



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

Estudio acerca de los factores que promueven la condrogénesis en cultivos *in vitro* de células troncales mesenquimales.

Tesis

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

ERIKA IVETTE CAMACHO ANTELO

Tutor:

JOSÉ CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN - INR LGII

Comité tutor:

MARÍA MASRI DABA – FMVZ UNAM

SANTIAGO RENÉ ANSALDÚA ARCE - FMVZ UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX.

SEPTIEMBRE 2017



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

Al Dr. José Clemente Ibarra Ponce de León por su confianza y ayuda.

A los Doctores María Masri Daba y Santiago René Anzaldúa Arce Gracias por sus aportaciones como miembros de mi comité tutorial en este proyecto, además de su gran amor por la ciencia.

A mi amigo Dr. Ricardo Gómez García, por creer en mí y su apoyo incondicional.

A todo el equipo que conforma el laboratorio de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación.

A los miembros del jurado y revisores de este trabajo de tesis: Dra. Rosa Eugenia Soriano Rosales, Dra. Maria Masri Daba, Dr. Clemente Ibarra Ponce de León, Dr. Germán Lombardero Goldaracena, Dr. Eric Hazan Lasri; por sus valiosas aportaciones.

DEDICATORIA

Dios, tu amor y bondad son infinitas, me has permitido sonreír ante todos mis logros que han sido el resultado de tú ayuda porque cada vez que caigo la vida me pone a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que los has puesto para mí, para que aprenda y mejore como ser humano.

Este trabajo de tesis ha sido una bendición en todos sentidos, y es sin duda producto del valor y dedicación que mis padres han puesto en mí, por tal dedico este trabajo a ellos Evelia Antelo Valenzuela y Elias Camacho Apodaca que siempre lucharon por mi bienestar, mi educación y mi salud. No conozco a nadie en este mundo a quienes deba más amor y agradecimiento. Gracias papá por ser mi ejemplo de orden, disciplina y constancia y gracias mamá por ser mi fortaleza e inspiración diaria.

De igual manera...

Gracias a mis tres hermanos Jesús Manuel Camacho Antelo, José Elias Camacho Antelo y Ricardo A. Camacho Antelo por apoyarme en cada decisión y proyecto y sobre todo por creer en mí.

Y finalmente...

Gracias a la vida por mostrarme lo justa que puede llegar a ser.

RESUMEN

La reparación de lesiones de cartílago forma parte del trabajo activo de científicos y médicos de todo el mundo, ya que los daños provocan cambios en el microambiente, destrucción de matriz extracelular e incapacidad de regeneración; la Ingeniería tisular es la ciencia que utiliza células vivas, andamios y factores de crecimiento en la reparación de cartílago dañado. A pesar del potencial enorme de aplicación en el restablecimiento de la función de órganos y tejidos, sigue siendo difícil la producción de cartílago, por lo tanto el presente estudio buscó obtener células cartilaginosas a partir de células troncales mesenquimales (CTM) de médula ósea equina, utilizando sobrenadantes de células alimentadoras (condrocitos equinos). Metodología: los sobrenadantes y las CTM se obtuvieron a partir de cartílago articular y médula ósea de caballo respectivamente. Se recolectó el sobrenadante de los condrocitos y después se utilizó para diferenciar las CTM en cultivo, en distintos tiempos y condiciones de cultivo se evaluó el crecimiento y diferenciación celular; por observación general en el microscopio invertido, exámenes histológicos y mediante un programa de cómputo que analizó las imágenes brindando datos numéricos para la realización de un estudio estadístico. La expresión de marcadores condrogénicos como sox 9, colágena II y agregano fueron evaluados en los cultivos en diferenciación con sobrenadantes. Resultados: el crecimiento y diferenciación celular fue mejor con el tratamiento 50 % medio base (MB) y 50% medio condicionado (MC), ($p < 0.05$) la expresión de marcadores condrales se observó en las células cultivadas con los sobrenadantes y no, en las células control. Conclusión: es posible realizar cultivos condrales de manera satisfactoria utilizando factores de crecimiento y nutrientes provenientes de células alimentadoras.

PALABRAS CLAVE

Ingeniería de tejidos, células troncales mesenquimales, medio condicionado, factores de crecimiento, condrocitos.

ABSTRACT

Repair of cartilage lesions is part of the active work of scientists and physicians around the world, as the damage cause changes in the microenvironment, the destruction of the extracellular matrix and the inability of regeneration; Tissue engineering is the science that uses living cells, scaffolds and growth factors to repair damaged cartilage. Despite the enormous potential for application in restoring organ and tissue function, cartilage production remains difficult, the present study sought to obtain cartilage cells from equine bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs), using supernatants from feeder cells (equine chondrocytes). Methodology: Supernatants and MSCs were obtained from articular cartilage and bone marrow of horses respectively. The supernatant of the chondrocytes was collected and then used to differentiate the MSCs in culture, at different times and conditions of culture cell growth and differentiation was evaluated; by general observation in the inverted microscope, histological examinations and by means of a software that analyzed the images providing numerical data for the accomplishment of a statistical study. Expression of chondrogenic markers such as sox 9, collagen II and aggrecan were evaluated in cultures in differentiation with supernatants. Results: Cell growth and differentiation was better with 50% (middle base) treatment and 50% (conditioned medium) ($p < 0.05$), the expression of chondral markers was observed in cells cultured with supernatants and not in control cells. Conclusion: It is possible to perform chondral cultures satisfactorily using growth factors and nutrients from feeder cells.

KEY WORDS

Tissue Engineering, Mesenchymal Stem Cells, Conditioned Medium, Growth Factors, Chondrocytes.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

- I. INTRODUCCIÓN
- II. ANTECEDENTES
- III. REVISIÓN LITERARIA
- IV. HIPÓTESIS
- V. OBJETIVOS
- VI. MATERIALES Y MÉTODOS
- VII. RESULTADOS
- VIII. DISCUSIÓN
- IX. CONCLUSIONES
- X. BIBLIOGRAFÍA
- XI. ANEXOS

ABREVIATURAS

AGR Agrecano.

BMP-7 Proteína morfogénica ósea 7.

°C Grados centígrados.

CA Células alimentadoras.

CT Células troncales.

CTM Células troncales mesenquimales.

CEM Células estromales mesenquimales.

COL II Colágena II.

DMEM Medio de Eagle modificado por Dulbecco.

FITC Isotiosanato de fluoresceína o fluoresceína -5- isotiocinato.

GDF-5 Factor de crecimiento/diferenciación 5.

h Horas

IF Inmunofluorescencia.

MB Medio de cultivo base.

MEC Matriz extra celular

MC Medio condicionado.

mL Mililitros

MO Médula ósea.

PBS Solución amortiguadora de fosfatos.

PFA Paraformaldehido

SFB Suero fetal bovino.

SOX 9 Factor transcripcional 9.

TGF β Factor de Crecimiento Transformante Beta.

TGF- β 3 Factor de Crecimiento Transformante Beta 3.

μ g Micro gramos.

μ M Micro molar.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cultivo de condrocitos equinos aisladas por digestión enzimática de tres biopsias de cartílago articular.

Figura 2. Aspirado de médula ósea de equinos (a), tratamiento con Ficoll Paque™ (b).

Figura 3. (a) Caja de cultivo de 24 pozos que contiene las CTM que serán tratadas con seis distintos tratamientos en una mezcla de MB y MC para probar su diferenciación a células condrales. (b) Medio condicionado procedente de las células alimentadoras (condrocitos en cultivo), filtrado y listo para su uso.

Figura 4. Fotografía de los condrocitos a los 7 días de cultivo. 10x

Figura 5. Fotografía de los condrocitos a los 14 días de cultivo. 10x.

Figura 6. Cultivo de células obtenidas por punción directa, a los 7 días de cultivo 10x.

Figura 7. Desarrollo de las células trocales mesenquimales *in vitro*. El fenotipo de las células se observa fibroblastoide.

Figura 8. Caracterización de células mononucleares. Estas células deben de mostrar menos del 2 % de población para CD14, CD34 y CD45.

Figura 9. Caracterización de células mononucleares. Expresión positiva de marcadores CD73, CD90 y CD105 antígenos específicos de CTM

Figura 10. Células teñidas mediante la técnica de azul-alciano el cual tiene afinidad por los componentes de la MCE condral.

Figura 11. Diferenciación celular de CTM a adipocitos por medio de factores de crecimiento recombinantes, se observan los depósitos de grasa tenidos de rojo.

Figura 12. Detección positiva de Sox 9 en células diferenciadas a cartílago.

Figura 13. Localización de colágena tipo II en células condrales.

Figura 14. . Presencia de agrecano en cultivo de células diferenciadas a condrocitos.

Figura 15. Tinciones con azul Alciano en los distintos porcentajes en tratamientos que se aplicaron a las CTM.

Figura 16. Tinciones con Safranina O en los distintos porcentajes en tratamientos que se aplicaron a las CTM.

Figura 17. Análisis de Inmunohistoquímica donde se muestra la presencia de marcadores condrales en los cultivos generados a partir de Medio Condicionado comparados con los controles positivos y negativos de cada experimento.

Figura 18. Inmunofluorescencia, se estableció la presencia de los marcadores de tejido condral sox 9, agrecano y colágena II para los tratamientos 100% MB-0%MC y 70%MB-30%MC.

Figura 19. Inmunofluorescencia, se estableció la presencia de los marcadores de tejido condral sox 9, agrecano y colágena II para los tratamientos 60% MB-40%MC y 50%MB-50%MC.

Figura 20. Inmunofluorescencia, se estableció la presencia de los marcadores de tejido condral sox 9, agrecano y colágena II para los tratamientos 30% MB-70%MC y 0%MB-100%MC.

Figura 21. Evaluación de las fotografías de las tinciones azul alciano y safranina O de cultivos condrales llevados a este estadio con diferentes porcentajes de medio base y medio condicionado.

Figura 22. Fotografías evaluadas de las tinciones azul Alciano y safranina O de cultivos condrales llevados a este estadio con diferentes porcentajes de medio base y medio condicionado.

Figura 23. Gráficas que muestran las medias grupales de los distintos tratamientos aplicados a las células troncales mesenquimales, (a) tinción de azul alciano, (b) tinción safranina O.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distintos tratamientos utilizados en la diferenciación y crecimiento de las CTM. Mediante la combinación de MC y SFB.

Tabla 2. Análisis de varianza en el cual se comparan las medias para encontrar diferencias entre los distintos grupos (tratamientos) de estudio. Incluyendo la información aportada por la varianza dentro y entre grupos. Ocupando 29 grados de libertad, obteniendo un valor de $p= 1.23 \times 10^{-13}$ que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Tabla 3. Organización de los grupos lograda mediante el análisis de Tukey, los mejores tratamientos son el 100% MB-0% MC y 50% MB-50% MC.

Tabla 4. Análisis de varianza en el cual se comparan las medias para encontrar diferencias entre los distintos grupos (tratamientos) de estudio. Incluyendo la información aportada por la varianza dentro y entre grupos. Ocupando 29 grados de libertad obteniendo una $p= 2.45 \times 10^{-7}$ que indica que existen evidencias estadísticas para afirmar que las diferencias son significativas entre los tratamientos.

Tabla 5. Organización de los grupos lograda mediante el análisis de Tukey, los mejores tratamiento son el 100 % MB-0% MC, 70% MB-30% MC, 60 % MB-40% MC y 50% MB-50% MC, pues con estos estadísticamente hablando se obtiene el mismo rendimiento, sin embargo, por conveniencia se elegiría el tratamiento con proporción 50% MB-50% MC.

I. INTRODUCCIÓN

Las lesiones de cartílago articular producen cambios del microambiente, destrucción de la matriz condral e incapacidad de regeneración, son y han sido un asunto difícil de enfrentar para la medicina regenerativa del aparato locomotor ya que este tipo de tejido cuenta con poca capacidad de reparación intrínseca;(Schminke et al. 2014; Steinert et al. 2012) a falta de tratamientos exitosos se han propuesto nuevas técnicas en ingeniería de tejidos que combinan células condrogénicas, materiales de andamiaje y factores de crecimiento que proporcionen el ambiente idóneo para el desarrollo celular (Vinatier et al. 2009).

El estudio *in vitro* de las células troncales mesenquimales (CTM) incluye la búsqueda de los tejidos que las proporcionan y la caracterización molecular de estas; son prioridad de estudio la proliferación celular con el objetivo de alcanzar un número alto de células para su uso en tratamientos, de igual forma es importante definir el fenotipo que exhiben las células mediante diferentes marcadores de superficie para así seleccionarlas de entre una población celular y por último se tiene que probar que estas células tienen capacidad de diferenciarse en linajes derivados de mesodermo porque esta característica podría ser esencial en la regeneración de los tejidos perjudicados (Arevalo et al., 2007; Steinert et al., 2012).

De igual relevancia es que debido a su característica de inmadurez, representan una opción innovadora ya que no originan respuesta inflamatoria al utilizarse en alotransplantes (Bianco et al., 2008).

Al establecer cuáles son las condiciones de cultivo adecuadas durante la expansión celular se favorece y fortalece las propiedades que benefician a estas células antes de su uso en terapia celular, la regulación condrogénica y la producción de matriz extracelular involucran una gran variedad de factores intrínsecos derivados de la célula y factores paracrinos provenientes de células vecinas como osteoblastos (Schminke et al., 2014). Para los investigadores que trabajan con este tipo de células existe un interés mayor por encontrar las condiciones óptimas del medio de cultivo. Cuando las células implican una manipulación mínima el medio de cultivo estándar contiene Suero Fetal Bovino (SFB), el cual puede ser fuente de posible contaminación por Priones, Virus y Zoonosis, para minimizar el riesgo de transmisión de

enfermedades las líneas celulares han sido cultivadas bajo otras condiciones como medio condicionado obtenido a partir de Células alimentadoras (CA) que liberan nutrientes al medio, componentes de sueros recombinantes, plasma o suero autólogo o condiciones libres de suero (Van der Valk et al., 2017). En este estudio se espera obtener un sistema de cultivo de CTM en el cual estas se encuentren lo más exentas del uso de suplementos de origen animal.

La detección de moléculas que puedan ayudar en la expansión de células troncales *in vitro* a distintos linajes es un aspecto importante en la investigación de estas células ya que esto permite que se conserven sus características funcionales (Manello et al., 2007; Xu et al., 2013).

Finalmente para este trabajo se utilizó como modelo experimental el caballo que además de poder ser un paciente, es un modelo animal para el estudio de lesiones en tendones, ligamentos y rodilla debido a la similitud de las lesiones con la de los atletas humanos, de igual forma la naturaleza del cartílago articular; composición molecular y grosor son muy semejantes a la humana (Pineda 2011; Ranera 2012) y por último es viable la posibilidad de realizar procedimientos de rehabilitación en equinos tras la aplicación de terapia, procedimientos que son imposibles en animales modelo de otras especies.

Por estas razones es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamientos que les devuelvan tanto a estos animales como a humanos la capacidad de regenerar tejidos lesionados, reintegrando su funcionalidad y propiedades normales.

II. ANTECEDENTES

Fue a partir de la década de 1950 que se llevó a cabo el descubrimiento de las células troncales mesenquimales (CTM), A. Friedestein y M. Owen y colaboradores fueron los primeros en utilizar in vitro CTM para trasplante en animales de laboratorio, así mismo el primer reporte de aislamiento en equinos es de 1998 por los doctores Fortier LA, Nixon AJ., en el cual se separaron a partir de médula ósea y cultivaron en monocapa para evaluar el contenido de algunos componentes de la matriz extracelular (MEC). Por otra parte, la complejidad del entorno proporcionado por las células alimentadoras (CA) y algunas de las diferencias básicas en el mecanismo de renovación y pluripotencia entre células troncales se pone en manifiesto en los estudios sobre los factores de crecimiento utilizados en los cultivos desde 1975.

Actualmente, es más frecuente la sustitución del suero fetal bovino (SFB), por matriz extracelular preparada a partir de fibroblastos de ratones embrionarios, el uso de factores de crecimiento provenientes de medios condicionados, medios de cultivo sin sueros (serum-free) y medios sin componentes xenobióticos (xeno-free) lo que proporciona sistemas de cultivos más limpios (sistemas feeder-free).

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Ingeniería de Tejidos

La Ingeniería de tejidos es aquella disciplina que tiene sus cimientos en distintas áreas de la ciencia; cuyo motivo fundamental es la manipulación de células vivas y su entorno extracelular, además de producir sustitutos biológicos y su próxima implantación (Falke et al., 2000; Nieto et al., 2010; Vinatier et al., 2009).

En primera instancia la Ingeniería tisular se forma por la unión de los conocimientos, práctica y destreza en Biología celular, Bioquímica y Biología molecular, aunado a la instrucción terapéutica humana proporcionada por médicos y cirujanos (Vinatier et al., 2009).

Al día de hoy científicos de diversas partes del mundo y en diferentes áreas se encuentran trabajando activamente en sus laboratorios en la realización de nuevas técnicas y protocolos que posibilite a los médicos aumentar, sostener y restaurar la función de un órgano o tejido (Falke et al., 2000).

En la lucha por la obtención de resultados y el mejoramiento en estos problemas de salud se han implementado cuatro procesos básicos: trasplantes, injertos, prótesis y regeneración celular (Falke et al., 2000).

Otro elemento fundamental de la Ingeniería de tejidos es la MEC la cual no solo sirve de soporte a los tejidos; se trata de un sistema dinámico de moléculas, único para cada tejido, en el cual interactúan glucoproteínas, glicosaminoglicanos, colágena, proteoglicanos, elastina, fibrina, además de factores de crecimiento, citoquinas y múltiples enzimas; de esta interacción molecular depende en gran medida la migración, proliferación, forma, diferenciación, metabolismo y muerte celular.

Así la Ingeniería tisular se topa con tres necesidades básicas al momento de realizar sustitutos biológicos: la primera es eludir la respuesta inmunológica de inflamación o rechazo, las cuales se ha visto disminuida con el tratamiento con células troncales. La segunda será crear el sustrato ideal para que las células puedan sobrevivir, desarrollarse y diferenciarse en el tejido deseado, se ha comprobado que los sustratos que contienen componentes propios de la MEC son los que han mostrado mejores resultados. Y por último dotar, de un medio ambiente adecuado donde el tejido de

neoformación pueda desarrollarse y funcionar de la misma manera que lo hace el tejido nativo.

Se tiene conocimiento de que en su entorno natural las células crecen de manera tridimensional en los tejidos, en el caso del cartílago los condrocitos se encuentran rodeados de una abundante MEC, la cual a su vez es compuesta por una equipada red de moléculas, sin embargo, al encontrarse en cultivo bidimensional estos pierden ese fenotipo característico (Martinez 2012; Vinatier et al., 2009).

Durante el proceso de diferenciación también sufren un cambio hacia un fenotipo tipo fibroblastoide caracterizado por el aumento en la formación de colágena tipo I, no obstante se sabe que este proceso puede ser reversible porque los condrocitos al reubicarse en un entorno tridimensional recuperan su fenotipo inicial (Vinatier et al., 2009).

Esta observación reafirma que contar con un entorno tridimensional es factor fundamental en la restauración del fenotipo condral. Para ese fin son utilizados diversos biomateriales que funcionan como andamios y promueven la diferenciación condrogénica, estos pueden clasificarse en: Naturales y Sintéticos (Falke et al., 2000; Nieto et al., 2010).

Para uso clínico los biomateriales formados principalmente por proteínas como colágena tipo I y III son los más utilizados con condrocitos autólogos, ejemplos de estos son: MACI I (Verigen, Leverkusen, Alemania), Maix1 (Matricel, Hezzenrath, Alemania) y Condro-gide1 (Geistlich Biomateriales, Wolhusen, Suiza). Atelocollagen1 (Koken Co. Ltd, Tokio, Japón) este último es un gel de colágeno que permite el cultivo tridimensional de condrocitos y su próxima implantación en humanos (Vinatier et al., 2009).

Por otra parte, tenemos aquellos biomateriales hechos a base de polisacáridos entre los cuales están: yalograft1 C, el cual es utilizado en Ingeniería de tejidos con condrocitos autólogos los cuales se asocian a la MEC sintética del polímero hecha a base de ácido hialurónico denominada HYAFF- 111 (Fidia avanzada Biopolímeros, Abano Terme, Italia), otros ejemplos son Bio-seed1-C (BioTissue Technologies, Freiburg, Alemania) es un andamio poroso hecho de ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y polidioxanona (Vinatier et al., 2009). A pesar de que los avances han sido muy buenos en cuestión de biomateriales en el siguiente paso que es la

implantación en los pacientes surge un problema, todos requieren de una intervención quirúrgica para ser aplicados en la lesión que se requiere rehabilitar, para solucionar este problema se busca desarrollar también biomateriales inyectables que son mucho menos invasivos, estos hidrogeles se componen de un polímero viscoso hecho con macromoléculas hidrofílicas sintéticas o naturales, sin embargo, aún se trata de un reto para los investigadores (Martinez et al., 2012; Vinatier 2009).

Los elementos funcionales de la Ingeniería de tejidos y Medicina regenerativa son las llamadas células troncales (CT), la utilización de estas terapias representa varios retos como la identificación de una fuente celular adecuada, el desarrollo y mejoramiento de los métodos tanto de obtención como de expansión, y un control de calidad eficiente y seguro. Hasta el día de hoy se conoce que las células embrionarias o células pluripotentes ofrecen una potencial oportunidad para la diferenciación de todos los linajes celulares, sin embargo su verdadero potencial solo se explotará a través del esfuerzo continuo de la comunidad científica en todos sus niveles, unificando métodos y prestando suma atención en los problemas de seguridad, en el control de calidad que representa su proliferación y diferenciación.

3.2 Células troncales mesenquimales

En los últimos años hemos tenido oportunidad de revisar publicaciones cuyas protagonistas principales son las llamadas CTM, sin embargo, aún queda un poco de duda sobre las características de auto renovación y pluripotencialidad de estas células. El concepto de células mesenquimales tuvo su origen a finales del siglo XIX como principio básico de auto renovación que tienen algunos tejidos como la piel, sangre entre otros, posteriormente como en toda investigación se requirió de bioensayos rigurosos en los cuales se pudiera comprobar que realmente estas células tiene troncalidad y capacidad de regeneración poniéndolas a prueba en evaluaciones después de ser trasplantadas como lo demostraron Friedenstein y col., experimentando con médula ósea, al sembrarla y obtener pequeñas colonias (Unidades Formadoras de Colonias Fibroblastoides CFU-Fs);(Bianco et al., 2008). *In vivo* el trasplante llevó al reconocimiento de varios tejidos como hueso, cartílago, tejido adiposo y fibroso, estos podrían ser elaborados en el laboratorio por la progenie de

una sola célula del estroma de médula ósea, a la cual se le denominó célula madre osteogénica o célula madre estromal. (Arevalo et al., 2007; Dominici et al., 2006). Estos descubrimientos fueron en principio apreciados únicamente por áreas como la hematología pero poco después adquirieron mayor relevancia (Zinkl et al., 1994). Posteriormente con otras investigaciones se confirmó que existía otro tipo de células no hematopoyéticas en médula ósea, entonces, existía la posibilidad de tener a la mano células humanas posnatales con un potencial de diferenciación amplio quizá igual al de las células embrionarias (Arevalo et al., 2007; Zinkl et al., 1994). Aunque está claramente definido el potencial de diferenciación que estas células presentan, también se sabe que se limita a ciertos tejidos músculo esqueléticos encontrados en diferentes etapas del desarrollo y espacios anatómicos específicos; estas incluyen osteoblastos (hueso), condrocitos (cartílago), fibroblastos (periostio), entre otros. (Arevalo et al., 2007; Bianco et al., 2008; Dominici et al., 2006).

3.3 Células mesenquimales a tejido condral

El cartílago articular es un tejido muy especializado cuya función principal es impedir el daño articular por carga mecánica generada por el movimiento, debido a que disminuye la fricción, también es resistente a la tensión y a la compresión además de tener una gran capacidad de adaptarse a situaciones cambiantes en su microambiente (Alvarez et al., 2002; Campos 2002; Martinez 2012); esta situación se debe a que está constituido básicamente por agua (60 % de su peso) y por una matriz formada por proteoglicanos y fibras de colágena tipo II , sintetizado por su celulas residentes; los condrocitos (Alvarez et al., 2002; Chevalier et al., 2005). Este tejido se encuentra aislado de los demás por la membrana sinovial que es impermeable al paso de macromoléculas pero permite la difusión de nutrientes y oxígeno (Alvarez eta al., 2002). La poca capacidad de regeneración de cartílago articular no puede revertir su destrucción, la cual es encadenada por una respuesta inflamatoria de la sinovia que contiene linfoquinas o su análogo catabolina, que produce un incremento de proteoglicanasas y colagenasa latente, cuando ocurre esta inflamación a esto se le conoce como Osteoartritis y durante este proceso el balance entre la síntesis y

degradación de la MEC del cartílago articular es alterado (Campos 2002; Leyh et al., 2014).

Las investigaciones básicas realizadas en los últimos años sobre células troncales y sus posibilidades terapéuticas han brindado la posibilidad de tratar enfermedades desde otro enfoque, es así como se han observado mejores resultados en la aplicaciones de CTM como terapia en este tipo de desórdenes (Martinez 2012); se trata de células estromales no hematopoyéticas que fueron aisladas en primera instancia de médula ósea y después de otras zonas como tejidos conectivos, tejido adiposo, pulpa dental, entre otros; estas se caracterizan por tener tres propiedades: auto renovación, proliferación y capacidad de diferenciación a múltiples linajes celulares como hueso y cartílago, pero ahora se ha demostrado que aún conservan su plasticidad y se pueden diferenciar también a otros tipos celulares no mesenquimatosos como neuronas (Dominici et al., 2006; Martinez 2012).

En el proceso de morfogénesis de las articulaciones y diferenciación de cartílago, cada elemento esquelético es constituido a partir de la incorporación de CTM; formando condensaciones precartilaginosas, en ese momento, los condrocitos tienden a proliferar y diferenciarse, asimismo, ocurre el reemplazo de cartílago por hueso, es decir, la osificación endocondral otorgando rigidez al esqueleto (Garcíadiego et. al., 2015; Ibarra et. al., 2007; Velasquillo et. al. 2007).

En la antesala del desarrollo esquelético en un sitio específico de la condensación precartilaginosa llamado *interzona*, encontramos algunas células que se caracterizan por ser altamente condensadas y aplanadas además de estructurarse en tres capas las cuales pierden su fenotipo diferenciado y producen MEC rica en colágeno tipo I y III, distinto a la MEC del cartílago abundante en colágena II y agregano. A nivel molecular encontramos como primer elemento de la interzona al gen *Wnt9a* el cual inhibe la expresión de *Sox9* factor de transcripción implicado en la diferenciación condrogénica, como efecto se disminuye la expresión de colágena tipo II y se ven manifestadas algunas proteínas morfogénica de hueso (BMPs) y factor de crecimiento (GDF5), los cuales regulan el desarrollo de la articulación (Garcíadiego et. al., 2015; Ibarra et. al., 2007; Velasquillo et. al. 2007)

Al desaparecer la capa central de la interzona se da lugar a la cavidad articular mediante un proceso conocido como *cavitación*, mientras tanto la formación de

cartílago articular que cubre las superficies articulares de los huesos adyacentes responde a las señalizaciones de GDF5; en cuanto a la separación completa de los elementos esqueléticos posiblemente se facilite por la apoptosis celular consecuencia del aumento del hialuronato y su receptor CD44 y la disminución de la adhesión celular (Garcíadiego et. al., 2015; Ibarra et. al., 2007; Velasquillo et. al. 2007).

Las CTM son fáciles de cultivar y expandir *in vitro* mediante técnicas de cultivo celular, la gran ventaja de utilizarlas para terapias *in vivo* es que no plantea problemas éticos, han sido descritas como complejo mayor de histocompatibilidad I positivas (CMH I) y complejo mayor de histocompatibilidad II negativas (CMH II), además carecen de la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 lo que las hace no inmunogénicas (Dominici et al., 2006; Arevalo et al., 2007); al ser trasplantadas no es necesaria la inmunosupresión del huésped ya que se consideran también inmunoreguladoras (Arevalo et al., 2007; Bianco et al., 2008). El implante de células es estudiado para el tratamiento de distintas patologías: reparación del cartílago articular, hernias de disco, lesiones de la médula espinal, infarto de miocardio, entre otros (Arevalo et al., 2007).

El mecanismo de reparación propuesto para la regeneración del tejido por las CTM es el siguiente:

- 1.- Diferenciación de las células del tejido dañado.
- 2.- Emisión de señales desde el tejido lesionado que favorece el llamado a otras células troncales o progenitoras.
- 3.- Liberación de moléculas solubles con efectos autócrinos o parácrinos.
- 4.- Inhibición de la apoptosis.
- 5.- Incremento de la vascularización del tejido dañado (Arevalo et al., 2007; Bian et al., 2011;).

Se ha generado bastante información procedente de los avances experimentales en un tiempo relativamente corto, sin embargo, debe tenerse en cuenta que la Medicina regenerativa y en particular las terapias con CT es un tema que se encuentra en estos momentos en pleno desarrollo; a pesar de que las investigaciones son bastantes prometedoras, es necesario conocer más sobre los mecanismos moleculares que permiten su especialización a la par de la creación de nuevas tecnologías que posibiliten el aislamiento cada vez más puro y una manipulación más fácil *in vitro*

(Windt et al., 2014). Si bien aún falta mucho por experimentar y con los avances obtenidos se ha devuelto a muchas personas que sufren de enfermedades relacionadas a tejido condral la calidad de vida para poder sobrellevarlos mediante el uso principalmente de terapias celulares con CTM (Bianco et al., 2008; Windt et al., 2014).

3.4 Fuentes de células

Son los condrocitos las células responsables de secretar la MEC que da resistencia y estructura al tejido Condral, la fuente principal para uso de estas células es principalmente el cartílago articular, sin embargo, se han utilizado otras áreas anatómicas como el cartílago nasal resultado un origen celular prometedor (Álvarez et al., 2002; Campos 2002; Chevalier et al., 2005).

Si bien los condrocitos se han empleado ampliamente en la reparación de lesiones en cartílago: están sujetos a dos grandes inconvenientes: una es la inestabilidad al cultivarse en monocapa y la otra es la naturaleza misma del tejido del donador (Martinez 2012).

Actualmente se ha probado que las CTM son proveedoras considerables de materiales celulares para satisfacer las necesidades de la Ingeniería de cartílago debido a su alta disponibilidad y gran capacidad de expansión *in vitro* (Bian et al., 2011; Nieto 2010). Las CTM son aisladas principalmente de médula ósea o tejido adiposo y se caracterizan por su fácil adherencia al plástico, presentar fenotipo CD73+, CD90+ y CD105+, CD14-, CD19-, CD34-, CD45-, y su capacidad de diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos entre otros (Dominici et al., 2006).

Recientemente también se ha adjudicado a estas células el adjetivo de ser inmunoregulatoras pues han demostrado ser capaces de inhibir los mecanismos de defensa del huésped (Arevalo et al., 2007).

Las CTM también se han aislado de tejido adiposo, hígado, páncreas, dermis, músculo esquelético, membrana sinovial, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental; no obstante las fuentes principales o las más utilizadas son la MO, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo (Arevalo et al., 2007; Bianco et al., 2008). Solo el

0.03% de las células mononucleares de médula ósea son CTM, también existen algunas limitantes como el riesgo en la toma de muestra o la capacidad de diferenciación dependiendo de la edad del donador de MO (Arevalo et al., 2007; Bianco et al., 2008).

En cuanto a la obtención de CTM de cordón umbilical este procedimiento necesita cubrir puntos críticos para llevar a cabo una diferenciación óptima como lo son el tiempo de recolección, el tiempo de procesamiento el cual debe ser inferior a 16 h. así como el volumen recolectado debe ser igual o superior a 30 mL. (Dominici et al., 2006). De las CTM obtenidas a partir de tejido adiposo se puede decir que estas tienen un fenotipo y capacidad de diferenciación *in vitro* muy similar a las adquiridas de MO, estas muestran mayor capacidad de proliferación y se puede recurrir a éstas mediante cirugías como liposucción o abdominoplastías (Bianco et al., 2008; Pérez et al., 2006). También algunos autores han determinado que existen CTM circulando en torrente sanguíneo denominándolas CTM movilizadas de sangre periférica (Pérez et al., 2006).

3.5 Factores de crecimiento y factores físicos

Para los investigadores y médicos que trabajan con células embrionarias y otras células troncales resulta de suma importancia la identificación de las condiciones “óptimas” del medio de cultivo celular lo que proporciona un buen desarrollo de estas células y la comprensión de las vías de diferenciación; lo cual se ve reflejado en el mejoramiento terapéutico de estas (Manello et al., 2007; Stojkovic et al., 2005). Desde hace ya bastante tiempo se han estudiado un amplio número de factores de crecimiento que regulan la diferenciación celular tanto de CTM como de células condrogénicas, en este último caso los que han resultado mejores en la inducción de la condrogénesis son los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) dentro de estos están la BMP2, la BMP4 y el TGF β 1. Estudios realizados con condrocitos articulares humanos en donde se utilizó la combinación de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y TGF β 1 aumenta la proliferación y favorece la diferenciación condral, a diferencia de aquellos en los que se emplea BMP2 en condrocitos de periostio de rata resulta en la hipertrofia de los condrocitos. (Ibarra et al., 2007). Es importante también resaltar que en distintos

estudios las CTM provenientes de equinos expuestas a TGF β 1 impulsa la expresión de colágena II en cultivos de monocapa y a su vez estas células se diferencian en corto tiempo a condrocitos maduros. (Ibarra et al., 2007; Velasquillo et al., 2007).

En general se han establecidos reglas y protocolos para la utilización de CTM, su expansión y uso en trasplantes de tejidos degenerados o heridos, ya que la posible contaminación y el daño en estas células y/o tejidos depende del manejo y manipulación que se les da, así como también el tipo de aditamentos que se utilizan para su desarrollo; (Richards et al., 2003; Villa et al., 2013). Un ejemplo muy claro es lo que sucede cuando las células requieren de factores de diferenciación y expansión *in vitro* y el medio de crecimiento contiene SFB; es evidente, que al ser trasplantadas se corre el riesgo de contaminación por algún agente externo como virus, priones o simplemente inmunorreacción a proteínas externas (Manello et al., 2007; Zhenquiang et al., 2016), para evitar este tipo de problemas se han implementado otras técnicas de cultivo en las cuales están involucradas las llamadas células alimentadoras, componentes de suero humano como plasma rico en plaquetas o sueros autólogos, lo cual ha abierto un importante debate (Hu et al., 2011; Van der Valk et al., 2017; Richards et al., 2003; Xu et al., 2013).

En primer lugar, tenemos a las células troncales pluripotentes o células troncales embrionarias que se han conservado y diferenciado de buena manera mediante el uso de células alimentadoras como fuente de alimentación en forma de medio condicionado gracias los fibroblastos de ratón con un proceso similar al de la derivación de la CTM (Zhenquiang et al., 2016). La exposición de las células en medios que provienen de líneas celulares animales se considera riesgoso por la posibilidad de contaminación con patógenos propios del animal, contrario a esto en este tipo de células alimentadoras (fibroblastos de ratón embrionario) se han identificado 136 tipos de proteínas que son reconocidas por ser capaces de promover la diferenciación y crecimiento celular, la creación de matriz extracelular y su remodelación (Manello et al., 2007; Zhenquiang et al., 2016) Estos estudios indudablemente ponen en evidencia los beneficios del uso de células alimentadoras y algunas de las diferencias entre los mecanismos de autorrenovación y pluripotencia de las CT.

Las principales complicaciones con respecto al uso de suplementos celulares como el SFB o MC proveniente de fibroblastos de ratón son la contaminación inmunogénica que estos pueden reportar, esto se ve reflejado en la viabilidad y la eficiencia de las células que son trasplantadas y por consecuencia la tendencia de los resultados publicados (Stojkovic et al., 2005; Villa et al., 2013). Notoriamente diversos estudios están en proceso de encontrar las condiciones idóneas de cultivo, sobre todo que proporcionen seguridad al momento de trasplantar las CT, entonces, se cree que el medio de sustitución debe ser aquel que contenga solo las proteínas humanas, hormonas, y factores de crecimiento necesarias (Manello et al., 2007; Stojkovic et al., 2005; Xu et al., 2013).

Se ha descrito que la utilización de suero humano en el medio de cultivo reduce la exposición de las CT con ingredientes de origen animal y proporciona mayor seguridad en el manejo de las células, además, estudios recientes reflejan que cualquier medio de cultivo libre de xeno-aditamentos es capaz de mantener el crecimiento indiferenciado de las células (Manello et al., 2007).

El SFB es el suplemento más utilizado en el cultivo de células, ya que contienen bastantes factores estimulantes del crecimiento, sin embargo, hablamos de productos naturales que pueden variar de un lote a otro en su fabricación y cuya calidad y concentraciones de proteínas pueden afectar algunas veces el crecimiento celular (Manello et al., 2007). Dada la complejidad de la muestra, mantener un control de calidad en estos productos resulta muy costoso y los protocolos no se encuentran aún bien establecidos por parte de los fabricantes (Manello et al., 2007).

Recientemente la mayoría de protocolos de aislamiento y expansión, para producción a gran escala de CT utilizan medios de cultivo suplementados con frecuencia con SFB, los cuales pueden contener compuestos xenogénicos potencialmente dañinos; en particular estas proteínas pueden internalizarse dentro de las células del receptor y estimular su inmunogenicidad (Zhenqiang et al., 2016). Por ejemplo, en ensayos clínicos pacientes deficientes de la enzima adenosina desaminasa sometidos a terapia génica en la cual se utilizaron Células T autólogas cultivadas en medio suplementado con SFC desarrollaron inmunidad única IgG a las proteínas del SFC (Manello et al., 2007; Villa et al., 2013).

El SFB contiene una gran variedad de polipéptidos que pueden hacer daño a las células induciendo cambios metabólicos y morfológicos significativos (Villa et al., 2013). Por último el SFB contiene una alta concentración de Fetuina-A, glicoproteína producida en el hígado con gran cantidad de funciones biológicas en el crecimiento y diferenciación celular que al unirse a receptores de insulina inhibe su acción *in vitro* (Manello et al., 2007). Todos estos ejemplos evidencian el hecho de que utilizar SFB como suplemento en el medio de cultivo no es lo más adecuado para una expansión eficaz de las CT y su utilización en terapia celular y medicina regenerativa lo que propone el distanciamiento de productos de origen animal. Es justo mencionar que también existen diversos ensayos clínicos en los que se ha cultivado CTM utilizando SFB para suplementar los cultivos y no se han encontrado efectos secundarios. Existen otros factores que pueden afectar el desarrollo celular como la calidad en la superficie de cultivo (plástico) y la concentración de glucosa que se utiliza; por tales motivos es preciso ser cautelosos pues existe aportes beneficiosos y perjudiciales en cuanto al uso de SFB pues este puede inducir modificaciones sutiles e inesperadas en los productos celulares que se infunden en los pacientes.

Otra alternativa para suplementar los cultivos celulares son los derivados de sangre humana que en teoría deben de eliminar o reducir riesgos por efectos secundarios, en particular se ha demostrado que CT cultivadas en matrices derivadas de suero o plasma humanos autólogos mantienen todas las características de las CTE después de mantenerse en cultivo por tiempos prolongados, incluyendo su pluripotencialidad (Hu et al., 2011; Manello et al., 2007; Xu et al., 2013).

En cuanto a CTM se refiere a parte de la utilización de plasma en el cual se han identificado factores de crecimiento que podrían ser importantes para la diferenciación celular, por ejemplo, la hormona de crecimiento y la insulina (Xu et al., 2013); también varios trabajos se han centrado en el uso de suero autólogo los cuales evidenciaron que al igual que el plasma también conserva la capacidad de diferenciación, induce una mayor amplificación celular y promueve la motilidad de las CTM y CT derivadas de MO y mejoras en las terapias celulares y genéticas (Manello et al 2007; Xu et al., 2013), no obstante, la técnica con el uso de plasma y suero autólogo se ve limitada debido a la cantidad de suplementos necesarios para

expandir CTM para uso clínico y la variabilidad del suero especialmente en pacientes que reciben quimioterapia (Manello et al., 2007).

Aunque el suero humano no apoya plenamente el crecimiento de las CTM *in vitro*, estudios demuestran que al cultivar CTM con plasma o suero autólogos, plasma rico en plaquetas y factores de crecimiento derivados de plaquetas demostraron crecimiento vigoroso y capacidad de migración, actividad inmunosupresora, y capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes como osteogénico, adiposo y condrogénica, esta evidencia sugiere que el plasma rico en plaquetas puede ser un sustituto fuerte y seguro para el SFB en la fabricación de productos de Ingeniería de tejidos y Medicina regenerativa y el entorno clínico de las CTM (Richards et al., 2003; Vinatier et al., 2009; Xu et al., 2013).

Por otra parte estudios adicionales demostraron que los medios libres de suero pueden promover el crecimiento de las CTM sin la adición de citoquinas y/o factores de crecimiento, posiblemente debido a que el suero produce oscilaciones de calcio intracelulares, que son vitales para la diferenciación y proliferación celular (Manello et al., 2007). Para apoyar aún más esto también es importante tomar en cuenta la densidad celular inicial, el medio base, presencia de citocinas, entre otras variables que pueden explicar en cierta medida el porqué en la inconsistencia de los resultados (Xu et al., 2013).

IV. HIPÓTESIS

A través de la utilización de factores de crecimiento y quimiocinas provenientes del sobrenadante de cultivos condrales se obtendrá un microambiente que pueda diferenciar células troncales mesenquimales a un linaje condral *in vitro*.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Generar un linaje condral y su caracterización, derivado de células troncales mesenquimales de médula ósea, mediante el uso de sobrenadantes de condrocitos obtenidos de cartílago articular.

5.2 Objetivos específicos

- Generar cultivos de células troncales mesenquimales utilizando el protocolo de diferenciación con factores de crecimiento recombinantes.
- Comprobar por medio de marcadores específicos y tinciones la diferenciación de las células troncales mesenquimales.
- Generar cultivos de primer pase con células condrales equinas.
- Probar diferentes concentraciones de sobrenadante (medio condicionado) para la diferenciación de células troncales mesenquimales a linaje condral.
- Comparar cuantitativamente la expresión de marcadores en los diferentes grupos experimentales.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Obtención de condrocitos primarios: generación de sobrenadantes

Para el proceso de diferenciación de CTM de médula ósea de equinos se realizaron cultivos de 3 muestras de cartílago articular con el objetivo de obtener los sobrenadantes de medios de cultivo y utilizarlos como medio condicionado.

Estas muestras fueron donadas tras cirugía y procesadas en el Instituto Nacional de Rehabilitación LGII en la Unidad de Ingeniería de tejidos, Terapia celular y Medicina regenerativa.

6.2 Condiciones experimentales:

Las muestras de cartílago articular se trabajaron bajo campana de flujo laminar, se extrajo la muestra y se lavó con solución amortiguadora de fosfatos (PBS Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA) al 10% dos veces, se agitó suavemente y se dejó reposar durante 5 minutos, en un tubo de 50 mL se preparó 10 mL de medio de cultivo D-MEM/F-12 (Gibco, Cat. 11955-065) con antibiótico-antimicótico al 1% (Gibco, Cat. 15240-096) y 300 μ L de colagenasa (Worthington) al 0.3 %, posteriormente las biopsias se trasladaron a una caja de petri y con ayuda de pinzas y bisturí se hicieron cortes pequeños del tejido los cuales se sumergieron en la solución que previamente se había preparado y se colocaron en tres tubos diferentes, posteriormente se incubaron a 37 °C, en agitación constante de 150 rpm (agitador orbital, marca THERMO) por espacio de 2 a 3 h. Se centrifugaron las muestras a 1500 rpm por 12 minutos, al finalizar se desechó el sobrenadante y se re- suspendió el botón celular, se agrega 2 mL de medio DMEM/F12 con antibiótico al 1 %. De esta suspensión se tomaron 10 μ L y se mezcló con 10 μ L de colorante azul tripano, de esta mezcla se tomaron nuevamente 10 μ L y se colocaron en una cámara de Neubauer para realizar el conteo celular seguido de esto se sembraron las células (aproximadamente 250 000 células) en cajas de 25 cm² (cajas tratadas para adherencia celular) y se agregaron 2 ml del medio preparado. Al día siguiente se les agregó 3 mL más del medio de cultivo preparado para alcanzar un volumen total de 5 ml en atmósfera de 5 % de CO₂ a 37 °C.



Fig. 1. Cultivo de condrocitos equinos aisladas por digestión enzimática de tres biopsias de cartílago articular.

El medio de cultivo se cambió cada dos días, se retiraron 3 mL de cada caja de cultivo, mismos que se agregaron de medio de cultivo de expansión nuevo, hasta que las células alcanzaron 90 % de confluencia. Este medio se almacenó como MC a -80°C en alícuotas de 9 mL previa filtración a través de una membrana de $0.22\ \mu\text{m}$ para esterilizar.

Las células siguieron en cultivo hasta el segundo pase y fueron desprendidas de la caja de cultivo mediante una solución de tripsina (Gibco® cta. 25300) y se volvieron a cultivar bajo las mismas condiciones por un mes.

6.3 Obtención de médula ósea

Se obtuvieron 4 muestras de médula ósea de equino por aspirado a través del hueso esternal, los caballos fueron sedados de pie con Xilacina (Fort Dodge®, México 1.1 mg/Kg) y Butorfanol (Fort Dodge®, México 0.01 mg/Kg), se rasuró el área del esternón. Se infiltró a nivel subcutáneo un analgésico local (Lidocaína al 2% Pisa®, México) y se realizó el aspirado de médula ósea con aguja (Rosenthal, Texas, EUA Kendall) conteniendo heparina de sodio a una concentración de 1000 UI/mL. (Fortier et al., 1998), al término del procedimiento las muestras fueron llevadas a la Unidad de

Ingeniería de tejidos y Medicina regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación LGII a la temperatura requerida.



(a) (b)
Fig. 2. Aspirado de médula ósea de equinos (a), tratamiento con Ficoll Paque™ (b).

En el laboratorio las muestras fueron procesadas en una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA). En un tubo de 50 mL de fondo cónico se aislaron las células mononucleares en dilución 1:2 de las muestras de MO con PBS (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA), se colocaron 25 mL de la muestra cuidadosamente sobre 15 mL de Ficoll Paque™ (Amersham Bioscience, Picataway, NJ) de 400 kDa de peso molecular, la muestra fue centrifugada a 1500 rpm / 35 minutos, al finalizar éste se retiró la capa de células mononucleares en la interface que se produce entre el plasma y el ficoll.

Del número total de células se hicieron alícuotas 1×10^5 para su caracterización por citometría de flujo, cultivos de diferenciación y tratamiento con el MC.

6.4 Expansion *in vitro* de las células mononucleares aisladas de médula ósea.

Las células mononucleares se expandieron en cultivo primario en cajas tratadas para favorecer la adherencia celular de 150 cm² (Cornig, Cat. 430824), se utilizó medio DMEM, SFB al 10 % y 1 % antibiótico-antimicótico.

Se cultivaron las células mononucleares para la obtención de tejido condral y adiposo, utilizando medio DMEM-F12 (Invitrogen® Co. Gibco. NY, EUA) suplementado con factores de crecimiento y con SFB (SFBD, Hyclone. Cat. SH30070.02) al 10 % y antibiótico-antimicótico (Gentamicina y Anfotericina B) (Gibco, Cat. 15240-096) al 1% por 15 días en condiciones estándares de cultivo, temperatura 37 °C, atmosfera de 5 % de CO₂, el medio de cultivo fue cambiado cada 48 horas.

6.5 Análisis por citometría de flujo

Las alícuotas (aproximadamente 250,000 células) que fueron destinadas para en el análisis de inmunofenotipificación por citometría de flujo, fueron colocadas en un tubo de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson) con 100 µL de PBS, se agregó 1 µL de anticuerpo primario y se dejaron incubar por 30 a 45 minutos a 4 °C protegidos de la luz; se utilizaron anticuerpos monoclonales anti CD14, CD34, CD45, CD105, CD90 y CD73 todos de (BD, Pharmigen™), se añadió 1 µL de anticuerpo secundario y se dejó incubar de la misma forma, posteriormente se centrifugó por 5 minutos a 300 gx. al finalizar se decantaron las muestras, los datos fueron adquiridos de un citómetro de flujo BD® FACSCalibur y analizados en el programa de cómputo Cell Quest PRO™ (Becton Dickinson, EUA) con una media de 10 000 eventos. Para cada marcador se calculó el porcentaje de células positivas analizando su nivel de expresión.

6.7 Protocolos de diferenciación celular de las CTM.

Condrocitos.

Un porcentaje (15 % aproximadamente) de las CTM expandidas fueron utilizadas para diferenciarse en tejido condral, se sembraron en cajas con seis pozos, se utilizaron tubos de centrifuga de fondo cónico con un volumen de 15 mL de medio de cultivo DMEM-F12 (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA) enriquecido con 5% de SFB (SFBD, Hyclone. Cat. SH30070.02) y 1% de antibiótico / antimicótico (Gentamicina / Anfotericina B) (Gibco®, Cat. 15240-096). El medio de cultivo fue suplementado con insulina 10 ng/ml, ácido ascórbico 10 ng/ml, factor de crecimiento transformante beta-3 100 ng/ml, proteína morfogénica de hueso 2 100 ng/mL, se dejó por 2 semanas con las mismas condiciones de cultivo a 37°C con 5 % de CO₂, cambiando el medio cada 2 días.

Al término de la fase de cultivo, se realizaron tinciones con azul alciano e Inmunofluorescencia para marcadores Sox9, Col II y AGR para así corroborar la producción de MEC propia del tejido cartilaginoso. Los procedimientos fueron los siguientes:

Tinción de azul alciano, se fijaron las muestras con paraformaldehido (PFA) por 20 minutos, se agregó el colorante el azul alciano hasta cubrir las muestras y se dejaron toda la noche en refrigeración 4°C, se retiró el colorante y se agregó HCl 0.1 N hasta cubrir las muestras durante 5 minutos, por último se realizaron dos lavados con PBS por 30 segundos. Las muestras se almacenaron a 4 °C.

Inmunofluorescencia, las células se fijaron con PFA al 4 % durante 30 minutos y se agregó la solución de bloqueo (PBB, albumina al 1%, tritón al 0.3 %) durante 45 min. Los anticuerpos primarios (Proporción 1:50) se diluyeron en medio de cultivo acondicionado con SFB y se incubaron durante toda la noche a 4 °C, se realizaron dos lavados con PBS por 5 minutos, se agregó el anticuerpo secundario acoplado al fluorocromo (diluido en solución de bloqueo proporción 1:100) durante 2 h. a 37 °C, se lavaron con tritón 0.3 %, dos veces por 5 minutos en temperatura ambiente, se realizaron dos lavados más con PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Las células marcadas se observaron en un microscopio confocal de barrido laser Zeiss (Axiovert25, Alemania).

Adipocitos

Las células que fueron elegidas para la diferenciación adipocítica fueron resembradas en cajas de seis pozos, ahí se inició la estimulación para llevar las células inmaduras a un linaje adiposo, utilizando DMEM-F12 (Invitrogen® Co. Gibco®. NY, EUA) enriquecido con 5% de SFB (SFBD, Hyclone. Cat. SH30070.02) y 1% de antibiótico / antimicótico (Gentamicina / Anfotericina B) (Gibco®, Cat. 15240-096), insulina 2.5 mg, dexametasona 10^{-6} M, isobutil-metilxantina 0.5 mM, indometacina 60 mM. Al concluir la fase de cultivo se realizó una tinción con rojo oleoso (colorante lipofílico que tiñe las vacuolas de los adipocitos) esto con el fin de evaluar la presencia de grasa dentro de las células estimuladas.

Tinción rojo oleoso, los cultivos fueron fijados con PFA al 4% por 30 minutos, se lavó con PBS dejándola 5 minutos entre lavado y lavado, finalmente se colocó el colorante cubriendo toda la superficie del cultivo, se incubó durante la noche, se realizaron 3 lavados con PBS por 5 minutos entre lavado y lavado.

6.8 Cultivos condrales; utilización de medio condicionado.

Las células troncales mesenquimales obtenidas de las 4 muestras de MO, fueron extraídas después de 15 días de cultivo y sembradas en cajas de 24 pozos, donde se les dio el tratamiento con el medio condicionado obtenido de los cultivos de condrocitos (células alimentadoras), el medio de cultivo fue cambiando cada dos o tres días según el requerimiento.



(a)



(b)

Fig. 3. (a) Caja de cultivo de 24 pozos que contiene las CTM que serán tratadas con seis distintos tratamientos en una mezcla de MB y MC para probar su diferenciación a células condrales. (b) Medio condicionado procedente de las células alimentadoras (condrocitos en cultivo), filtrado y listo para su uso.

Medio 1	100% Medio de Cultivo Base.	0 % Medio Condicionado.
Medio 2	70 % Medio de Cultivo Base.	30 % Medio Condicionado.
Medio 3	60 % Medio de Cultivo Base.	40 % Medio Condicionado.
Medio 4	50 % Medio de Cultivo Base.	50 % Medio Condicionado.
Medio 5	30 % Medio de Cultivo Base.	70 % Medio Condicionado.
Medio 6	0 % Medio de Cultivo Base.	100 % Medio Condicionado.

Tabla 1. Distintos tratamientos utilizados en la diferenciación y crecimiento de las CTM. Mediante la combinación de MC y SFB.

Al final de los tratamientos y con el objetivo de evaluar la diferenciación hacia tejido condral, las células fueron sometidas a cuatro pruebas: tinción con azul alciano, safranina O, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia para marcadores Col II, Sox 9 y AGR. Para mostrar la capacidad de diferenciación y crecimiento celular así como el tratamiento ideal para el cultivo de estas células, se realizó análisis estadístico (prueba de Tukey).

Tinción safranina O, se fijaron las muestras con PFA al 4 % por 20 minutos, **se agregó** colorante hematoxilina de Weigert hasta cubrir las muestras por 7 minutos, las muestras se lavaron con agua corriente por 10 minutos, posteriormente se agregó colorante verde rápido por 3 minutos, se añadió ácido acético al 1% de 10 a 15 segundos, se adicionó la safranina O por 7 a 10 minutos, se hizo un lavado con PBS por 30 segundos y se almacenaron las muestras a 4 °C.

Análisis de inmunohistoquímica, las células diferenciadas se fijaron con PFA al 4 % y se bloquearon con PBS, se hicieron 3 lavados de 1 a 2 minutos con esta solución, se agregaron los anticuerpos primarios (dilución 1:50) con medio de cultivo DMEM/F12, se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Posteriormente se hicieron 4 lavados de 5 minutos con una solución de PBS mas tritón al 0.1% y se agregaron los anticuerpos secundarios (dilución 1:100) dejándolo de 1 a 2 h. a 37 °C en cámara húmeda, nuevamente se hicieron 4 lavados con PBS mas tritón al 0.1% 4 por 5 minutos, se agregó la Streptavidina/HRP por 20 minutos, se lavó 4 veces por 5 minutos con la solución de PBS mas tritón al 0.1%, y se agregó el cromógeno (DAB-sustrato) de 5 a 20 minutos, hasta que se produce la reacción que da coloración marrón a las muestras, finalmente se hicieron 2 lavados con agua bidestilada por 5 minutos.

6.10 Análisis estadístico

Las fotografías de las tinciones de azul alciano y safranina O, de los cultivos condrales fueron evaluadas con el programa de cómputo ImageJ (National Institutes of Health, EUA), que permite calcular áreas mediante las estadísticas del valor de pixel de selecciones definidas por el usuario y la intensidad de los objetos umbral, además de medir distancias y ángulos.

El análisis de comparación se realizó con el paquete estadístico “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS) 12.0 mediante la prueba de Tukey, para comparaciones múltiples de medias, con ayuda de un análisis de varianza para la validación de las diferencias de los grupos. Los niveles de significancia se fijaron en $p < 0.05$ para todas las comparaciones.

VII. Resultados

7.1 Producción de medio condicionado a partir de condrocitos primarios de biopsias de cartílago articular de equino.

Fueron tomadas tres muestras de cartílago articular equino las cuales se mantuvieron en cultivo durante dos meses aproximadamente y se obtuvieron 240 mL de medio condicionado el cual fue filtrado y utilizado para suplementar los cultivos de células troncales mesenquimales de médula ósea equina para llevarlos a condrocitos. Las células proliferaron bastante y mantuvieron su fenotipo original durante los primeros días de cultivo y posteriormente se mostraban alargadas en forma fibroblastoide (ver figura 4 y 5), por esta razón los sobrenadantes fueron separados por cultivo primario y secundario.

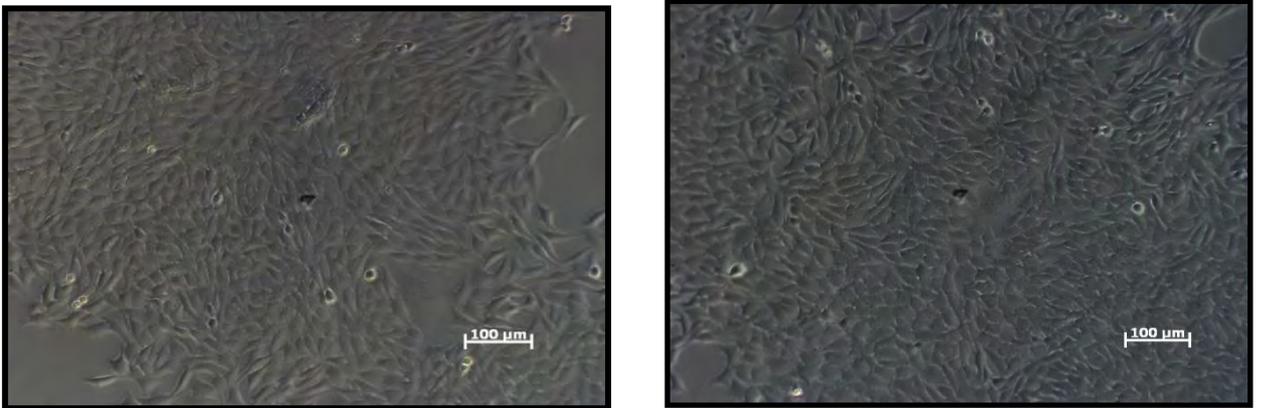


Fig. 4. Fotografía de los condrocitos a los 7 días de cultivo. 10x.

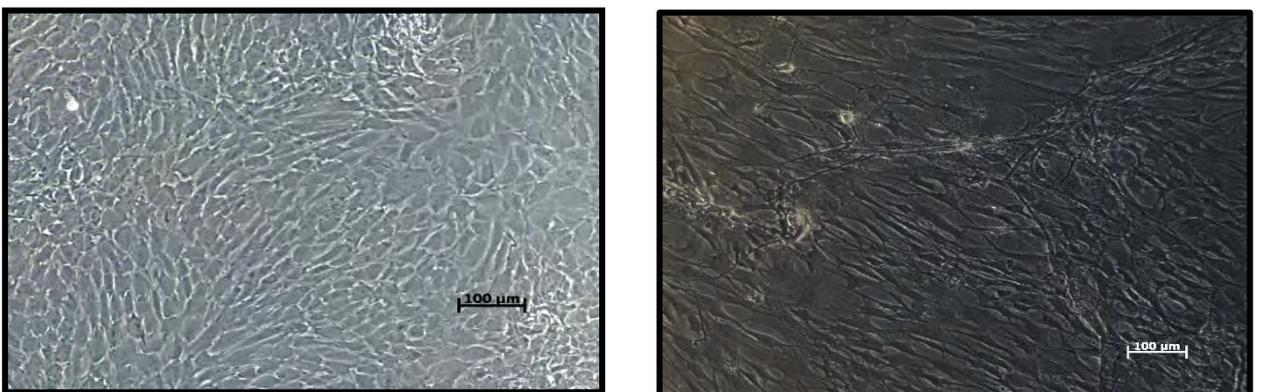


Fig. 5. Fotografía de los condrocitos a los 14 días de cultivo. 10x.

7.2 Cultivo y diferenciación de células troncales mesenquimales de médula ósea.

Las muestras de médula ósea fueron separadas por gradiente con Ficoll y sembradas en cajas de cultivo, las CTM después de dar seguimiento al cultivo primario mostraron adherencia a la caja y morfología alargada fibroblastoide (ver figura 6 y 7).

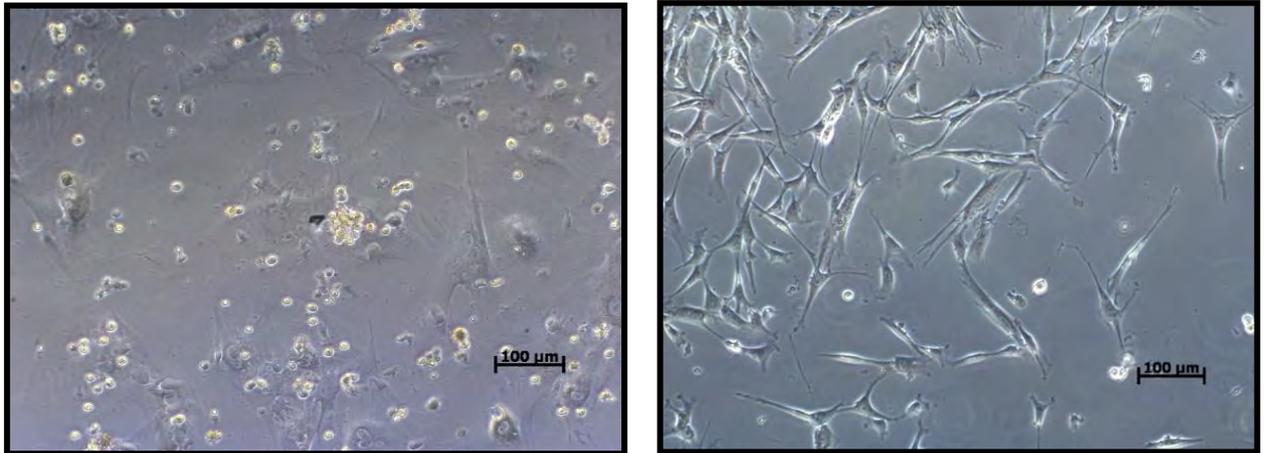


Fig.6. Cultivo de células obtenidas por punción directa, a los 7 días de cultivo 10x.

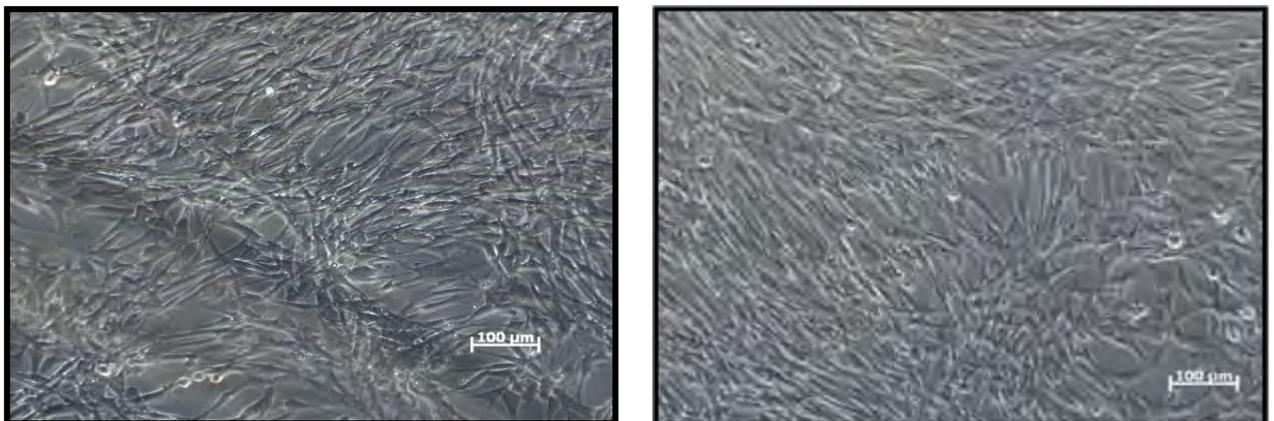


Fig. 7. Desarrollo de las células trocales mesenquimales *in vitro*. El fenotipo de las células se observa fibroblastoide.

7.3 Caracterización de inmunofenotipo de las células troncales mesenquimales aisladas de médula ósea.

Se logró inmunofenotipar las células mononucleares aisladas de médula ósea con el panel de anticuerpos para células troncales hematopoyéticas CD14, y células hematopoyéticas maduras CD34, CD45 se observó que se trataba de menos del 3 % de la población total, y fueron positivas a los antígenos de superficie CD 90, CD73, CD105 como se muestra en las figuras 8 y 9.

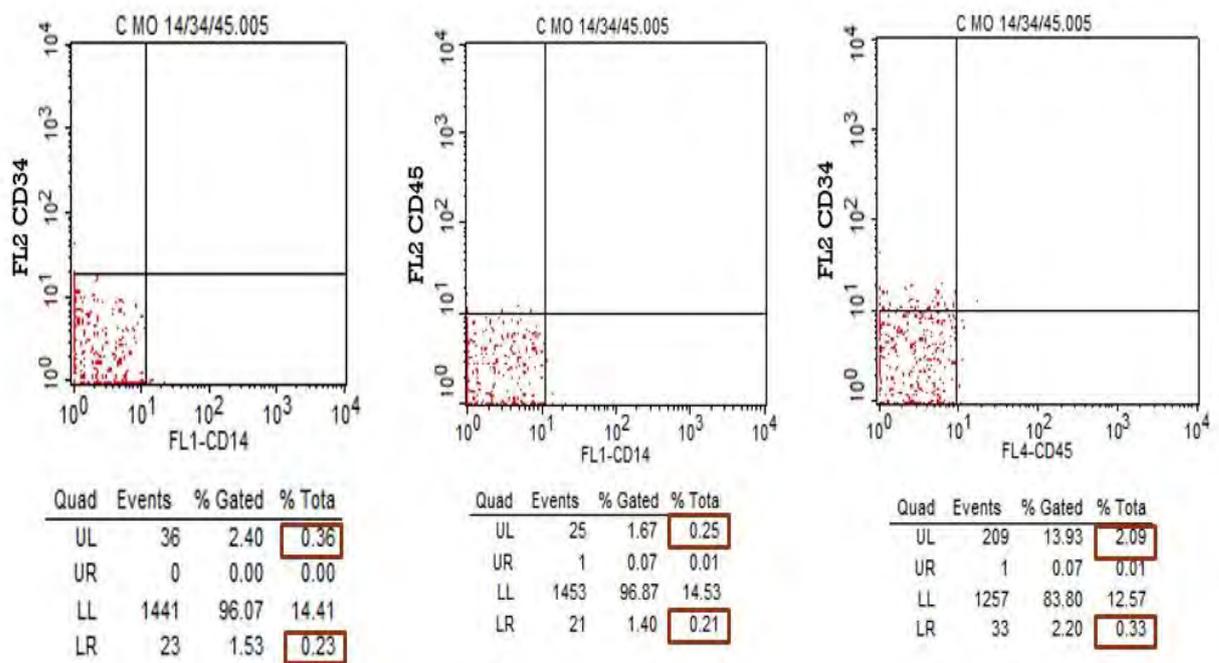


Fig. 8. Caracterización de células mononucleares. Estas células deben de mostrar menos del 2 % de población para CD14, CD34 y CD45.

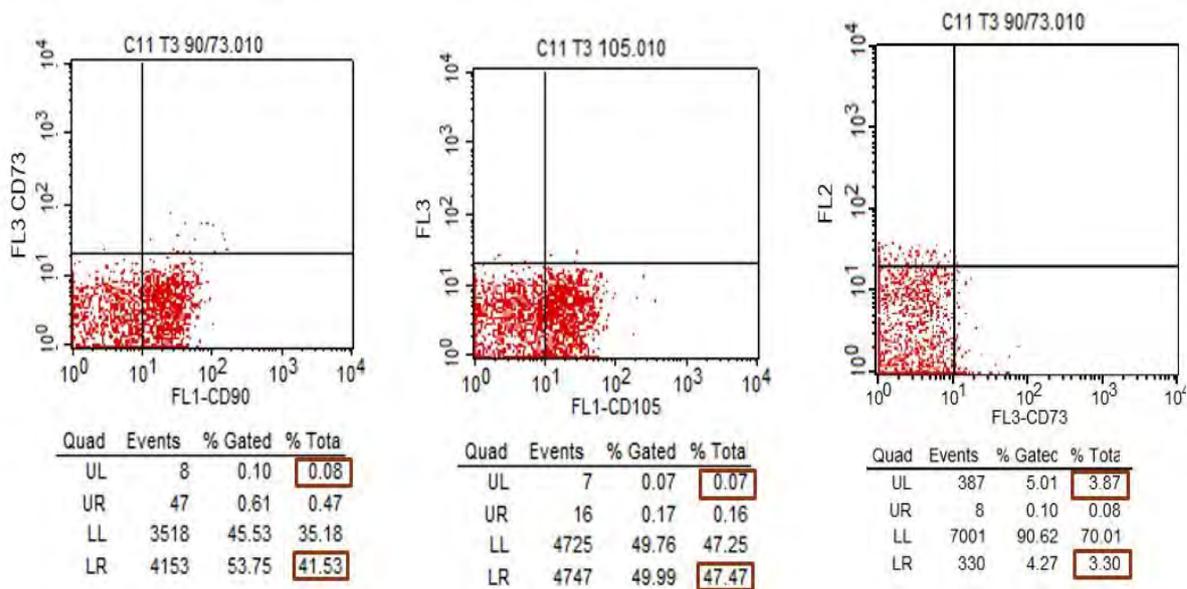


Fig. 9. Caracterización de células mononucleares. Expresión positiva de marcadores CD73, CD90 y CD105 antígenos específicos de CTM

7.4 Diferenciación de las células troncales mesenquimales de médula ósea expandidas empleando medio suplementado.

Llevada a cabo la comprobación de adherencia celular y caracterización de las CTM se realizaron dos protocolos para evaluar la plasticidad de estas células, el primero para conseguir condrocitos en el cual se realizó tinción de azul alciano, que resultó positiva, (ver figura 10) el colorante azul alciano hizo evidentes los componentes de la MEC cartilaginosa, el segundo se trató de diferenciación adipogénica, se realizó tinción de rojo oleoso, (ver figura 11) muestra los depósitos de grasa tenidos de color rojo intenso después de 15 días de cultivo y el suplemento con SFB, factores de crecimiento. Por expresión de marcadores de tejido condral se evaluó por medio de marcaje para inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos a componentes de la MEC condral; agregano, colágena II y el factor de crecimiento sox 9 (ver figuras 12, 13 y 14) se observó la señal positiva fluorescente en los tres marcadores.

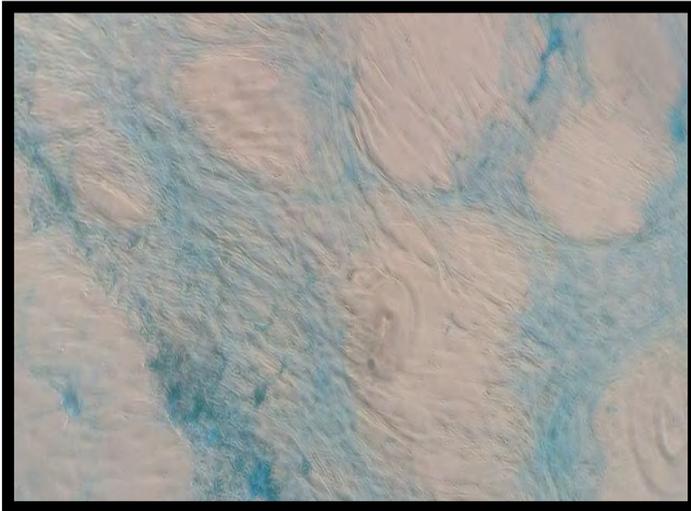


Fig. 10. Células teñidas mediante la técnica de azul-alciano el cual tiene afinidad por los componentes de la MCE condral.

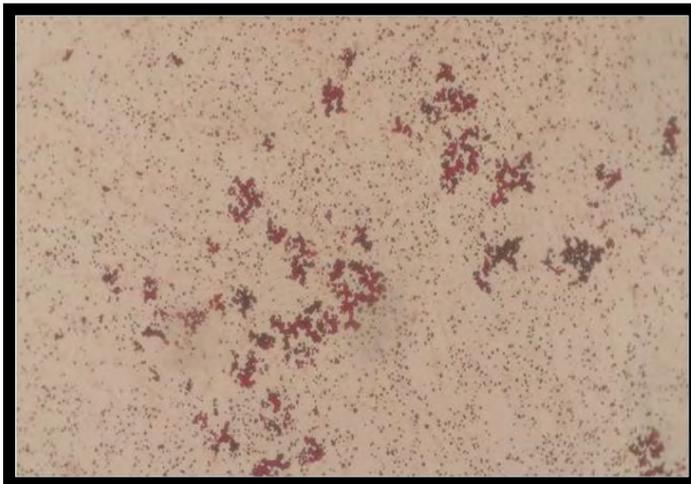


Fig 11. Diferenciación celular de CTM a adipocitos por medio de factores de crecimiento recombinantes, se observan los depósitos de grasa tenidos de rojo.

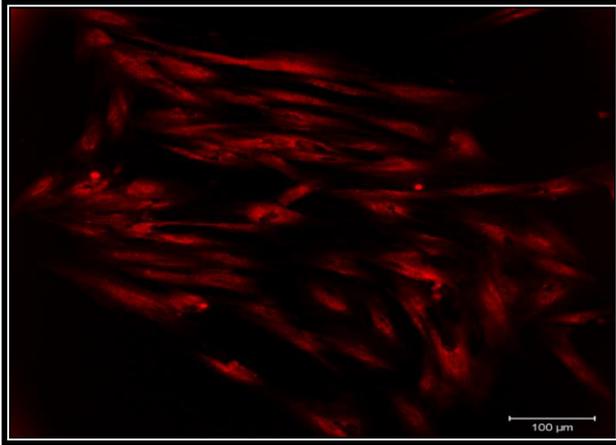


Fig 12. Deteccion positiva de Sox 9 en células diferenciadas a cartílago.

Fig. 13. Localización de colágena tipo II en células condrales.

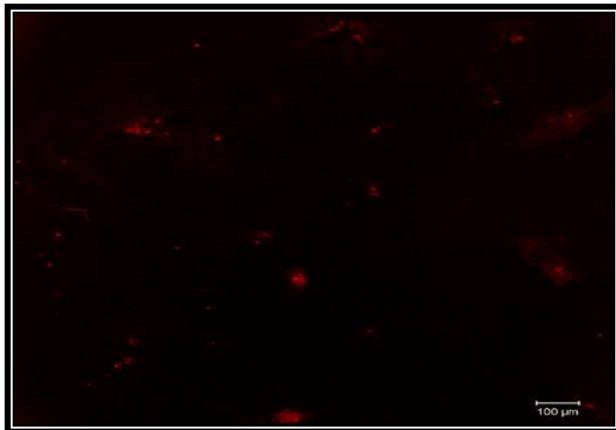
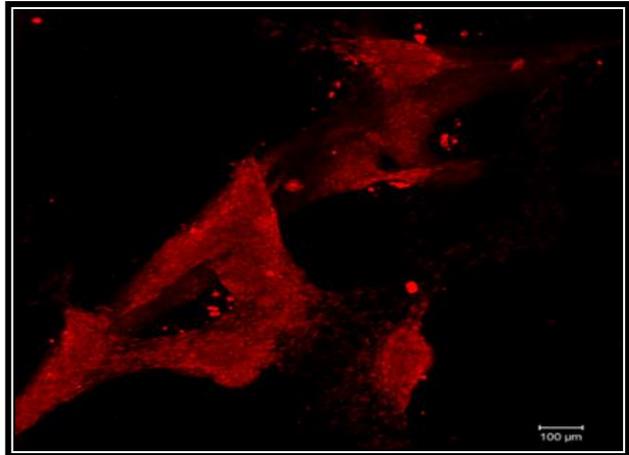


Fig. 14. Presencia de agregcano en cultivo de células diferenciadas a condrocitos.

7.5 Diferenciación condral con medio condicionado y suero fetal bovino: aplicación de tratamientos.

Después de 14 días de cultivo las células en diferenciación que habían sido tratadas con los distintos porcentajes de medios de cultivo, fueron fijadas con paraformaldehído, para posteriormente ser teñidas mediante las técnicas de azul alciano las cuales resultaron positivas, el colorante se une a los compuestos sulfatados similares a los que componen la matriz extracelular del cartílago, se puede suponer que las células que componen ese cultivo son condrocitos productores de matriz extracelular (ver figura 15), la tinción de safranina O, mostro cultivos positivos para células condrales ya que los núcleos fueron teñidos de color rojo tenue y los componentes de la MEC de color azul (ver figura16), otras células fueron destinadas para la realización de pruebas para comprobar por estos dos medios que realmente se trataba de células diferenciadas hacia tejido condral por medio de marcadores específicos de este tejido: colágena II, sox 9 y agrecano. En las pruebas de inmunohistoquímica (ver figura 17) se puede observar la coloración marrón (pruebas positivas) en los marcadores de tejido condral totalmente diferente para los controles negativos y apariencia similar a los controles positivos, las pruebas de inmunofluorescencia (ver figura 18.19 y 20) muestran mayor expresión de los marcadores condrales para los tratamientos 60%MB - 40% MC y 50% MB – 50% MC pues se distingue mayor fluorescencia en las imágenes.



100% MB - 0% MC

70% MB - 30% MC

60% MB - 40% MC



50% MB - 50% MC

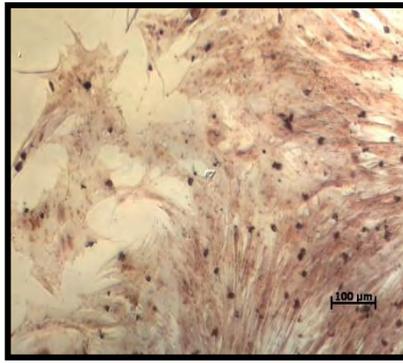
30% MB - 70% MC

0% MB - 100% MC

Fig. 15. Tinciones con azul Alciano en los distintos porcentajes en tratamientos que se aplicaron a las CTM.



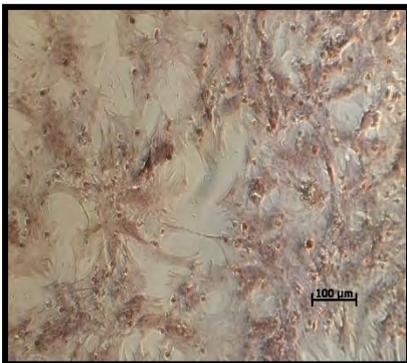
100% MB - 0% MC



70%MB - 30% MC



60% MB - 40% MC



50% MB - 50% MC



30%MB - 70% MC



0% MB - 100% MC

Fig. 16. Tinciones con Safranina O en los distintos porcentajes en tratamientos que se aplicaron a las CTM.

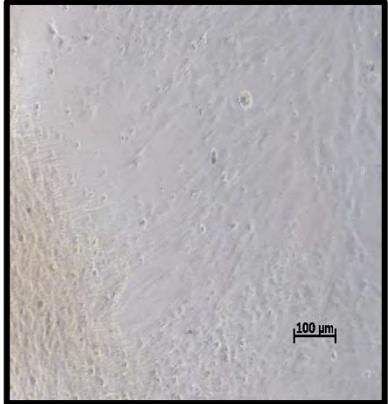
Control Negativo	Cartílago (Control positivo)	Cartílago (monocapa)
<p data-bbox="236 344 328 376">Sox 9</p> 		
<p data-bbox="236 815 323 846">Col II</p> 		
<p data-bbox="236 1341 392 1373">Agrecano</p> 		

Fig. 17. Análisis de Inmunoquímica donde se muestra la presencia de marcadores condrales en los cultivos generados a partir de Medio Condicionado comparados con los controles positivos y negativos de cada experimento.

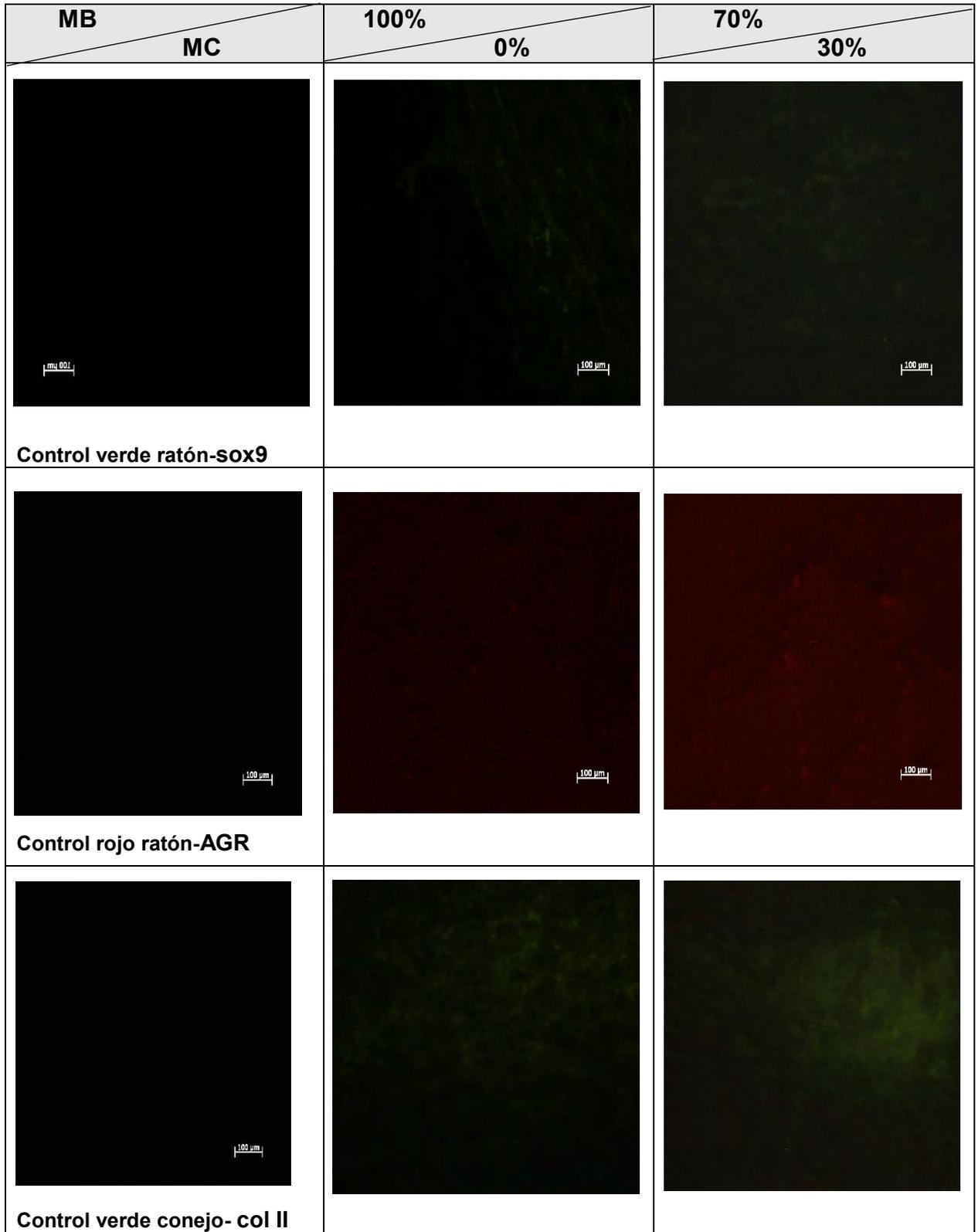


Fig. 18. Inmunofluorescencia, se estableció la presencia de los marcadores de tejido condral sox 9, agregcano y colágena II para los tratamientos 100% MB-0%MC y 70%MB-30%MC.

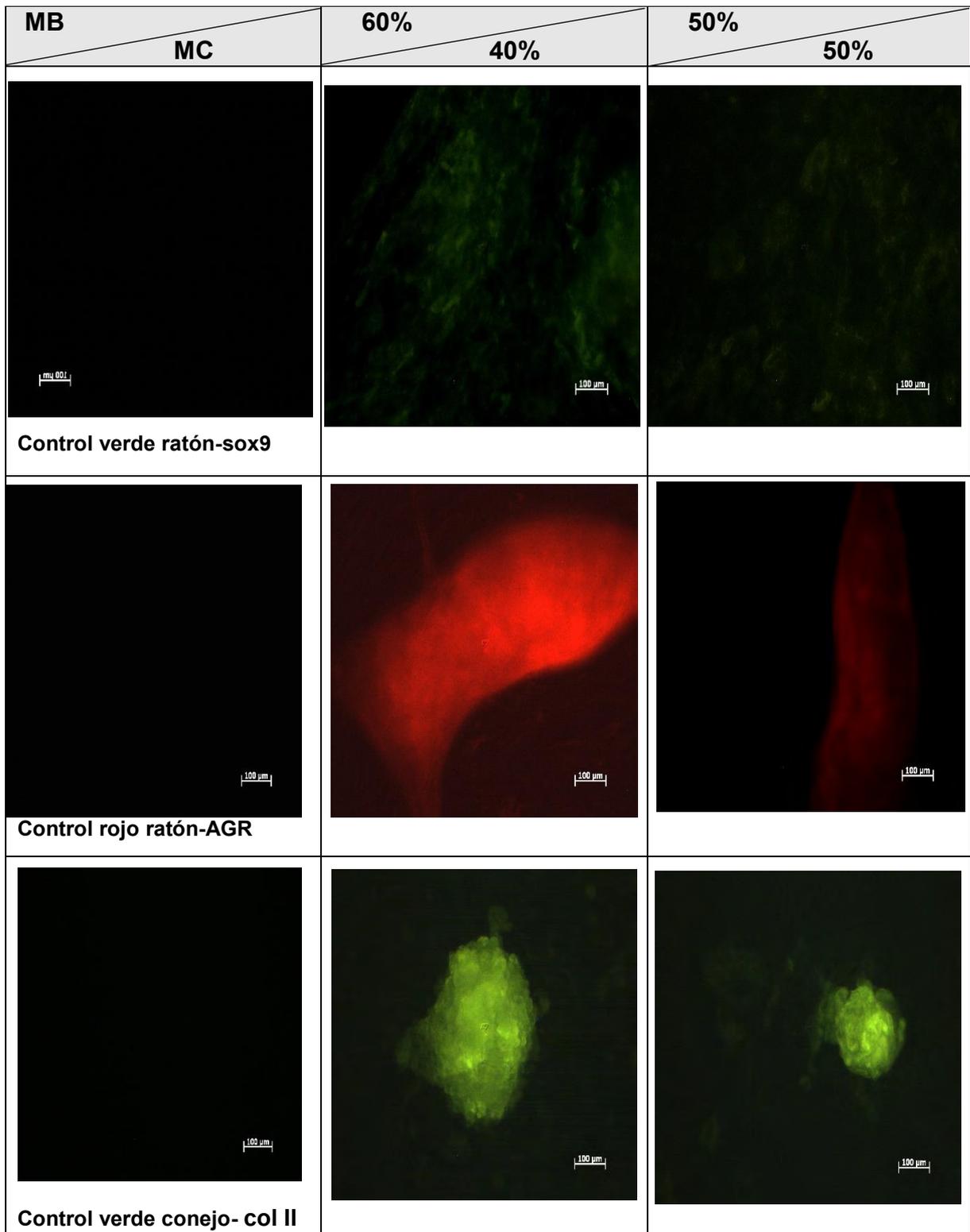


Fig. 19. Inmunofluorescencia, se estableció la presencia de los marcadores de tejido condral sox 9, agregcano y colágena II para los tratamientos 60% MB-40%MC y 50%MB-50%MC.

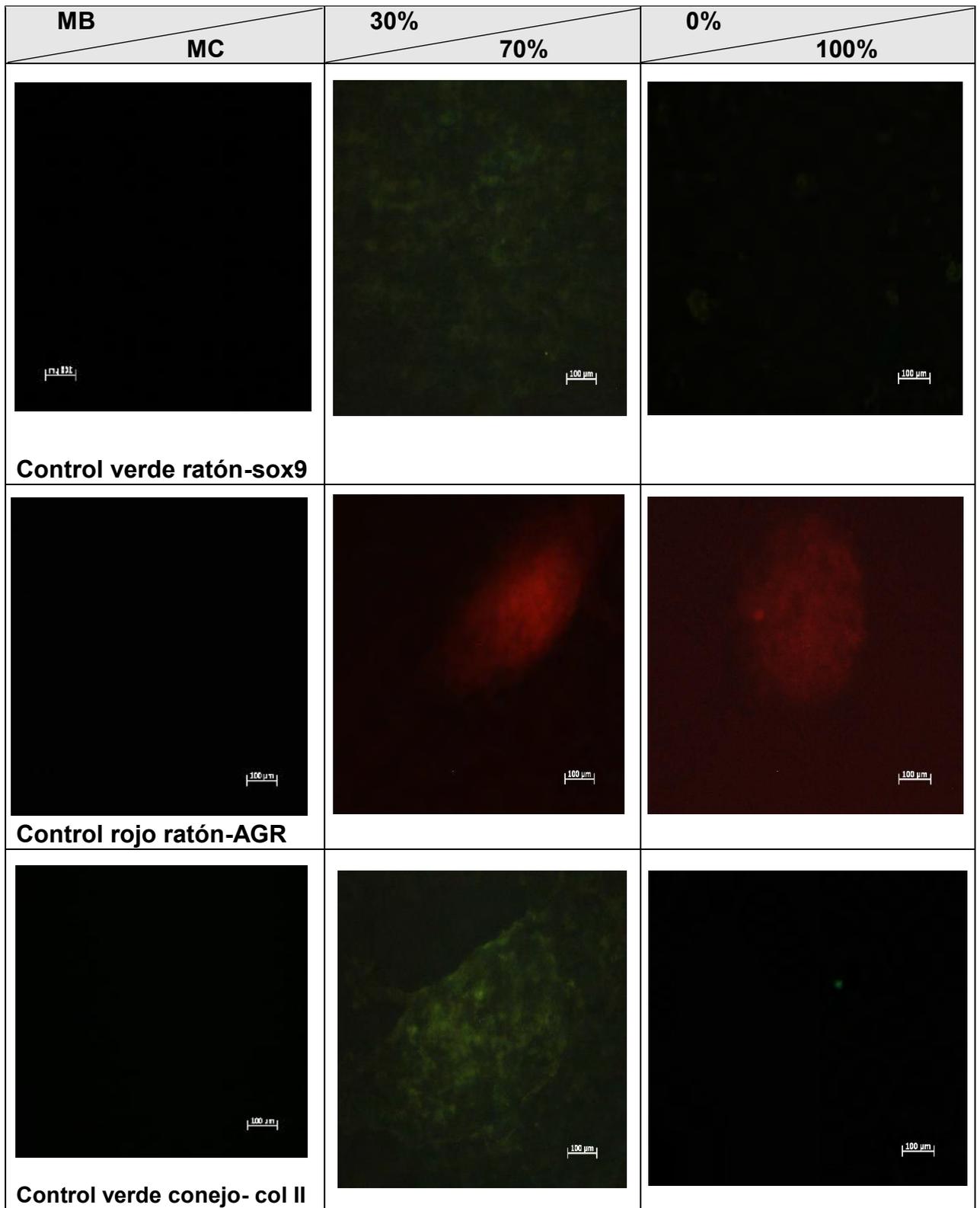


Fig. 20. Inmunofluorescencia, se estableció la presencia de los marcadores de tejido condral sox 9, agregano y colágena II para los tratamientos 30% MB-70%MC y 0%MB-100%MC.

7.6 Análisis de imágenes tomadas de las tinciones de azul alciano y safranina O.

La eficiencia en la diferenciación y el crecimiento de las células troncales mesenquimales en los diferentes tratamientos se cuantificó mediante un programa de cómputo ImageJ, que delimita las áreas de crecimiento y le da un valor al pixelaje de éstas (ver figura 21 y 22), mediante estos valores se realizó un análisis de varianza entre los grupos.

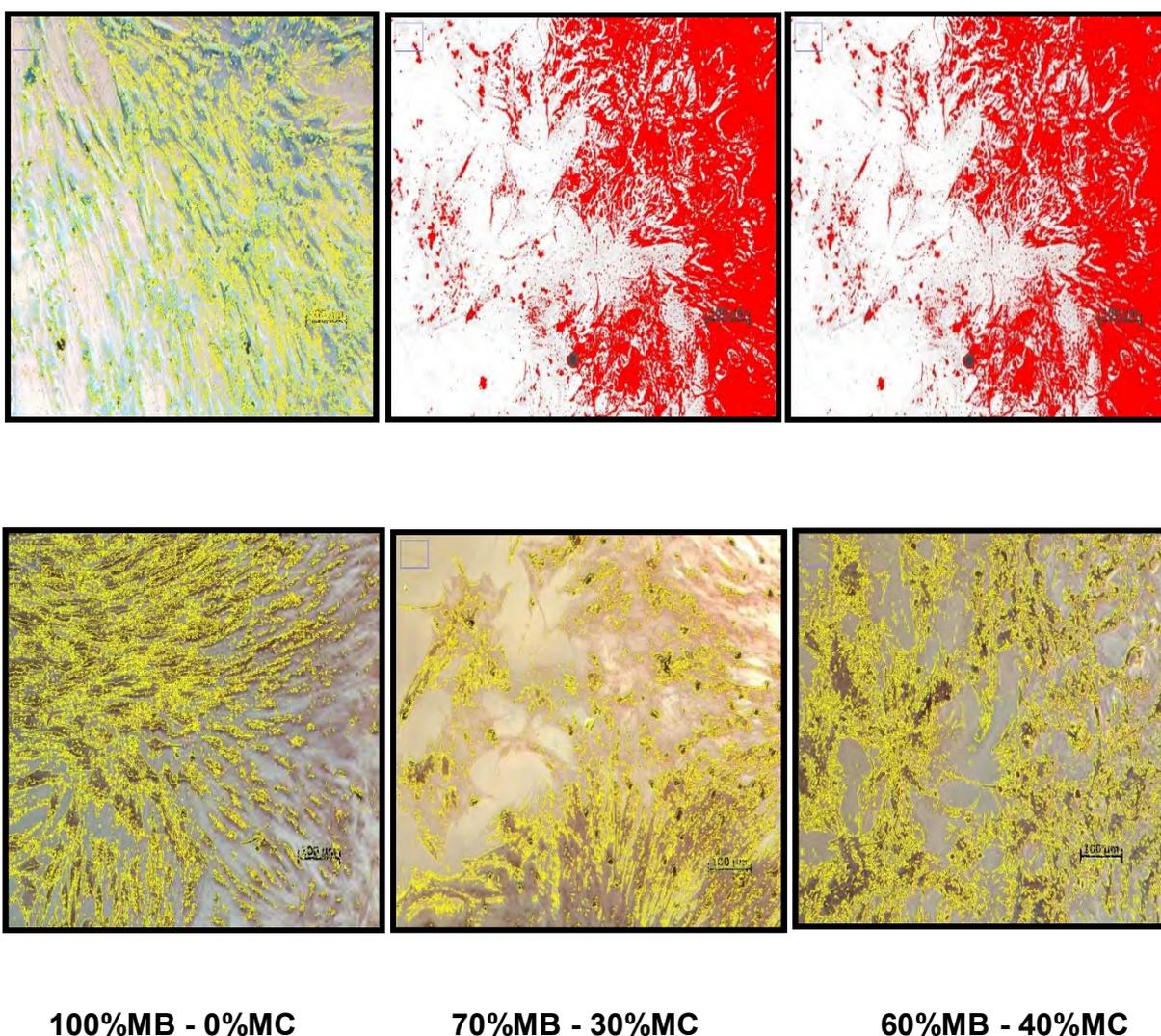
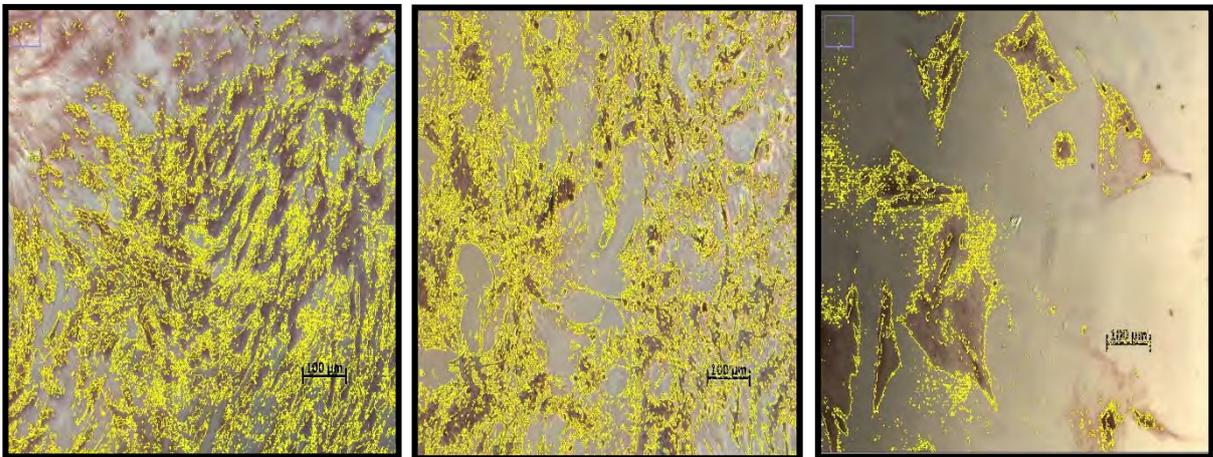
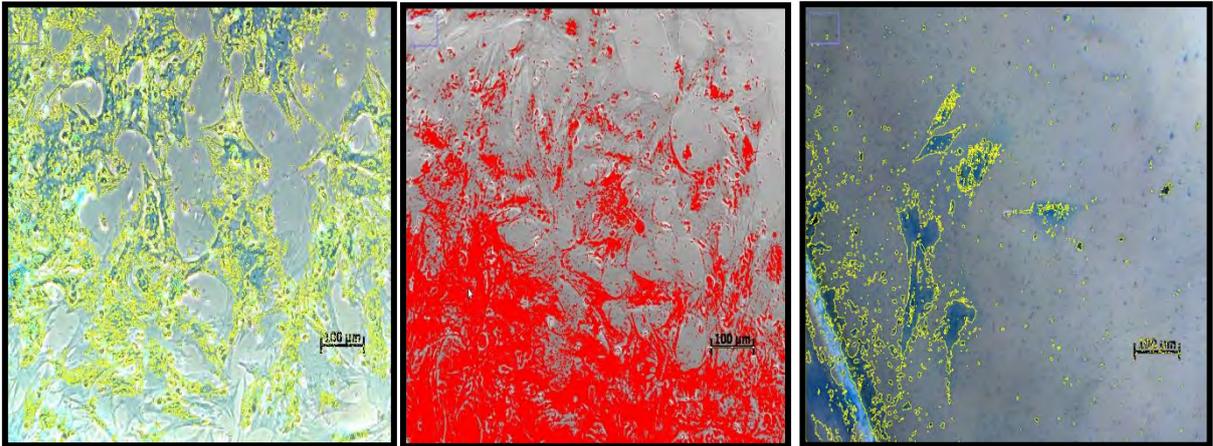


Fig. 21. Evaluación de las fotografías de las tinciones azul alciano y safranina O de cultivos condrales llevados a este estadio con diferentes porcentajes de medio base y medio condicionado.



50%MB - 50%MC

30%MB - 70%MC

0%MB - 100%MC

Fig. 22. Fotografías evaluadas de las tinciones azul Alciano y safranina O de cultivos condrales llevados a este estadio con diferentes porcentajes de medio base y medio condicionado.

7.8 Análisis estadístico tinción azul alciano.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.03412E+11	5	20682466176	71.5739263	1.25927E-13	2.620654148
Dentro de los grupos	6935195729	24	288966488.7			
Total	1.10348E+11	29				

Tabla 2. Análisis de varianza en el cual se comparan las medias para encontrar diferencias entre los distintos grupos (tratamientos) de estudio. Incluyendo la información aportada por la varianza dentro y entre grupos. Ocupando 29 grados de libertad, obteniendo un valor de $p = 1.23 \times 10^{-13}$ que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.

Prueba de Tukey

TUKEY	
100-0	a
70-30	b
60-40	c
50-50	a
30-70	c
0-100	c

	100-0	70-30	60-40	50-50	30-70	0-100
100-0		78358.7702	47251.1742	19297.7174	46497.7984	181539.427
70-30			-31107.596	-59061.0528	-31860.9718	103180.657
60-40				-27953.4568	-753.3758	134288.253
50-50					27200.081	162241.709
30-70						135041.628
0-100						

HSD	20500.8113
MULTIP	6.03
Mse	288966488.7
n	5

Tabla 3. Organización de los grupos lograda mediante el análisis de Tukey, los mejores tratamientos son el 100% MB-0% MC y 50% MB-50% MC.

7.9 Análisis estadístico tinción safranina O.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5.9453E+10	5	1.1891E+10	17.5866204	2.45987E-07	2.620654148
Dentro de los grupos	1.6227E+10	24	676113335			
Total	7.5679E+10	29				

Tabla 4. Análisis de varianza en el cual se comparan las medias para encontrar diferencias entre los distintos grupos (tratamientos) de estudio. Incluyendo la información aportada por la varianza dentro y entre grupos. Ocupando 29 grados de libertad obteniendo una $p= 2.45 \times 10^{-7}$ que indica que existen evidencias estadísticas para afirmar que las diferencias son significativas entre los tratamientos.

Prueba de Tukey.

Prueba de Tukey	
100-0	a
70-30	a
60-40	a
50-50	a
30-70	b
0-100	c

	100-0	70-30	60-40	50-50	30-70	0-100
100-0		29129.0534	11044.1624	28627.9746	71750.6006	131473.745
70-30			-18084.891	-501.0788	42621.5472	102344.692
60-40				17583.8122	60706.4382	120429.583
50-50					43122.626	102845.771
30-70						59723.1448
0-100						

HSD	31358.62839
multiplica	6.03
Mse	676113335.1
n	5

Tabla 5. Organización de los grupos lograda mediante el análisis de Tukey, los mejores tratamiento son el 100 % MB-0% MC, 70% MB-30% MC, 60 % MB-40% MC y 50% MB-50% MC, con estos estadísticamente se obtiene el mismo rendimiento, sin embargo, por conveniencia se elegiría el tratamiento con proporción 50% MB-50% MC.

Se obtuvieron las medias para cada tinción y posteriormente se realizó una comparación entre ellas lo que sugiere que en las dos pruebas (azul alciano y safranina O.) son estadísticamente significativas ($P < 0.05$). Como se mostró en las tablas 2 y 4 ($p < 1.2592 \text{ E-}7$ y $p < 1.4598 \text{ E-}7$ respectivamente).

Posteriormente en la tabla 3, prueba de Tukey (tinción de azul alciano) denota que los tratamientos se dividen en tres distintos grupos (“a”, “b” y “c”) de los cuales en el “a” encontramos a 100 % MB - 0% MC y 50 % MB - 50% MC; en el grupo “b” está 70% MB–30 % MC y por último en el grupo “c” se localizan los porcentajes 60%MB - 40% MC, 30%MB - 70% MC y 0%MC - 100%MC. Estos resultados indicaron que los factores de crecimiento producidos por las células alimentadoras no tuvieron efectos en los procesos de inducción condral en las células del grupo “c”, en cambio desempeñaron un papel significativo en el potencial de diferenciación condral de los grupos “a” y “b”.

La tabla 5, prueba de Tukey en la que se comparan los resultados de la tinción de safranina O., se presentaron de igual manera tres grupos “a”, “b” y “c”. En el primer grupo “a” ubicamos los porcentajes 100% MB - 0% MC, 70% MB - 30% MC, 60% MB - 40% MC y 50% MB – 50% MC; en el grupo “b” está 30% MB - 70 % MC y finalmente en el grupo “c” 0% MB - 100% MC. Estos resultados señalan que estadísticamente, las células alimentadoras influyen en los procesos de inducción condral en la misma magnitud para 4 de los diferentes tratamientos aplicados, grupo “a”, no así en los grupos “b” y “c” donde estadísticamente no existen diferencias significativas pues no hubo variación en los resultados.

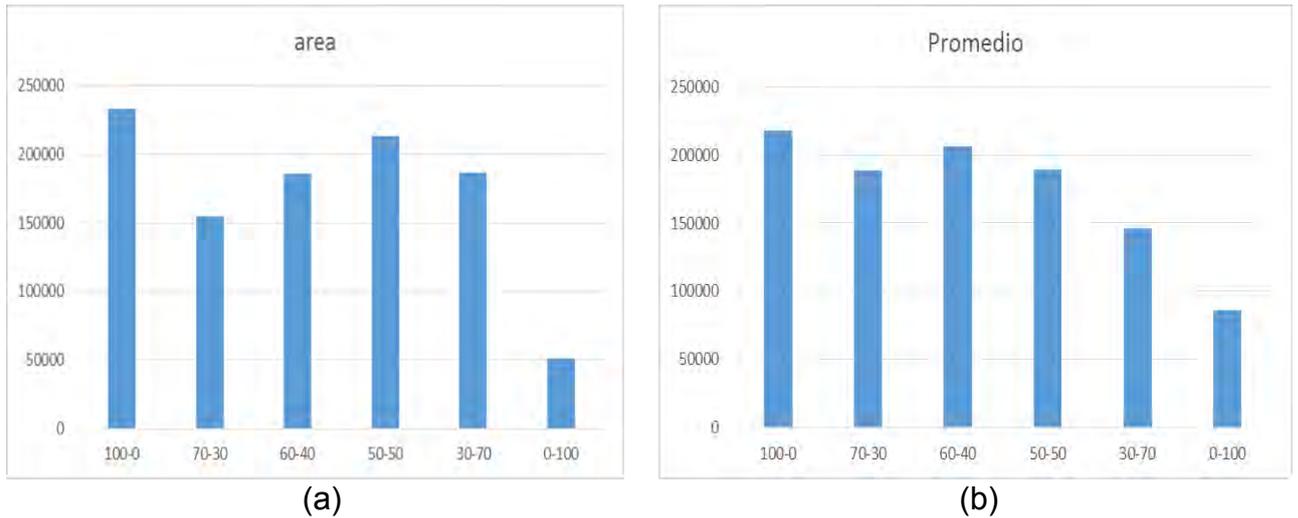


Fig. 23. Gráficas que muestran las medias grupales de los distintos tratamientos aplicados a las células troncales mesenquimales, (a) tinción de azul alciano, (b) tinción safranina O.

Las gráficas “a” y “b” muestran los promedios grupales de los valores que se obtuvieron en el análisis de las imágenes de los distintos grupos de estudio aplicados en las CTM, si tuviéramos oportunidad de agregar más grupos con distintos porcentajes de medios de cultivo, podríamos ver de manera más clara una tendencia a la normalidad y podríamos explicar de mejor manera la variabilidad existente entre los diferentes tratamientos, por lo tanto, disminuir el porcentaje de incertidumbre en los resultados con datos más sólidos (a) y (b). Esto se traduciría en tratamientos más seguros y de mejor calidad para los pacientes próximos a trasplantarse con estas células ya que se disminuiría en gran cantidad el uso de xeno-aditamentos.

VIII. DISCUSIÓN

En el primer estudio se observó cómo los condrocitos conservaron su fenotipo durante los primeros 15 días de cultivo, posteriormente se fueron tornando más alargadas, esto concuerda con informes dados por algunos autores como los doctores Follente 2002 y Bataglia 2003 en sus experimentos observaron que los condrocitos en cultivo en monocapa *in vitro* pierden rápidamente su aspecto y función, lo que conduce a la formación de tejido condral comprometido, describen que dependiendo de las condiciones de cultivo *in vitro* los condrocitos se pueden conducir hacia un fenómeno llamado desdiferenciación que provoca en las células un cambio de fenotipo a fibroblástico, distinto al que tenían cuando fueron aisladas del cartílago tanto en morfología como en expresión de ciertos genes, esta transformación afecta la expresión de colágena II, para solucionar esto se cuenta con distintas opciones entre ellas esta incluir los condrocitos en matrices tridimensionales o agregar una mezcla de factores de crecimiento que permita retrasar el proceso de desdiferenciación, en el caso de este experimento se optó por cultivar las células a alta densidad para evitar este fenómeno. De estos cultivos se obtuvieron los sobrenadantes del medio de cultivo para su uso en diferenciación de CTM, esto porque aunque se ha informado que existen otras técnicas para obtener cultivos *feeder free* como el co-cultivo con condrocitos o el uso de suero o plasma rico en plaquetas, este protocolo, se propuso demostrar que realmente se puede eliminar o disminuir el uso de otras células en los cultivos o el uso de suplementos sintéticos o provenientes de animales. El co-cultivo de condrocitos y CTM es un buen procedimiento para el desarrollo de tejido condral pues la MEC de los condrocitos en co-cultivo se produce antes que en los cultivos de CTM por si solas, ya sea por contacto directo célula célula o por la secreción parácrina de los condrocitos, sin embargo, implican mayor manipulación y costos en los cultivos, por otro lado, el uso de nuevas alternativas en estos cultivos como plasma o sueros autólogos no han resultados con tanto éxito.

Se utilizó como fuente para la diferenciación condrogénica CTM de médula osea, que se caracterizan por su plasticidad principalmente hacia distintos linajes provenientes de la capa mesodérmica, alta capacidad proliferativa, auto-renovación y modulación del sistema inmune. Se confirmó que se trataba de células troncales mesenquimales

ya que se cumplió con los tres requisitos principales para ser consideradas así; en primer lugar se validó la presencia de marcadores específicos de CTM utilizando anticuerpos monoclonales, los fenotipos obtenidos fueron CD34-, CD14-, CD45- y CD73+, CD 90+, CD105+, el hallazgo de que el marcador CD90 estuvo altamente expresado en las CTM es un indicador importante de la capacidad multilineaje de estas células. Las células fueron sembradas y en corto tiempo fueron adheridas a la superficie plástica de las cajas de cultivo, una vez llevadas a confluencia se realizaron protocolos de diferenciación hacia tejido condral dando como positivas a tinción de azul alciano, marcadores específicos de tejido cartilaginoso: colágena II, agregcano y sox 9 confirmando que se trataba de condrocitos y su matriz extracelular produjo elementos propios de tejido cartilaginoso, así mismo, se llevó a cabo la diferenciación hacia tejido adiposo y se comprobó mediante la tinción de rojo oleoso, resultando positiva pues las imágenes mostraban teñidos los compartimentos lipídicos dentro de las células, estos dos experimentos confirmaron la plasticidad de las CTM. Al utilizar cantidades específicas de factores de crecimiento y SFB para la diferenciación de las CTM los resultados son óptimos y certeros como se ha demostrado en este y numerosos experimentos en donde se induce el desarrollo condral, la utilización de TGF- β y dexametasona es un método tradicional, sin embargo, se ha observado que el uso de TGF- β y dexametasona provoca la regulación positiva en la expresión ciertos genes, como la colágena X, fosfatasa alcalina y metaloproteinasas de matriz extracelular 13 (MMP-13), que indica la invariable calcificación y vascularización del cartílago.

Con el fin de evaluar la viabilidad condrogénica las CTM se cultivaron con SFB y sobrenadante de condrocitos articulares en distintos porcentajes, al paso de los días las células cambiaron de forma y continuaron con esa apariencia las próximas semanas. Ensayos realizados admiten que si es posible diferenciar células troncales de médula ósea a cartílago mediante el uso de células alimentadoras como lo demostraron Zhang y colaboradores en el año 2015 al realizar ensayos que derivaron en la obtención de cartílago elástico mediante el uso de sobrenadante de cartílago lo cual fue comprobado mediante tinciones, pruebas de Inmunohistoquímica y PCR. También en año 2016 Zhenquiang y colaboradores, mediante el uso de células alimentadoras (fibroblastos embrionarios de ratón y fibroblastos de prepucio humano)

cultivaron células madre embrionarias humanas y posteriormente diferenciaron a neuronas dopaminérgicas. La diferenciación se evaluó mediante pruebas de inmunohistoquímica, PCR-tiempo real y microscopia electrónica, finalmente obtuvieron neuronas funcionales. Otro elemento que fue utilizado en este experimento y que es importante mencionar es el SFB que aunque se considera un xeno-aditamento contiene abundantes factores de crecimiento y menor cantidad de inmunoglobulinas, así como, niveles pequeños de proteínas de sistemas de complemento las cuales tienen el efecto de lisar células en cultivo e interferir con inmunoensayos. Se realizaron ensayos histológicos con azul alciano mostro la presencia de compuestos sulfatados similares a los que componen la matriz extracelular del cartílago y la tinción con safranina O reveló la producción de glicosaminoglicanos que son secretados por condrocitos maduros. Los análisis inmunohistoquímicos se ven más expresados en los tratamientos 60% MB - 40 % MC y 50% MB -50% MC para colágena II, agrecano y sox 9, lo que indicó que la diferenciación condrogénica de las CTM fue mejorada por el sobrenadante de condrocitos.

Se realizó un ensayo estadístico para demostrar cuál de todos los tratamientos contenía los elementos necesarios para diferenciar y proliferar las CTM, encontrando que el que ofrece mejores resultados y beneficios es en el que se usó 50% de MB y 50% de MC., con este tratamiento de disminuye el uso de SFB y se utilizan los factores de crecimiento en la cantidad requerida por las células.

El punto más importante de esta investigación es que se ha logrado diferenciar células madre creando un sistema de cultivo en el cual se limita el uso de xeno-alimentadores; las células alimentadores desempeñaron un papel determinante para la propagación celular y su diferenciación hacia tejido condral, esto se ve expresado en la producción de matriz extracelular y la expresión de ciertas moléculas propias del tejido cartilaginoso. De esta forma las células alimentadoras pueden proporcionar un microambiente favorable para el desarrollo celular.

IX. CONCLUSIÓN

1. Se cultivó con éxito las biopsias de cartílago, de las cuales se obtuvieron los sobrenadantes que se utilizaron como suplemento para los distintos tratamientos de las células mononucleares de médula ósea.
2. Se consiguió aislar células mononucleares de médula ósea, de igual manera se realizaron cultivos para clonaras *in vitro*.
3. Se evaluó la plasticidad de las células mononucleares aisladas de médula ósea, logrando diferenciarlas hacia linaje condral y adiposo.
4. La otra parte de las células mononucleares que fue utilizada para implementar los distintos tratamientos arrojó que los porcentajes 100% MB - 0% MC, 70% MB - 30% MC, 60% MB - 40% MC y 50% MB - 50% MC son estadísticamente iguales por lo tanto el tratamiento de elección para diferenciar las células troncales mesenquimales a tejido condral sería el 50% MB y 50% MC. Ya que se obtuvo buena diferenciación y crecimiento celular, nos permite utilizar menos suplementos de origen animal y evitar todos los riesgos de los cuales se han hablado a lo largo de este documento, así como minimizar los costos de tratamientos.

Podemos concluir que existe la manera de realizar cultivos condrales satisfactorios utilizando suplementos provenientes de células alimentadoras que también son cultivadas en el laboratorio bajo todos los estándares de calidad cumpliendo con los criterios de cultivo y diferenciación hacia tejido condral.

Al ser el tejido cartilaginoso también susceptible a afectaciones en la especie equina resulta de gran importancia los avances en cuanto a técnicas y tratamientos que se obtengan para el mejoramiento en la calidad de recuperación de los tejidos dañados.

X. BIBLIOGRAFÍA.

- Alvarez J., Soto M.: Bioquímica y biología del cartílago articular. *Rev. Ort. y Traumatol.* 2002;5:391-400.
- Amable P., Borojevic R., et al: Mesenchymal stromal cell proliferation, gene expression and protein production in human platelet-rich plasma-supplemented media. *PLOS ONE.* Vol.9, Issu. 8. Pag. 1-9. 2014.
- Arevalo R., Rodríguez P.: *Celulas Madre Mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas.* 2007.
- Bataglia L., Koziner B., et al: técnica de cultivo de condrocitos autólogos. *Rev. ARTROSCOPIA.* Vol.10 num. 1:51-54.2003.
- an L., Burdick J.: Coculture of human mesenchymal Stem cells and articular chondrocytes reduces hypertrophy and enhances functional properties of engineered cartilage. 2011. Vol.17. No 7. And 8.
- Bianco P., Simmons P.: Mesenchymal Stem cells: Revisiting History, Concepts and Assays. 2008 April. 10; 2(4) 313-319.
- Campos F.: El cartílago articular: aspectos mecánicos, y su repercusión en la reparación tisular. *Rev. Ortop. Traum.* 2002; 5:380-390.
- Chevalier X., Richette P.: Cartílago articular normal: Anatomía, fisiología metabolismo y envejecimiento. *EMC ap.loc.* vol. 38. Issue 2. 2005. Pag1-13.
- Castells C., Martorell J., Balcells M.: A human plasma derived supplements preserves function of human vascular cells in absence of fetal bovine serum. *Cell and Bioscience.* 2017 14;7:41.
- Dominici M., Horwitz EM.: Minimal criteria for defining multipotent Mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* (2006) Vol.8, No.4, 315-317.
- Falke G., Atala A.: Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando Ingeniería de Tisular. *Arch. Argent.pediatr.*2000; 98(2):103.
- Follente C., Arias P., Rivera S.:cultivos de condrocitos.*Rev. Ort. y Traum.* 2002;5:436-443.
- Fortier L., Travis A., et al: Stem Cells in Veterinary Medicine. 2011, 2:9.
- Fortier L., Nixon AJ, Williams J, Cable CS., et al: Isolation and chondrocyte differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet_Res.* 1998 Sep; 59(9):1182-7.
- Garciadiego D., Ibarra JC., et al.: Regulation of $\alpha 5$ and αV integrin expression by GDF-5 and BMP-7 in chondrocyte differentiation and osteoarthritis. *PLOS ONE DOI:* 101371.2015.
- Hu G., Jin Y., et al.: Supernatant of bone marrow mesenchymal stromal cells induces peripheral blood mononuclear cells possessing mesenchymal features. *Int.J.Biol.Sci.*2011; 7(3) 364-375.
- Ibarra JC., Velasquillo C. et al.: Ingeniería de Tejidos y Osteoarthritis. *Reumatol Clín.* 2007; 3 Supl 3:S19-22.
- Jochems CE., Baumans V., et al: The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim.* 2002, 30(2):219-27.
- Penny J., Mobasher A.: The biology of equine mesenchymal stem cell: cell surface markers and multilineage differentiation. 2012. *Front, in Bios.* 17, 892-908.

- Perez S., Ramirez A., Piña: Mesenchymal Stem Cells: Biology, characterization and future applications to animal health and production of domestic species and livestock. Julio de 2012. Artículo en *Agrociencia* 46:543-555.
- Simón T., Jackson W.: Articular Cartilage: Injury pathways and treatment options. 2006.
- Ranera-Beltral: Celulas Madre Mesenquimales equinas: obtención y análisis de sus propiedades *in vitro*. Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal. Universidad de Zaragoza. 2012.
- Román J, Serrano J, Jiménez A, et al. Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in Bcr-Abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Haematologica* 2000; 85:173-80.
- Leyh M., Grässel. Osteoarthritic cartilage explants affect extracellular matrix production and composition in cocultured bone marrow-derived mesenchymal stem cells and articular chondrocytes. 2014.
- Llames S., Garcia P., et al: Feeder layer cell actions and applications. *Terms*. vol.21.2015; núm. (4). 345-353.
- Pineda Abraham: Evaluación morfológica de células pluripotenciales mesenquimales de equino en un polímero biodegradable. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. FMVZ UNAM, 2011.
- Macias A., Valle P., et al.: Phenotypical and functional features of the Mesenchymal and endothelial Stem Cells. *Revista cubana de Hematología e Inmunología*. 2010; 26 (4) 256-275.
- Mannello F., Tonti G., et al.: No breakthroughs for human Mesenchymal and Embryonic Stem Cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder free: medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement, nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cell* 2007;25:1603-1609.
- Masri D, Ibarra C., et al.: Matrix-encapsulation cell-seeding technique to prevent cell detachment during arthroscopic implantation of Matri-induced autologous chondrocytes. 2007.
- Martinez S.: Estudio *in vitro* de la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales, procedentes de médula ósea humana, sobre biomateriales de colágena. 2012.
- Nervi B, DiPersio F.: Cytokines and Hematopoietic Stem Cell mobilization. B. Nervi, F. DiPersio. 2006.
- Nieto A.: Ingeniería de tejidos oro-faciales elaborado por transdiferenciación de Celulas Troncales Mesenquimales Humanas. 2010.
- Owida HA., Kuiper NJ., et al: Co-culture of chondrons and mesenchymal stromal cells reduces the loss of collagen VI and improves extracellular matrix production. *Histochem cell boil*. 2017. doi: 10.1007/s00418-017-1602-4.
- Olivos A., Ibarra JC., et al: Co-culture of dedifferentiated and primary human chondrocytes obtained from cadaveric donor enhance the histological quality of repair tissue: an in-vivo animal study. *Cell Tissue Bank*. 2017. doi: 10.1007/s10561-017-9635-4.

- Richards M., Bongso A., et al: Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells 2003; 21:546-56.
- Schminke B., Miosge N.: Cartilage repair in vivo: the role of migratory progenitor cells. 2014. 16:461.
- Song F., Fan W., et al.: Comparison of the efficacy of the Bone Marrow mononuclear cells and bone mesenchymal Stem cells in the treatment of osteoarthritis in a sheep model. 2014; 7 (4): 1415-1426.
- Steinert A., Tuan R., et al.: The clinical application of Mesenchymal Stem cell of musculoskeletal regeneration: current status and perspectives. 2012;1:237-247.
- Stojkovic P., Stojkovic M.; An autogenic feeder cell system that efficiently supports growth undifferentiated human embryonic stem cell. 2005; 23:306-314.
- Van der Valk J., Gstraunthaler G., et al.: Fetal bovine serum (FBS): past-present-future. ALTEX 2017. doi: 10.14573/1705101
- Velasquillo C., Ibarra JC., et al.: Diferenciación del cartílago articular y osteoarthritis. Reumatol. Clín. 2007; 3 Supl 3:S2-5.
- Villa L., Krebsbach P.H.: The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings. 2013; 31: 1-7.
- Vinatier c., Noël D.: Cartilage engineering: a crucial combination of cells, bio materials and biofactors.2009. Trends in Biotechnology vol. 27. No.5.
- Windt T., Saris D.: Unraveling Stem Cell co-cultures in Regenerative Medicine: Which cell interactions steer cartilage regeneration and how? 2014; 3:723-733.
- Xu T., Ding S. Chemical Approaches for modulating lineage-specific Stem Cells and progenitors. 2013; 2:355-361.
- Zhang X., Liu K.: Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived stem cells culture in the supernatant of elastic cartilage cell. Molecular Medicine Reports 12: 5355-5360, 2015.
- Zhenqiang Z., Xinfeng L., et al.: Effects of feeder cells on dopaminergic differentiation of human Embryonic Stem Cells. Front. Cell. Neurosc. 10:29. Doi: 10.3389/fncel.2016.00291.
- Zinkl J., Andresen JW: Haematological, bone marrow and clinical chemical changes in neonatal foals given canine recombinant granulocyte-colony stimulating factor. 1994 Jul; 26(4):313-8.

XI. ANEXOS

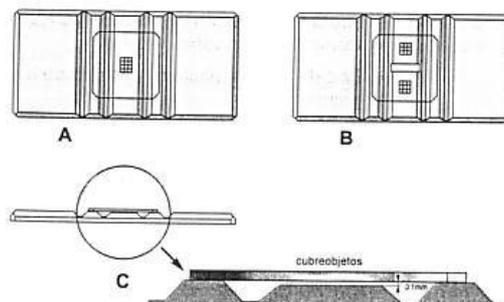
Anexo 1

El azul tripano (Invitrogen, Carlsbad, California) es un compuesto hidrofílico el cual se utiliza para medir la viabilidad celular ya que por sus capacidades fisicoquímicas, penetra en las células muertas dando una tonalidad de morado distinta al blanco que reflejan las células vivas por no dejar entrar al colorante.

- 1.- Se centrifuga la muestra a 300 g por 5 minutos
- 2.- Se elimina el sobrenadante
- 3.- Se resuspende en medio de cultivo el pellet de preferencia pocos mililitros
- 4.- Se toman 100 μ l de muestra y 100 μ l de azul tripano; se revuelven bien
- 5.- Se recuperan 100 μ l de la suspensión celular y se deslizan en la cámara de Neubauer

Nota: La cámara de Neubauer consta de ranuras finamente marcadas en el vidrio, en las cuales se lleva a cabo el conteo de células vivas, tomándose como vivas a las células que emitan un color blanco.

La cámara en la zona de conteo tiene 25 zonas de las cuales se toman las 4 zonas de las esquinas y la zona central para calcular el promedio de células vivas.



Se multiplican por 2 ya que son dos cámaras, y el resultado dará el total de células $\times 10^4$ en 1 ml y multiplicado por el número de ml empleados para resuspender la muestra nos da el número total de células vivas en la muestra.

Anexo 2

TRIPSINIZACIÓN

Técnica de cosecha celular con tripsina. La tripsina es una enzima proteolítica que rompe los enlaces de la célula en cultivo y su cama (poli-L-glicina).

- 1.- Se debe preparar la tripsina a una concentración de 0.25%
- 2.- Se suministran 3 ml por caja T 75 de cultivo
- 3.- Se deja por 5 minutos
- 4.- Por último se neutraliza la enzima con suero bovino fetal o solución al 10% de albúmina en PBS
- 5.- Se centrifuga toda la muestra a 300 g por 5 minutos
- 6.- Se retira el sobrenadante y se lavan las células con PBS
- 7.- Repetir los pasos 5 y 6 dos veces más para eliminar toda la tripsina restante

Anexo 3

Técnica de tinción

Azul Alciano al 0.5 %

	50 ml	100 ml	250 ml
Azul Alciano	0.25 gr	0.5 gr	1.25 gr.
HCl 0.1 N	50 ml	100 ml	250 ml

- 1.- Fijar las muestras con PFA por 20'.
- 2.- Agregar el Azul Alciano hasta cubrir las muestras y dejar toda la noche.
- 3.- Retirar el colorante y agregar el HCl 0.1 N hasta cubrir las muestras por 5'.
- 4.- Lavar con PBS dos veces por 30' cada uno.
- 5.- Almacenar las muestras a 4 °C.

Anticuerpos

Detección	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Sox-9	Anti sox-9 conejo Sc- 20095 Santa Cruz CA, EU.	Acoplado a FITC verde anti IgG conejo Ab-6717
Agrecano	Anti AGR ratón Sc-33095 Santa Cruz CA, EU.	Rojo Texas anti-IgG ratón Sc-2092
Colágena II	Anti col II ratón Sc-29958 Santa Cruz CA, EU.	Acoplado a FITC verde anti-IgG ratón Ab-6785