó la expresión de los genes: ARG, COL1A1, COL2A1, SOX9, COMP, OCN, COLX y OPN. Sin la expresión del gen RUNX2 que se ha descrito en hueso.⁷⁷

VIII. Conclusiones

Es factible aislar CTMs a partir de SPM en borrego y expandir las *in vitro*, y lograr su diferenciación hacia un fenotipo similar al de condrocitos hipertróficos.

Nuestros resultados ofrecen un modelo animal en borrego para obtención práctica de CTMs y con aplicaciones en ingeniería de tejidos y en modelos de diferenciación celular. Este modelo puede ser empleado en el campo de la ortopedia para el desarrollo de estudios preclínicos para el desarrollo de nuevas estrategias en la regeneración del cartílago articular.

IX. Perspectivas

Las investigaciones que le den seguimiento a este trabajo estarán enfocadas en mantener el fenotipo de los condrocitos primero sobre un andamio tridimensional por periodos prolongados de tiempo y después al ser injertados en un andamio en un ratón atímico por un periodo al menos de 1 meses.

X. Referencias

1. Rai MF, Rachakonda PS, Manning K, et al. Molecular and phenotypic modulations of primary and immortalized canine chondrocytes in different culture systems. *Research in veterinary science* 2009;87:399-407.
2. Albrecht C, Tichy B, Nurnberger S, et al. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* 2011;19:1219-27.
3. Nadzir MM, Kino-oka M, Maruyama N, et al. Comprehension of terminal differentiation and dedifferentiation of chondrocytes during passage cultures. *Journal of bioscience and bioengineering* 2011;112:395-401.
4. Chen KS, Tatarczuch L, Ahmed Y, et al. Identification of light and dark hypertrophic chondrocytes in mouse and rat chondrocyte pellet cultures. *Tissue & cell* 2010;42:121-8.
5. Gavenis K, Schmidt-Rohlfing B, Mueller-Rath R, Andereya S, Schneider U. In vitro comparison of six different matrix systems for the cultivation of human chondrocytes. *In vitro cellular & developmental biology Animal* 2006;42:159-67.
6. Krawetz RJ, Wu YE, Martin L, Rattner JB, Matyas JR, Hart DA. Synovial fluid progenitors expressing CD90+ from normal but not osteoarthritic joints undergo chondrogenic differentiation without micro-mass culture. *PLoS One* 2012;7:e43616.
7. Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, et al. Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood*. 1993/04/15 ed1993:2031-5.
8. Schmitz N, Beksac M, Bacigalupo A, et al. Filgrastim-mobilized peripheral blood progenitor cells versus bone marrow transplantation for treating leukemia: 3-year results from the EBMT randomized trial. *Haematologica* 2005;90:643-8.
9. Welte K, Gabilove J, Bronchud MH, Platzer E, Morstyn G. Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood* 1996;88:1907-29.
10. Mueller MM, Bialleck H, Bomke B, et al. Safety and efficacy of healthy volunteer stem cell mobilization with filgrastim G-CSF and mobilized stem cell apheresis: results of a prospective longitudinal 5-year follow-up study. *Vox Sang* 2013;104:46-54.
11. Salvucci O, Jiang K, Gasperini P, et al. MicroRNA126 contributes to granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor cell mobilization by reducing the expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Haematologica* 2012;97:818-26.
12. Sahin AO, Buitenhuis M. Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. *Cell Adh Migr* 2012;6:39-48.
13. Gallardo E, Garcia A, Ramon C, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2J with MPZ Thr124Met mutation: clinico-electrophysiological and MRI study of a family. *J Neurol* 2009;256:2061-71.
14. Fu WL, Zhou CY, Yu JK. A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *The American journal of sports medicine* 2014;42:592-601.
15. Azouna NB, Berraes L, Regaya Z, Jenhani F. Immunophenotyping of hematopoietic progenitor cells: Comparison between cord blood and adult mobilized blood grafts. *World J Stem Cells* 2011;3:104-12.
16. Jin P, Wang E, Ren J, et al. Differentiation of two types of mobilized peripheral blood stem cells by microRNA and cDNA expression analysis. *J Transl Med* 2008;6:39.

17. Rammal H, Beroud J, Gentils M, et al. Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. *Biomed Mater Eng* 2013;23:299-309.
18. Villa-Diaz LG, Brown SE, Liu Y, et al. Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells* 2012;30:1174-81.
19. Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, et al. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 2005;23:1105-12.
20. Lotz MK, Kraus VB. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis research & therapy* 2010;12:211.
21. Favaron PO, Mess A, Will SE, Maiorka PC, de Oliveira MF, Miglino MA. Yolk sac mesenchymal progenitor cells from New World mice (*Necromys lasiurus*) with multipotent differential potential. *PLoS One* 2014;9:e95575.
22. Ibarra C, Izaguirre A, Villalobos E, et al. Follow-up of a new arthroscopic technique for implantation of matrix-encapsulated autologous chondrocytes in the knee. *Arthroscopy : the journal of arthroscopic & related surgery : official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association* 2014;30:715-23.
23. Goodrich LR, Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Veterinary journal* 2006;171:51-69.
24. Ashraf S, Ahn J, Cha BH, et al. RHEB: a potential regulator of chondrocyte phenotype for cartilage tissue regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2016.
25. Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vecsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *The Journal of bone and joint surgery British volume* 2004;86:286-95.
26. Robert JS. Model systems in stem cell biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2004;26:1005-12.
27. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
28. Sabapathy V, Kumar S. hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. *Journal of cellular and molecular medicine* 2016.
29. Tavassoli M, Crosby WH. Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science* 1968;161:54-6.
30. Cohnheim JF. Ueber entzündung und eiterung. *Arch path Anat* 1867;40.
31. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics* 1970;3:393-403.
32. Zhang G, Shang B, Yang P, Cao Z, Pan Y, Zhou Q. Induced pluripotent stem cell consensus genes: implication for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cell therapy. *Stem cells and development* 2012;21:955-64.
33. Luria EA, Owen ME, Friedenstein AJ, Morris JF, Kuznetsow SA. Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell and tissue research* 1987;248:449-54.
34. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 1991;9:641-50.
35. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics* 1987;20:263-72.

36. Pittenger GL, Malik RA, Burcus N, Boulton AJ, Vinik AI. Specific fiber deficits in sensorimotor diabetic polyneuropathy correspond to cytotoxicity against neuroblastoma cells of sera from patients with diabetes. *Diabetes care* 1999;22:1839-44.
37. Irfan-Maqsood M, Matin MM, Heirani-Tabasi A, et al. Adipose derived mesenchymal stem cells express keratinocyte lineage markers in a co-culture model. *Cellular and molecular biology* 2016;62:44-54.
38. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human reproduction* 2004;19:1450-6.
39. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2003;18:696-704.
40. Bi Y, Ehrchiou D, Kilts TM, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature medicine* 2007;13:1219-27.
41. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004;6:543-53.
42. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism* 2001;44:1928-42.
43. Crisan M, Yap S, Casteilla L, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* 2008;3:301-13.
44. Karimineko S, Movassaghpour A, Rahimzadeh A, Talebi M, Shamsasenjan K, Akbarzadeh A. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 2016;44:749-57.
45. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
46. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-49.
47. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* 2002;30:42-8.
48. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* 2000;24:372-6.
49. Verma S, Younus J, Stys-Norman D, Haynes AE, Blackstein M, Sarcoma Disease Site Group of Cancer Care Ontario's Program in Evidence-based C. Dose-intensive chemotherapy with growth factor or autologous bone marrow/stem cell transplant support in first-line treatment of advanced or metastatic adult soft tissue sarcoma: a systematic review. *Cancer* 2008;112:1197-205.
50. Platzter E. Human hemopoietic growth factors. *European journal of haematology* 1989;42:1-15.
51. Sorgel F, Schwebig A, Holzmann J, Prasch S, Singh P, Kinzig M. Comparability of biosimilar filgrastim with originator filgrastim: protein characterization, pharmacodynamics, and pharmacokinetics. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2015;29:123-31.
52. Crovace A, Lacitignola L, Rossi G, Francioso E. Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultured bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary medicine international* 2010;2010:250978.

53. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2004;36:568-84.
54. Hartung T, Von Aulock S, Schneider C, Faist E. How to leverage an endogenous immune defense mechanism: the example of granulocyte colony-stimulating factor. *Critical care medicine* 2003;31:S65-75.
55. Fortier LA, Travis AJ. Stem cells in veterinary medicine. *Stem cell research & therapy* 2011;2:9.
56. Lee HL, Yu B, Deng P, Wang CY, Hong C. Transforming Growth Factor-beta-Induced KDM4B Promotes Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2016;34:711-9.
57. Diederichs S, Gabler J, Autenrieth J, et al. Differential Regulation of SOX9 Protein During Chondrogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Versus Mesenchymal Stromal Cells: A Shortcoming for Cartilage Formation. *Stem cells and development* 2016;25:598-609.
58. Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:8343-50.
59. Li J, Zhao Z, Liu J, et al. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-beta1/Smads pathway. *Cell proliferation* 2010;43:333-43.
60. Juhasz T, Matta C, Somogyi C, et al. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cellular signalling* 2014;26:468-82.
61. Woolf A, Litovitz T. Reporting of adverse events. *The New England journal of medicine* 2003;348:1410-1; author reply -1.
62. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis and rheumatism* 2008;58:15-25.
63. Lin CS, Lue TF. Defining vascular stem cells. *Stem cells and development* 2013;22:1018-26.
64. Bajpai R, Lesperance J, Kim M, Terskikh AV. Efficient propagation of single cells Accutase-dissociated human embryonic stem cells. *Molecular reproduction and development* 2008;75:818-27.
65. Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG. Comparative review of growth factors for induction of three-dimensional in vitro chondrogenesis in human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and adipose tissue. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16:435-44.
66. Bieback K, Kern S, Kocaomer A, Ferlik K, Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 2008;18:S71-6.
67. Hwang NS, Im SG, Wu PB, et al. Chondrogenic priming adipose-mesenchymal stem cells for cartilage tissue regeneration. *Pharmaceutical research* 2011;28:1395-405.
68. Juthier F, Vincentelli A, Gaudric J, et al. Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2006;131:843-52.
69. Harn HJ, Huang MH, Huang CT, et al. Rejuvenation of aged pig facial skin by transplanting allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cells from a young pig. *Cell transplantation* 2013;22:755-65.
70. Thomasson B, Peterson L, Thompson J, Goerner M, Kiem HP. Direct comparison of steady-state marrow, primed marrow, and mobilized peripheral blood for transduction of hematopoietic stem cells in dogs. *Human gene therapy* 2003;14:1683-6.

71. Lee H, Che JH, Oh JE, Chung SS, Jung HS, Park KS. Bone marrow stem/progenitor cell mobilization in C57BL/6J and BALB/c mice. *Laboratory animal research* 2014;30:14-20.
72. Deng MW, Wei SJ, Yew TL, et al. Cell Therapy With G-CSF-Mobilized Stem Cells in a Rat Osteoarthritis Model. *Cell transplantation* 2015;24:1085-96.
73. Kang J, Hur J, Kang JA, et al. Activated platelet supernatant can augment the angiogenic potential of human peripheral blood stem cells mobilized from bone marrow by G-CSF. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2014;75:64-75.
74. Folkman J, Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature* 1978;273:345-9.
75. Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development* 2015;142:817-31.
76. Cicione C, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I, Diaz-Prado S, Blanco FJ. Alternative protocols to induce chondrogenic differentiation: transforming growth factor-beta superfamily. *Cell and tissue banking* 2015;16:195-207.
77. Meyer MB, Benkusky NA, Sen B, Rubin J, Pike JW. Epigenetic Plasticity Drives Adipogenic and Osteogenic Differentiation of Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *The Journal of biological chemistry* 2016;291:17829-47.

XI. Anexo

Se anexa el artículo de los resultados del proyecto, correspondiente a la técnica de aislamiento, caracterización y expansión *in viro* de las células troncales mesenquimales CTM-CD90+ aisladas de sangre periférica movilizada en borrego.

Cryopreserved CD90+ cells obtained from mobilized peripheral blood in sheep: a new source of mesenchymal stem cells for preclinical applications

Carlos Landa-Solís · Julio Granados-Montiel · Anell Olivos-Meza ·
Carmina Ortega-Sánchez · Mónica Cruz-Lemini · Cecilia Hernández-Flores ·
María Eugenia Chang-González · Ricardo Gómez García · Brenda Olivos-Díaz ·
María Cristina Velasquillo-Martínez · Carlos Pineda ·
Clemente Ibarra

Received: 11 March 2015 / Accepted: 22 July 2015 / Published online: 29 July 2015
© The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract Mobilized peripheral blood (MPB) bone marrow cells possess the potential to differentiate into a variety of mesenchymal tissue types and offer a source of easy access for obtaining stem cells for the development of experimental models with applications in tissue engineering. In the present work, we aimed to isolate by magnetic activated cell sorting CD90+ cells from MPB by means of the administration of Granulocyte-Colony Stimulating Factor and to evaluate cell proliferation capacity, after thawing of the in vitro culture of this population of mesenchymal stem cells (MSCs) in sheep. We obtained a median of 8.2 ± 0.6 million of CD90+ cells from the 20-mL MPB sample. After thawing, at day 15 under in vitro culture, the mean CD90+ cells determined by flow cytometry was

92.92 ± 1.29 % and cell duplication time determined by crystal violet staining was 47.59 h. This study describes for the first time the isolation, characterization, and post-in vitro culture thawing of CD90+ MSCs from mobilized peripheral blood in sheep. This population can be considered as a source of MSCs for experimental models in tissue engineering research.

Keywords Mesenchymal stem cells · Mobilized peripheral blood · Cryopreserved CD90+ cells

Introduction

There is currently a need to find sources of stem cells that offer high plasticity, permit their expansion in sufficient numbers for their use in experimental models in animals, where novel technologies can be developed for the

Carlos Landa-Solís, Julio Granados-Montiel, Anell Olivos-Meza and Carmina Ortega-Sánchez have contributed equally to this work.

C. Landa-Solís · J. Granados-Montiel ·
A. Olivos-Meza · C. Ortega-Sánchez ·
C. Hernández-Flores · R. G. García · B. Olivos-Díaz ·
M. C. Velasquillo-Martínez · C. Ibarra (✉)
Department of Tissue Engineering, Cell Therapy and
Regenerative Medicine, National Rehabilitation Institute,
Av México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe,
CP 14389 Mexico City, Mexico
e-mail: tissuegroup.inr@gmail.com

M. Cruz-Lemini
Department of Fetal Medicine and Surgery, Women and
Children's Specialty Hospital of Queretaro, Queretaro,
Mexico

M. E. Chang-González
National Institute of Pediatrics, Mexico City, Mexico

C. Pineda
Research Direction, National Rehabilitation Institute, Av
México-Xochimilco 289, Col. Arenal de Guadalupe,
CP 14389 Mexico City, Mexico

repair of damaged tissues and that can safely be transferred to therapy in humans. This has encouraged investigators to experiment with mesenchymal stem cells (MSCs) mobilized in bone marrow (BM) to peripheral blood by means of treatment with Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) (Chao et al. 1993; Schmitz et al. 2005). This mechanism of action described for mobilizing MSCs to peripheral blood is based on the negative modulation of the surface molecule of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) and inhibition of nestin in nestin-positive MSCs localized in the vascular compartment of the BM niche (Hopman and DiPersio 2014; Sousa et al. 2014), favoring its release from the niche and migration of these through the intramedullary cavity into peripheral circulation (Sahin and Buitenhuis 2012; Salvucci et al. 2012).

At the end of the past century, criteria were established for identification of MSCs in humans; adherence capacity to culture flasks under standard conditions of *in vitro* culture, expression of positive cell surface markers for CD73, CD90 and CD105 and negative for CD34 and CD45, and the differentiation capacity of at least three cellular lineages (osteoblastic, chondroblastic and adipogenic) (Dominici et al. 2006; Pittenger et al. 1999).

MSCs populations have been identified in mobilized peripheral blood (MPB) that has been characterized by CD105+, CD90+, CD73+, CD31–, CD34–, and CD45– surface markers (Rammal et al. 2013; Villa-Diaz et al. 2012). For the particular case of MPB-isolated MSCs, their plasticity has been demonstrated by differentiation to adipocytes, chondrocytes and osteoblasts (Jin et al. 2008; Tondreau et al. 2005).

Studies in which BM cells have been obtained from sheep have evaluated their potential as experimental models in the field of Orthopedics. They have been employed as CD29, CD44 and CD166 MSCs markers, in an attempt to establish the number of MSCs in sheep BM, obtaining positive cells to these antibodies (McCarty et al. 2009). However, in sheep MPB, cells that are positive for the CD90 MSCs marker have not been characterized, isolated or expanded *in vitro*.

Therefore, in the present study, we decided to isolate by means of magnetic pearls, the CD90+ cells of sheep MPB by means of the administration of G-CSF, and to evaluate the proliferation capacity of the *in vitro* culture of this MSCs population.

Materials and methods

Characteristics of the sheep

We employed four male Suffolk sheep weighing between 60 and 70 kg, who were stabled in an adequate area designed as an animal facility. Sheep were managed by establishing their individual clinical history, describing in detail state of health and body condition, upon their admittance into the animal facility. All animals received human care in compliance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” published by the National Institutes of Health (NIH publication 85-23, 1985, cited 2011). Experimental studies were conducted in accordance with NOM-062-Z00-1999, the Animal Protection Law for the Federal District and the General Health Law Related to Health Research (2001).

Bone marrow cell mobilization to peripheral blood in sheep

For mobilization of stem cells to peripheral blood, two sheep received three doses every 24 h of G-CSF (Filgrastim; Amgen, Thousand Oaks, CA, USA) at a dose of 10 µg/kg body weight, subcutaneously (sc). On day 4, they were administered 20 mL of MPB from the jugular vein mixed with heparin 100 IU/mL, also sc.

Pre- and post-operative care given to sheep for MPB obtention

MPB obtention was performed with the sheep standing without sedation, because the procedure was minimally invasive and no discomfort in the animals was observed during or after it. For sampling, the first jugular groove area was shaved, antisepsis of the area was conducted with a solution of iodine and 70 % ethyl alcohol, threefold. A 16G needle was used for phlebotomy, taking into account the sample volume collected (20 mL). The sample was poured into 4 sterile (12 × 75 mm) tubes with heparin. All the tubes were gently shaken before sending them to the laboratory for processing. After drawing the MPB sample, the sheep returned to its yard where it was monitored by the animal facility staff until recovery.

Isolation of CD90+ cells

The CD90+ cells contained in the peripheral blood of the sheep after mobilization with G-CSF were separated, first together with the mononuclear cells by means of the concentration gradient, in a laminar flow bell (Forma Scientific, Inc., Marietta, OH, USA). Each sample was placed in polypropylene tubes (50-mL capacity) for centrifugation. Subsequently, a 1:2 dilution with phosphate buffer solution (PBS) (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, USA) was carried out, with addition of antibiotics/antimycotics at 1 % (Penicillin 10,000 UI, Streptomycin 10,000 µg, and Amphotericin B 25 µg). We prepared 15 mL of Ficoll Paque (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) in sterile, 50-mL polypropylene tubes (cat. CLS430829, Corning) and added 25 mL of the sample diluted in blood and PBS, with great care in order not to break surface tension, and to achieve a final volume of 40 mL. Later, this was centrifuged at 400g for 30 min. After centrifuging, a fraction of mononuclear cells was taken to initiate the CD90+ cell separation procedure, using the magnetic-activated cellular separation kit (Miltenyi cat. 130-042-303) with the anti-CD90 monoclonal antibody (Miltenyi cat. 130-096-253) coupled with magnetic particles through LS cell separation columns (Miltenyi cat. 130-096-253). From the total number of CD90+ cells obtained, we produced 1×10^5 cell aliquots for characterization by Flow Cytometry (FC) and aliquots of 5×10^5 cells/mL for cryopreservation in fetal bovine serum (Gibco cat. 10082139) supplemented with 10 % dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich cat. D5879). Samples were then stored in liquid nitrogen at -196°C .

Characterization by flow cytometry

For the CD90+ MSC authentication, after isolation of the mononuclear cells, we set apart a 5×10^5 cell aliquot in 1 mL for evaluating the presence of stem cell markers by means of FC. The marking procedure was as follows: once the cells had been separated from the Ficoll and washed with PBS, a portion of approximately 2.5×10^4 cells are placed in polystyrene tubes [Falcon; Becton–Dickinson (BD)] with 10 µL of the antibody suspension and were left to incubate for 30 min at 4°C . The monoclonal (directly conjugated) antibodies applied were: FITC-conjugated CD90 (50 µg/ml, mouse IgG1κ, cat. 555595),

PE-conjugated CD14 (20 µg/ml, mouse IgG2bκ, cat. 340660), FITC-conjugated CD105 (5 µg/ml, mouse IgG1κ, cat. 561443), and PE-conjugated CD166 (20 µg/ml, mouse IgG1κ, cat. 559263) all from BD PharMigen™ (California, USA). The samples and or unlabelled controls were included for each antibody and used to set the gating on the flow cytometer. Data were acquired in a BD FACSCalibur flow cytometer and analyzed by CellQuest™ PRO software (Becton–Dickinson) with a mean of 20,000 events. This procedure was repeated each time that CD90+ cells were obtained from the sheep.

Culture of the mesenchymal stem cells

After 2 months, cryopreserved CD90+ cells were thawed and cultured. We proceeded to expand for each research subject, a 5×10^3 cell aliquot by triplicate in 2-dimensional (2D) culture in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco-Life Technologies, USA, cat. 11960-044), enriched with 10 % adult sheep serum (SBA; BIO-WEST, Inc. cat. S4190-100), with addition of antibiotics/antimycotics at 1 % (Gibco-Life Technologies). The cultures were maintained in an incubator at 37°C with 5 % of CO_2 , in 6-well culture plates for a 15-day period until 90 % confluence was reached. Crystal violet-technique staining was performed at days 2, 4, 8, 11 and 15. The cells maintained in culture up to day 15 were marked with the previously described panel of antibodies and we proceeded to conduct their analysis by FC to establish immunophenotype.

Characterization by immunofluorescence

CD90+ cells after 15 days of culture, were first passed to a mononuclear layer and fixed with 2 % paraformaldehyde for 20 min. Each sample was washed with 0.5 mL of PBS, followed by a solution of PBS/albumin 1 %/triton 0.3 % during 20 min to block unspecific binding sites. Subsequently, primary antibodies were incubated overnight at 4°C at a concentration of 10:40 µL using the following antibodies: anti-CD14, (100 µg at 1 mg/ml, mouse IgG1κ, ABCAM cat. ab6083), anti-CD166 (100 µg at 1 mg/ml, mouse IgG, ABCAM cat. ab78649), anti-CD90 (100 µg at 1 mg/ml, mouse IgG1κ, ABCAM cat. ab225) and CD105 (200 µg/ml, rat IgG2aκ SANTA CRUZ cat. sc-71042). Afterwards, it was washed 2

times with PBS/triton 0.1 % and secondary antibodies anti-IgG-FITC (molecular probes, cat. 65-6111), anti-IgG1-FITC (ABCAM, cat. ab97239) and anti-IgG2a-FITC (ABCAM, cat. ab97244) were placed, coupled to a fluorophore. Control isotype antibodies were also used: mouse IgG1, kappa monoclonal-isotype control (ABCAM cat. ab170190); rabbit IgG, polyclonal-isotype control (ABCAM cat. ab171870) and mouse IgG2a, kappa monoclonal-isotype control (ABCAM cat. ab18415), at a concentration of 1:50 μ L at 37 °C for 2 h. It was washed once more with PBS/triton 0.1 % to remove the excess secondary antibody. Finally, the slides were mounted with DAPI mounting medium Vectashield (Vector cat. H-1200). The images were captured in a pyramid microscope Carl Zeiss Axio system image Vision 4.8.2.

Determination of cellular proliferation

Cell proliferation determination was carried out by means of crystal violet staining technique as previously described by Kueng et al. (1989). For this, we removed the culture medium and left the culture to air-dry. Immediately afterwards, the cells were fixed with glutaraldehyde 1.1 % (Sigma-Aldrich, cat. G5882) for 10 min, after which we removed the excess of fixative, washed the cells with distilled water and again left them to air-dry. We then proceeded to stain the cells with crystal violet dye at 0.1 % (Sigma-Aldrich) for 10 min, after which we removed the excess dye by means of washes with distilled water and left to air-dry. Finally, the dye was solubilized in acetic acid (Sigma-Aldrich) at 10 % under shaking for 20 min, and absorbance was measured at 620 nm in a DTX 800 spectrometer (Beckman–Coulter). Photographs of the stained cells in the wells were taken with a Zeiss-brand invertoscope with the AxioVision ver. 4.8.2

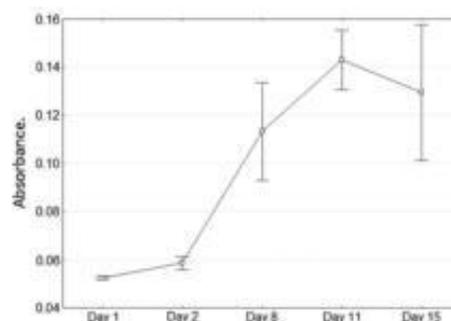


Fig. 2 Proliferation in vitro of CD90+ cells isolated from quantified MPB cells after thawing, by crystal violet staining, through absorbance measurement at 620 nm

software program. To calculate duplication time of the cells under culture, we first calculated the growth rate utilizing the following formula: (median absorbance value obtained at day 15 minus absorbance value obtained at day 2) divided by (absorbance value obtained at day 2), multiplied by 100. Finally, the calculation of cellular duplication time was obtained by dividing the duplication constant (70) by the percentage value of the growth rate, with the result expressed in hours.

In vitro differentiation of mobilized MSCs into mesenchymal tissues

In order to characterize MSCs obtained from MPB and demonstrate their functionality before and after cryopreservation, in vitro differentiation into mesenchymal tissues like osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes was induced. Cells were cultured in six-well plates at a plating density of 1.6×10^7 cells/cm².



Fig. 1 Morphology and proliferation potential by crystal violet staining at days 2, 4, 8, 11 and 15 of in vitro culture after thawing of mobilized peripheral blood (MPB)-isolated CD90+ cells in sheep

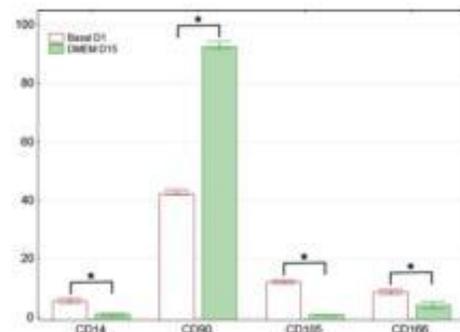


Fig. 3 Comparison of immunophenotype determined by flow cytometry for the panel of CD14, CD90, CD105 and CD166 antibodies, from the day CD90+ cells were isolated from MPB (Basal D1) and day 15 of culture after thawing (DMEM D15). * $p < 0.05$ by comparison with Mann–Whitney U test

For osteogenic differentiation, a 70 % subconfluent culture of mobilized MSCs from passage P2 was used. Cells were incubated in osteogenic medium containing: DMEM, medium supplemented b-FGF (10 ng/mL), BMP-2 (10 ng/mL), β -glycerol phosphate (10 mM), ascorbic acid (50 μ g/mL), and dexamethasone (1×10^{-6} M). After 15 days bone cell nodules were observed positive for alkaline phosphatase. For cartilage differentiation, the same cell confluency was used. Cultures were incubated for 15 days in chondrogenic medium, containing: DMEM, medium supplemented b-FGF (10 ng/mL), kartogenin (10 μ M),

and ascorbic acid (50 μ g/mL). Media were changed every third day. For adipogenic differentiation, cells were incubated in medium containing: DMEM, medium supplemented b-FGF (10 ng/mL), dexamethasone (1×10^{-9} M) and insulin (1 μ M). Cultures were incubated during 15 days and media were changed every third day.

Cell layer and tissue staining

Cell cultures were stained for alkaline phosphatase, Alcian blue, and oil red O staining assays. Cartilage matrix deposition in cells cultured with chondrogenic medium before and after thaw was assessed by Alcian blue staining. Cell layers were stained with Alcian blue (1 % in 3 % acetic acid) for 30 min, washed three times for 2 min in 3 % acetic acid, rinsed once with water. To assess osteoblast differentiation, alkaline phosphatase staining was used. Cell layers were extracted in 2 mL of lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 200 mM NaCl, 0.2 % Nonidet P-40, 0.2 % Triton X-100, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 10 μ g/mL aprotinin) by rotating plates for 30 min at 4 °C. Reaction mixtures, containing 50 μ L of extract, 200 μ L buffer, and 250 μ L of phosphatase substrate (1 mg/mL in 20 % diethanolamine-HCl, pH 9.8), were incubated for 30 min at 37 °C. Oil red O staining assay was used to measure adipogenic differentiation. Medium was aspirated from plate dishes and cells were washed

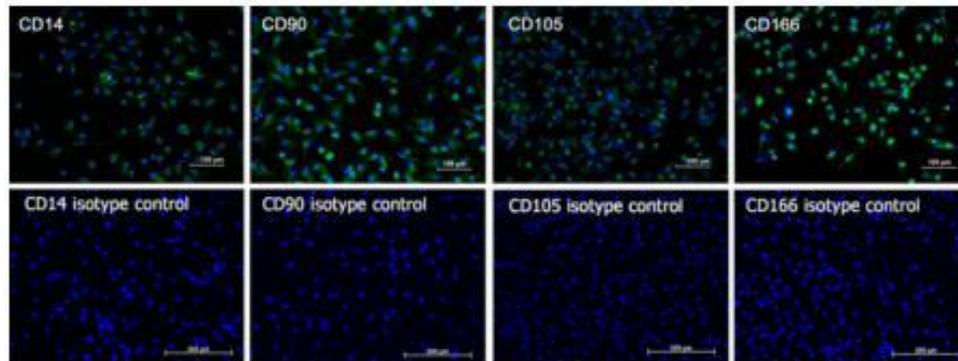


Fig. 4 Immunofluorescence in CD90+ isolated cells from MPB after thawing at 15 days of monolayer culture, for superficial cell markers CD14, CD90, CD105, and CD166. Cell

nuclei present as blue when stained with 4' 6-diamidino-2-phenylindole [DAPI], and green with fluorescein isothiocyanate (FITC) fluorochrome-labeled antibodies. (Color figure online)

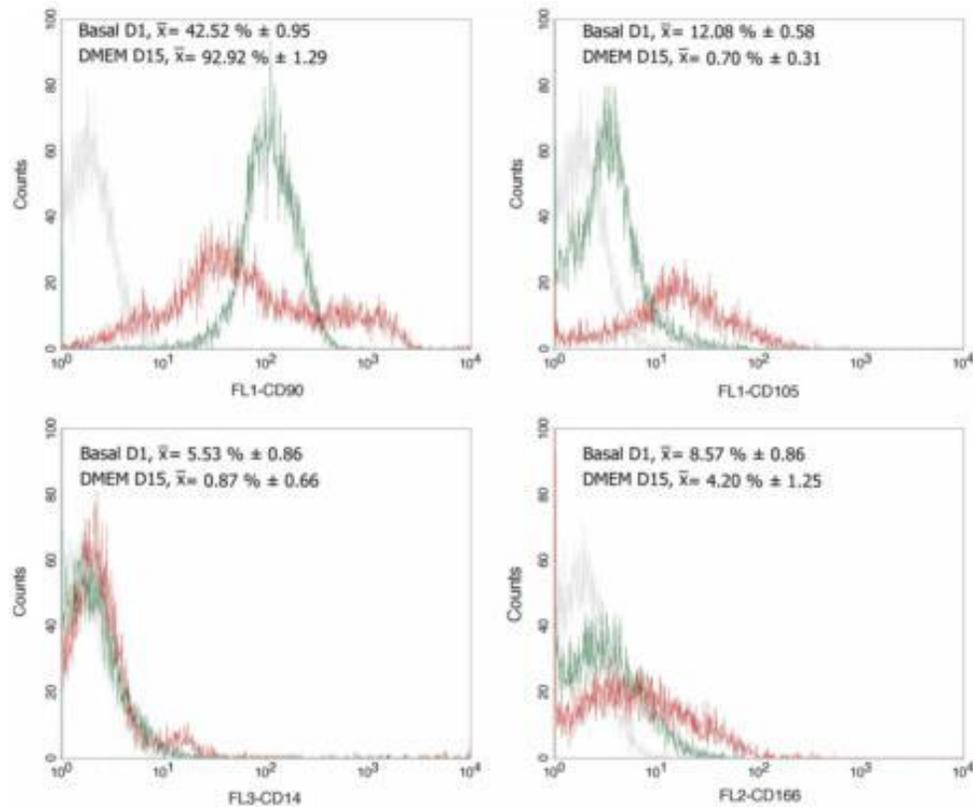


Fig. 5 Immunophenotyping of CD90+ cells isolated from MPB. Data represent the percentage of positive cells for each fluorochrome that was conjugated with each of the monoclonal antibodies used, against the number of events detected. *Gray*

peak, isotype control; *red peak*, basal CD90+ cells before cryopreservation (Basal D1); *green peak*, CD90+ cells after thawing in primary culture for 15 days (DMEM D15). (Color figure online)

once in PBS. Culture layers were fixed in 4 % PFA for 15 min and washed twice with ddH₂O for 2–5 min. Oil red O working solution to stain was applied and left for 15 min; cells were then washed three times with 1 × PBS for 5 min. Finally, cells were rinsed with 50 % isopropanol once and 1 × PBS once.

Statistical analysis

All data are expressed as mean ± standard deviations (SD). Statistical analysis was performed with the STATISTICA StatSoft ver. 7 data analysis program.

We compared all cell surface markers expressed in CD90+ cells isolated on the day of MPB sampling and on day 15 of them under culture. Comparison was performed by the Mann–Whitney *U* test. A statistically significant difference was considered when the value was $p < 0.05$.

Results

We obtained a 20-mL sample of MPB from each sheep on day 4, after the first dose of G-CSF was

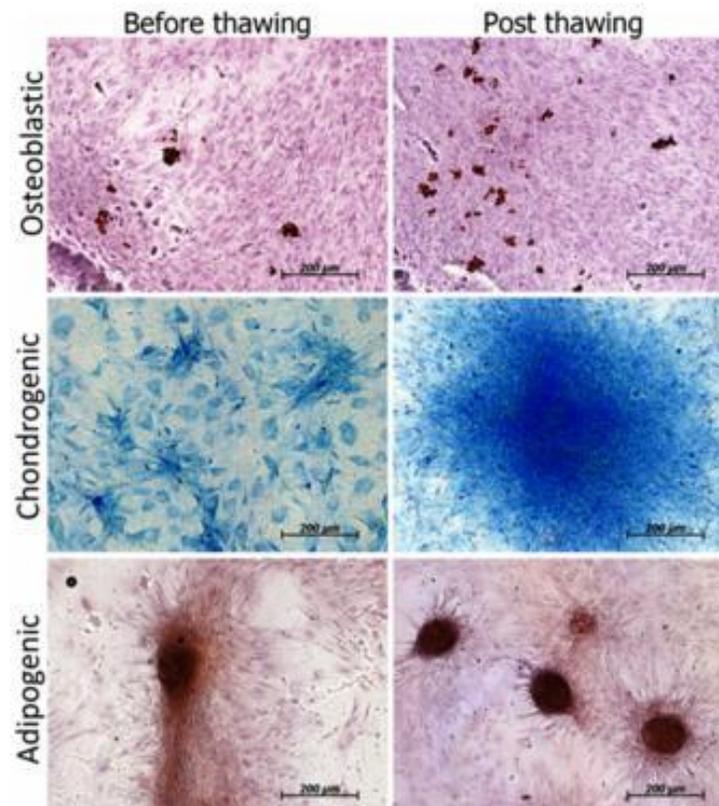


Fig. 6 In vitro differentiation of mobilized MSCs into mesenchymal tissues. Positive cells for alkaline phosphatase (osteoblasts, *first row*), Alcian blue positive staining for cartilage differentiation (*middle row*) and oil red O for adipocyte differentiation (*last row*)

administered, with a mean of $19.6 \times 10^6 \pm 0.76 \times 10^6$ mononuclear cells after separation of the concentration gradient with the Ficoll, and a mean of $8.2 \times 10^6 \pm 0.58 \times 10^6$ CD90+ cells isolated from mononuclear cells by means of magnetic pearls.

Crystal violet staining of CD90+ cells after thawing is shown in Fig. 1, with an established duplication time for MPB-isolated CD90+ cells of 47.59 h (Fig. 2).

Immunophenotype for cells on the day CD90+ cells were isolated was as follows: CD14 5.53 ± 0.86 %; CD90 42.52 ± 0.95 %; CD105 12.08 ± 0.58 % and CD166 8.57 ± 0.86 %. At day 15 under culture, immunotypes were the following:

CD14 0.87 ± 0.66 %; CD90 92.92 ± 1.29 %; CD105 0.70 ± 0.31 %, and CD166 4.20 ± 1.25 %. Comparisons with the Mann–Whitney *U* test among cell surface marker readings on the first day and on day 15, were statistically significant for the increase in the percentage of markers for CD90 mesenchymal cells, while the opposite occurred for the CD14 monocyte marker and for the markers of mesenchymal cells CD105 and CD166 (Fig. 3). Characterization by immunofluorescence of surface markers for CD14, CD90, CD105 and CD166 is shown in Fig. 4, where at 15 days of culture in vitro after thawing, the expression of these markers is retained in the cells. Figure 5 shows histograms for each of the markers overlaid

with the control isotypes. In vitro differentiation of mobilized MSCs into mesenchymal tissues after 15 days showed differentiation towards 3 lineages: osteoblastic, chondrogenic and adipogenic, positive for their corresponding staining techniques (Fig. 6).

Discussion

This study describes for the first time isolation and characterization in vitro of CD90+ MSCs from Mobilized peripheral blood (MPB) in sheep. Our results show isolation is viable for the population of CD90+ MSCs cells, as well as their expansion in vitro after thawing.

The sheep is an ideal model for biomedical research; it has been proposed as an animal model for a broad gamma of applications, such as tissue engineering, study of respiratory diseases, cardiomyopathies, neurological disorders, and prion diseases (Lyahyai et al. 2012). Studies have been conducted in the field of tissue engineering for MSCs obtained from BM in sheep (Lacitignola et al. 2014; Weber et al. 2011). However, MSCs isolation and characterization in MPB in sheep has been sparsely studied (Juthier et al. 2006), and the majority of what has been described in the literature has been focused on the obtaining and characterization of hematopoietic stem cells (Almeida-Porada et al. 2007; Porada et al. 2008). Isolation of MSCs in MPB had been previously reported in a variety of mammalian species including pigs (Harn et al. 2013), rabbits (Fu et al. 2014), dogs (Thomasson et al. 2003), mice (Lee et al. 2014), rats (Deng et al. 2014), and humans (Kang et al. 2014).

Due to the fact that collection of peripheral blood is a less invasive procedure than a BM biopsy, currently considered the best source of MSCs (Bieback et al. 2008), the mobilization of MSCs of BM to peripheral blood through the employment of G-CSF would represent a significant advantage for patients in the design of future clinical applications, such as autologous transplantation of chondrocytes (Ibarra et al. 2014). Our group, through characterization of a MSCs population (CD90+) in sheep, sought to establish the foundation for future projects of cellular differentiation to tissues of interest such as cartilage. As a result of this project, we standardized the separation techniques with MACS for CD90+ cells, its immunophenotype by FC, and duplication time and optimal

conditions for CD90+ cell propagation under in vitro culture after 2 months of cryopreservation in liquid nitrogen at -196°C . We believe this population of CD90+ cells can be considered a source of MSCs for experimental tissue-repair models in the future.

Conclusion

Isolation and in vitro characterization of CD90+ MSCs from mobilized peripheral blood in sheep is feasible. Our results show isolation is viable for the population of CD90+ MSCs cells, as well as their expansion in vitro after thawing. This population of CD90+ cells could be considered a source of MSCs for experimental tissue-repair models, with considerable clinical applications in the near future.

Acknowledgments This work is supported by the Mexican National Council of Science and Technology (CONACyT, Mexico City, Mexico) Grants SALUD-2011-1-162387, PDCPN-2013-01-215138 and PDCPN-2013-01-216779; Technology, Science and Innovation Secretary (SECTI, Mexico City, Mexico) Grants SECTI 079 BIS/2013 and SECTI/INR/GOB-25/2013.

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

- Almeida-Porada G, Porada C, Gupta N, Torabi A, Thain D, Zanjani ED (2007) The human–sheep chimeras as a model for human stem cell mobilization and evaluation of hematopoietic grafts' potential. *Exp Hematol* 35:1594–1600
- Bieback K, Kern S, Kocaomer A, Ferlik K, Bugert P (2008) Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 18:S71–S76
- Chao NJ, Schriber JR, Grimes K, Long GD, Negrin RS, Raimondi CM, Horning SJ, Brown SL, Miller L, Blume KG (1993) Granulocyte colony-stimulating factor "mobilized" peripheral blood progenitor cells accelerate granulocyte

- and platelet recovery after high-dose chemotherapy. *Blood* 81:2031–2035
- Deng L, Shi B, Zhuang Y, Chu J, Shi X, Zhang S, Guo M (2014) Performance and mechanism of neuroleukin in the growth and survival of sertoli cell-induced neurons in a coculture system. *Cell Transpl* 23:381–394
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach L, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317
- Fu W-L, Zhou C-Y, Yu J-K (2014) A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med* 42:592–601
- Han H-J, Huang M-H, Huang C-T, Lin P-C, Yen S-Y, Chou Y-W, Ho T-J, Chu H-Y, Chiou T-W, Lin S-Z (2013) Rejuvenation of aged pig facial skin by transplanting allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-induced peripheral blood stem cells from a young pig. *Cell Transplant* 22:755–765
- Hogman RK, DiPersio JF (2014) Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev* 28:31–40
- Ibarra C, Izaguirre A, Villalobos E, Masri M, Lombardero G, Martinez V, Velasquillo C, Meza AO, Guevara V, Ibarra LG (2014) Follow-up of a new arthroscopic technique for implantation of matrix-encapsulated autologous chondrocytes in the knee. *Arthroscopy* 30:715–723
- Jin P, Wang E, Ren J, Childs R, Shin JW, Khoo H, Marincola FM, Srnccek DF (2008) Differentiation of two types of mobilized peripheral blood stem cells by microRNA and cDNA expression analysis. *J Transl Med* 6:39
- Juthier F, Vincentelli A, Gaudric J, Corseaux D, Fouquet O, Calet C, Le Tourneau T, Soenen V, Zawadzki C, Fabre O, Susen S, Prat A, Jude B (2006) Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 131:843–852
- Kang J, Hur J, Kang J-A, Yun J-Y, Choi J-L, Ko SB, Lee C-S, Lee J, Han J-K, Kim HK, Kim H-S (2014) Activated platelet supernatant can augment the angiogenic potential of human peripheral blood stem cells mobilized from bone marrow by G-CSF. *J Mol Cell Cardiol* 75:64–75
- Kueng W, Silber E, Eppenberger U (1989) Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182:16–19
- Lacitignola L, Staffieri F, Rossi G, Francioso E, Crovace A (2014) Survival of bone marrow mesenchymal stem cells labelled with red fluorescent protein in an ovine model of collagenase-induced tendinitis. *Vet Comp Orthop Traumatol* 27:204–209
- Lee H, Che J-H, Oh JE, Chung SS, Jung HS, Park KS (2014) Bone marrow stem/progenitor cell mobilization in C57BL/6J and BALB/c mice. *Lab Anim Res* 30:14–20
- Lyahyai J, Mediano DR, Ranera B, Sanz A, Remacha AR, Bolea R, Zaragoza P, Rodellar C, Martin-Burriel I (2012) Isolation and characterization of ovine mesenchymal stem cells derived from peripheral blood. *BMC Vet Res* 8:169
- McCarthy RC, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK, Xian CJ (2009) Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 219:324–333
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–147
- Porada CD, Harrison-Findik DD, Sanada C, Valiente V, Thain D, Simmons PJ, Almeida-Porada G, Zanjani ED (2008) Development and characterization of a novel CD34 monoclonal antibody that identifies sheep hematopoietic stem/progenitor cells. *Exp Hematol* 36:1739–1749
- Rammal H, Beroud J, Gentils M, Labrude P, Menu P, Kerdjoudj H, Velot E (2013) Reversing charges or how to improve Wharton's jelly mesenchymal stem cells culture on polyelectrolyte multilayer films. *Biomed Mater Eng* 23:299–309
- Sahin AO, Buitenhuis M (2012) Molecular mechanisms underlying adhesion and migration of hematopoietic stem cells. *Cell Adhes Migr* 6:39–48
- Salvucci O, Jiang K, Gasperini P, Maric D, Zhu J, Sakakibara S, Espigol-Frigole G, Wang S, Tosato G (2012) MicroRNA126 contributes to granulocyte colony-stimulating factor-induced hematopoietic progenitor cell mobilization by reducing the expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Haematologica* 97:818–826
- Schmitz N, Beksac M, Bacigalupo A, Ruutu T, Nagler A, Gluckman E, Russell N, Apperley J, Szern J, Bradstock K, Buzyn A, Schlegelberger B, Matcham J, Gratwohl A (2005) Filgrastim-mobilized peripheral blood progenitor cells versus bone marrow transplantation for treating leukemia: 3-year results from the EBMT randomized trial. *Haematologica* 90:643–648
- Sousa BR, Parreira RC, Fonseca EA, Amaya MJ, Tonelli FMP, Lacerda SMSN, Lalwani P, Santos AK, Gomes KN, Ulrich H, Kihara AH, Resende RR (2014) Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytom A* 85:43–77
- Thomasson B, Peterson L, Thompson J, Goerner M, Kiem H-P (2003) Direct comparison of steady-state marrow, primed marrow, and mobilized peripheral blood for transduction of hematopoietic stem cells in dogs. *Hum Gene Ther* 14:1683–1686
- Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L (2005) Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells* 23:1105–1112
- Villa-Diaz LG, Brown SE, Liu Y, Ross AM, Lahann J, Parent JM, Krebsbach PH (2012) Derivation of mesenchymal stem cells from human induced pluripotent stem cells cultured on synthetic substrates. *Stem Cells* 30:1174–1181
- Weber B, Zeisberger SM, Hoerstrup SP (2011) Prenatally harvested cells for cardiovascular tissue engineering: fabrication of autologous implants prior to birth. *Placenta* 32(Suppl 4):S316–S319