



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL.

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS TRONCALES
MESENQUIMALES EN CABALLOS Y CERDOS A PARTIR
DE SANGRE PERIFÉRICA Y TEJIDO ADIPOSO.

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
RICARDO GÓMEZ GARCÍA.

TUTOR:
Dr. JOSÉ CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN.

COMITÉ TUTORAL:
Dra. MARÍA MASRI DABA
Dr. CARLOS IGNACIO SOTO ZÁRATE

MEXICO D.F

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A mi hijo José Ricardo lo más maravilloso del mundo.

A mi esposa Pamela por su apoyo y consejos durante todo este tiempo que he vivido con ella, es una luz en mi camino.

A mi Madre por todo su cariño y fe, porque lo que soy se lo debo a ella.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas y cada una de las personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

A mi tutor el Dr. Clemente, Dra. Masri, Dr. Zárate, Dra. Velasquillo, Carlitos, Val, Érika, Xochitl y a mis hermanos Arturo y Fernando.

También les doy las gracias a los integrantes de mi jurado, la Dra. Cobos, el Dr. Anzaldúa, el Dr. Villalobos y el Dr. Hazan.

	INDICE	Página
I.	LISTA DE FIGURAS	V
II.	LISTA DE ABREVIATURAS	VI
III.	RESUMEN	VII
IV.	ABSTRACT	VIII
V.	INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA	9
VI.	HIPÓTESIS	17
VII.	OBJETIVO GENERAL	18
VIII.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
IX.	JUSTIFICACIÓN	20
X.	MATERIALES Y MÉTODO	21
XI.	RESULTADOS	31
XII.	DISCUSION	44
XIII.	CONCLUSIONES	48
XIV.	BIBLIOGRAFIA	49
XV.	ANEXOS	58

Lista de figuras

Figura:	Página
Figura 1. Tubo de polipropileno con Ficoll.	22
Figura 2. Proceso de digestión en agitador orbital.	23
Figura 3. Cultivos primarios.	26
Figura 4. Células en confluencia.	28
Figura 5. Cultivo de células en "pellet".	28
Figura 6. Citometría de flujo con células sanguíneas de caballo.	32
Figura 7. Citometría de flujo con células sanguíneas de cerdo.	32
Figura 8. Citometría de flujo con células adiposas de caballo.	33
Figura 9. Citometría de flujo con células adiposas de cerdo.	34
Figura 10. Muerte celular por cambio de medio.	35
Figura 11. Cartílago maduro teñido con azul alciano.	36
Figura 12. Cambio de fenotipo de precursores sanguíneos a condrales.	36
Figura 13. Cambio de fenotipo de precursores adiposos a condrales.	37
Figura 14. Cambio de fenotipo de presursores sanguíneos a adiposas.	38
Figura 15. Cambio de fenotipo de precursores adiposos a adiposas.	39
Figura 16. Tinción de cultivos con rojo nilo	40
Figura 17. Cambio de fenotipo de presursores sanguíneos a neurales.	41
Figura 18. Precursores sanguíneos positivos a nestina	42
Figura 19. Cambio de fenotipo de precursores adiposos a neurales.	42
Figura 20. Detección de nestina en cerebro maduro de raton.	43

Lista de Abreviaturas

Células Troncales Mesenquimales	CTM
Instituto Médico Howard Hughes	HHMI
Centro de Fertilización <i>in Vitro</i> de Boston	IVF
Células troncales de individuos adultos	CTA
Células troncales mesenquimales extraídas de médula ósea	CTMmo
Designación de grupo "cluster designation"	CD
Instituto Nacional de Rehabilitación	INR
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Revoluciones por minuto	RPM
Fluoresceína	FITC
Dulbecco's modified Eagle's medium	DMEM
Solución salina buferada	PBS
Paraformaldehido	PFA
Suero fetal bovino	FBS
Dimetil sulfóxido	DMSO
Butirato de hidroxianizol	BHA
Diaminobencidina	DAB
Medio mínimo esencial alfa	Alfa MEM
β -mercaptoetanol	BME

III. RESUMEN

Las células troncales son células inmaduras que tienen la capacidad de generar diferentes tejidos dependiendo del sitio de aislamiento; éstas, pueden ser empleadas como tratamiento en diversas enfermedades. El aislamiento de este tipo de células, es complicado debido a que las fuentes disponibles en el organismo son de difícil acceso. La sangre periférica y el tejido adiposo poseen una población de células inmaduras que pueden ser aisladas sin dificultad, por otro lado son tejidos de fácil acceso en el organismo y no dejan secuelas prolongadas en los pacientes. En este trabajo de investigación se aisló una fracción de células a partir de sangre periférica y tejido adiposo, las cuales fueron marcadas con anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de superficie específicos de células troncales mesenquimales (CD34, CD45, CD47, CD14, CD117, CD90, CD73), dando como resultado lecturas positivas al ser analizadas por medio de citometría de flujo. La población se cultivó *in vitro* y fueron sometidas a varios protocolos de diferenciación, utilizando medios de cultivo específicos para células inmaduras enriquecidos con factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante, suero fetal bovino) y fármacos (dexametasona, forskolina, ácido valpórico). En los cultivos, se logró obtener células con características cartilaginosas, adiposas y neurales; esto debido a que se realizaron técnicas de inmunohistoquímica detectando componentes específicos de cada tejido al que se quería diferenciar. Finalmente, se puede asumir que es factible aislar células inmaduras de sangre periférica y tejido adiposo, positivas a los marcadores de células troncales mesenquimales las cuales bajo las condiciones de cultivo adecuadas pueden ser capaces de generar linajes celulares diferentes al tejido del cual se aislaron.

IV. ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (msc) have the capacity to generate different tissues; these could be used to treat various diseases. The isolation of msc can be complicated depending on the sources from which they are obtained. Peripheral blood and adipose tissue are potential sources of these cells that can be isolated easily, with little harm or pain to the patient, leaving no sequelae. Samples of peripheral blood and adipose tissue were obtained to isolate cells, which were marked with monoclonal antibodies that recognize specific stem cell antigens (CD34, CD45, CD47, CD14, CD117, CD90, CD73), giving positive readings by flow cytometry; cells were cloned *in vitro* using several protocols of cell differentiation with specific media for immature cells enriched with growth factors (transforming growth factor, fetal bovine serum, etc.) and dexamethazone, forskolin, valporic acid, etc. The cultures obtained showed cells with cartilaginous, adipose and neural characteristics by immunohistochemistry. Thus we demonstrated that it is feasible to isolate immature cells from peripheral blood and adipose tissue, positive to stem cell markers which under specific culture conditions can generate specific cell lineages, different to the tissue from which they were isolated.

V. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

En la actualidad la ciencia de la salud ha tenido avances sin precedentes de tal forma que tanto en medicina humana como veterinaria, los diagnósticos son más oportunos y acertados dando lugar a tratamientos más efectivos para afecciones de diferente índole. Sin embargo algunos de los tratamientos más efectivos son muy costosos o dejan a los pacientes con largos periodos de convalecencia.

Existen enfermedades como la osteoartritis presente tanto en medicina humana como veterinaria cuyos tratamientos se caracterizan por ser costosos, con resultados subóptimos; en los procedimientos reportados el tejido de reparación es de poca celularidad, friable y de consistencia diferente al cartílago articular. Las técnicas quirúrgicas originalmente descritas requieren de cirugía abierta con mayor riesgo de complicaciones¹. Con el uso de condrocitos autólogos se requieren dos cirugías para llevar a cabo el procedimiento. La primera para la obtención de una biopsia de cartílago de donde se obtienen las células viables para expandir *in vitro* y la segunda para implantar el constructo con las células cultivadas y expandidas *in vitro*², por lo tanto, el paciente se somete a varias cirugías y a un tiempo prolongado de recuperación. Existen estudios a corto y mediano plazo mostrando posible reincidencia de la lesión condral³.

La medicina regenerativa, está encaminada a la regeneración de los tejidos del organismo (conjunto asociado de células de la misma naturaleza, diferenciadas de un modo determinado, ordenadas regularmente, con un comportamiento fisiológico común), para recuperar tanto sus características biológicas como funcionales.

La terapia celular es una línea de investigación aún en desarrollo que ya se ha estado empleando de forma clínica; esta se fundamenta en el uso de células funcionales inducidas en el sitio de lesión, (donde el tejido ha perdido sus características específicas) para ayudar a la recuperación funcional y estructural del tejido u órgano afectado.

La introducción de la medicina regenerativa como parte de los tratamientos para enfermedades como la leucemia⁴⁻⁶, o simplemente para la reparación de tejidos lesionados⁷⁻¹² ha tomado auge desde ya hace varios años. El interés médico es regenerar los tejidos dañados y reducir la cicatrización de los mismos; entendamos cicatrización como la formación de tejido fibroso diferente al que originalmente se encontraba en el sitio de la lesión; el tejido fibroso se caracteriza por su poca celularidad; de tal forma que las pocas células del tejido original junto con los fibroblastos que llegaron al sitio poseen poco o nulo funcionamiento y el tejido pierde sus características funcionales iniciales. La reparación de un tejido lesionado incluye incrementar el número de células funcionales en el sitio de lesión de tal forma que se recuperen las características fisiológicas iniciales que se poseían antes de la lesión¹³⁻¹⁸.

Se han utilizado infinidad de tratamientos cuyo principio es la terapia celular como el trasplante de médula ósea para tratar la leucemia o terapias mieloablativas, el trasplante de células autólogas como los condrocitos en la reparación de lesiones condrales de la superficie articular, los implantes de piel como terapia para lesiones por quemaduras, entre otros; sin embargo los resultados han sido poco duraderos y las lesiones tratadas generan tejido fibroso sin la recuperación adecuada de la función inicial¹³.

En busca de alternativas, se ha desarrollado una línea de investigación, utilizando células inmaduras que no tienen ninguna característica específica, dependiendo del sitio de aislamiento y se les ha llamado células troncales.

Las células troncales mesenquimales (CTM) están siendo utilizadas ampliamente para elaborar los productos con fines de terapia celular. Su uso en combinación con polímeros biocompatibles y biodegradables presenta una alternativa para la solución de problemas articulares tanto en equinos, como en humanos. Se requiere obtener una gran cantidad de células en cultivo (mínimo 1×10^6 células) para poder emplearlas en la reparación condral. Existe una gran diversidad de lugares de los cuales se pueden obtener este tipo de células, a saber; sangre periférica, tejido adiposo, médula ósea, estrato corneo de la piel, etc. La obtención puede ser a partir de médula ósea que es de fácil colección y a su vez se cultivan y expanden *in vitro* para poder obtener los números necesarios para un implante. Las células aisladas de individuos adultos o multipotenciales (CTM) tienen ya una línea de diferenciación por el hecho de estar en un tejido determinado; sin embargo son capaces de generar otro tipo celular diferente si se estimulan por medio de factores de crecimiento y fármacos en el medio de cultivo¹⁹⁻²². Es necesario señalar que estas células a pesar de estar destinadas a un linaje celular, se consideran inmaduras ya que no son funcionales de tal forma que pueden ser estimuladas para generar células funcionales en el organismo vivo o en cultivo.

Le llamaremos plasticidad a la capacidad de un tipo celular para generar otro tipo funcional de un tejido determinado. Las células troncales de individuos adultos (CTA o multipotenciales) están presentes en distintos tejidos especializados del organismo, encontradas en estado indiferenciado o inespecífico, son capaces de autorenovarse (clonarse) o generar células especializadas (progenitores/precursores) del tejido de donde es originaria pero con la posibilidad de generar los tipos celulares (plasticidad) de la placa embrionaria que es originaria dicho tejido²³; para su diferenciación es necesaria la estimulación por medio de factores añadidos al medio de cultivo.

Para poder utilizar las CTM es necesario aislarlas del organismo y caracterizarlas; las técnicas descritas hasta ahora como la que describe el doctor Verma²⁴ en su artículo son traumáticas para los pacientes y necesitan de estudios y logística para la manipulación de las muestras; de tal forma que un perfeccionamiento de la técnica representa un avance en el bienestar de los pacientes; en mi trabajo se describen dos técnicas de aislamiento que son menos traumáticas para el paciente y al mismo tiempo se obtienen CTM con capacidad de autoregenerarse produciendo células precursoras las cuales es posible estimular para redirigir su linaje²⁵⁻²⁷.

El reto que abordamos en este proyecto compete terapia celular ya que se intenta aislar células inmaduras para estimularlas *in vitro* y formar un tejido con características funcionales para poder emplearlas como terapia en Medicina Veterinaria en diferentes tratamientos que enumeraremos posteriormente. Lo que se busca usando este tipo de células es regenerar tejidos u órganos que han perdido su función.

La función celular es determinada, entre otros factores, por la inactivación de genes mediante procesos de restricción (metilación del ADN). Los genes activos generan en la célula un fenotipo y función característica es esto le denominaremos “programación” celular. Esta programación se copia en cada división celular a la nueva hemicadena de ADN, para que el fenotipo sea transmitido correctamente a todas las células descendientes.

La metilación de la nueva hemicadena es posible gracias a que la célula posee un mecanismo activo que mantiene el “programa” celular. Algunos tipos celulares cuentan, además, con mecanismos de des-metilación que permiten a la célula disponer de nuevo de los genes previamente reprimidos.

Las células troncales mesenquimales (CTM) presentan un fenotipo característico evaluado con la presencia o ausencia de ciertos marcadores de superficie (receptores específicos)^{25, 28-30}; esto quiere decir que las células indiferenciadas expresan estos receptores facilitando su reconocimiento al ser aisladas de las diferentes fuentes de células conocidas. Un ejemplo de marcadores de superficie son CD166, CD105, CD73, CD68, CD34, CD22, CD13, CD71³¹⁻³³, CD135³⁴. Otra forma de reconocer las células troncales mesenquimales es por su capacidad de adherencia a las placas de cultivo.

En muchos protocolos el aislamiento de células mesenquimales se realiza cultivando una población y las células que se adhieran a la superficie de contacto, son consideradas células troncales; aunque esto no se confirma hasta que se prueba la plasticidad de esas células adherentes.

En diversos estudios se ha demostrado en humanos la plasticidad de las células troncales mesenquimales extraídas de médula ósea (CTMmo) de individuos adultos para diferenciarlas a células de diferentes tejidos^{23, 35-42}; la médula ósea es la fuente de células troncales mesenquimales (CTM) más abundante que se conoce (en humanos 1 de cada 10 000 células es una célula troncal hematopoyética) sin embargo la técnica de extracción es un tanto invasiva.

Las células inmaduras encontradas en sangre periférica son llamadas precursores de linaje hematopoyético, destinadas a formar células comprometidas con el linaje linfocitario y tienen su origen en médula ósea de tal forma que si se aíslan y se estimulan pueden generar otro tipo celular diferente al hematopoyético^{40, 43-46}. En diversos estudios se ha demostrado la plasticidad de las células precursoras aisladas de sangre periférica^{40, 47-49}; sin embargo se requiere del desarrollo de técnicas de ingeniería de tejidos y cultivo celular para poder llegar a una estimulación integral de las células inmaduras para encaminarlas hacia el linaje que se quiere^{40, 43, 44, 50}. El método de aislamiento por medio de sangre periférica se ha llevado a cabo en muchas terapias celulares un ejemplo es la extracción de precursores para trasplantar a

pacientes sujetos de una terapia mieloablativa que deje su organismo sin células de defensa, los precursores son extraídos de la médula ósea^{45, 49, 51-53} y se administran al paciente después de su terapia de radiación o quimioterapia para repoblar su organismo con células de defensa.

El tejido adiposo a parte de estar constituido por adipocitos cuenta con células sanguíneas, endoteliales, y precursores de adipocitos con distintos grados de diferenciación, fundamentalmente fibroblastos (células intersticiales o vacías de lípidos), células mesenquimales pobremente diferenciadas (poseen pequeñas gotas de lípidos) y células grasas muy pequeñas. Aunque el origen embrionario de las células grasas no es del todo conocido, varios estudios han sugerido que la línea adipocitaria deriva del mesodermo y que posee la capacidad para diferenciarse en células comprometidas hacia el desarrollo de varios tipos celulares determinados, tales como adipocitos, condrocitos, osteoblastos y miocitos⁴², por esto el tejido adiposo es una fuente de células multipotentes con la capacidad de diferenciarse a linajes mesenquimales. Cuando las células de grasa maduras se mantienen en cultivo se exhiben dos poblaciones de fibroblastos, positivas a CD13, CD90, y CD105, moderadamente positivas a CD9, CD166, y CD54, y negativas a CD31. CD34, CD66b, CD106, y CD117,⁵⁴⁻⁵⁶.

Del tejido adiposo se puede obtener gran número de células 308,849 por mililitro de lipoaspirado en humanos^{11, 34, 54, 57-60} esto convierte a la grasa en una fuente alternativa en pacientes que necesitan la reparación de algún tejido dañado por terapia reconstructiva. En animales no hay datos publicados hasta ahora acerca del número de células troncales mesenquimales^{11, 34, 57-60} que se pueden encontrar tanto en sangre periférica como en tejido adiposo, pero es uno de los objetivos del trabajo esclarecer este punto.

Las células multipotentes se reducen en número a medida que el individuo crece de tal forma que la capacidad regenerativa de los tejidos se ve disminuida. Con respecto a esto la terapia celular se toma como alternativa de tratamiento a lesiones locales como los desgarres tendinosos, lesiones de médula espinal e inclusive quemaduras o lesiones cutáneas. Con esto se remarca que la medicina actual va encaminada hacia la regeneración como tratamiento; esta área es relativamente nueva en Medicina Veterinaria aquí en México y las posibilidades de aplicación son muy amplias.

Las lesiones en sistema nervioso central y periférico independientemente de su capacidad de regeneración serían favorecidas con el tratamiento de células troncales mesenquimales diferenciadas a neuronas astrocitos y oligodendrocitos⁶¹⁻⁶⁴.

Las lesiones en cartílago articular, ligamentos y tendones^{14, 65-67}, son un candidato al tratamiento con CTM diferenciadas como alternativa a los tratamientos para patologías como la osteocondritis disecante, desgarres tendinosos y ruptura de ligamentos.

El aislamiento de células troncales mesenquimales^{14, 65-67} representa un avance sin precedente ayudando a evaluar su plasticidad al estimular los cultivos hacia diferentes líneas celulares. Por otro lado la sangre periférica como fuente de CTM en humanos adultos ($4 \times 10^6/L$)^{68, 69}; es considerada práctica y poco invasiva, esta técnica de extracción ha demostrado la obtención de CTM con plasticidad parecida a las CTMmo.

Hoy en día, existen compañías y personas que sobre valoran el tratamiento con células troncales, las cuales se dedican a comerciar utilizandolas para un sin fin de alteraciones en las que ni siquiera se ha comprobado un efecto regenerativo originado por la propia célula ya que utilizan muy pocas o no aplican una manera efectiva para hacerlas llegar al sitio de lesión.

Se han reportado numerosos éxitos en modelos animales y humanos aún emergentes como son enfermedad de Crohn^{70, 71}, infartos y otras muchas aplicaciones clínicas que se han hecho con estas células troncales adultas^{72, 73}, sin embargo esta tecnología sigue en desarrollo y se necesitan muchas pruebas para poder llegar a la aplicación clínica.

VI. HIPÓTESIS

Existen células troncales mesenquimales en sangre periférica y tejido adiposo, entonces es posible aislarlas, caracterizarlas y diferenciarlas.

VII. OBJETIVO GENERAL

Aislar células troncales mesenquimales de sangre periférica y tejido adiposo para comprobar la presencia de marcadores de superficie y evaluar su plasticidad.

VIII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar células de sangre periférica y tejido adiposo de caballo y cerdo.
- Analizar las células obtenidas en busca de células positivas a los marcadores presentes en células inmaduras (Precursores o Células Mesenquimales; CD34, CD45, CD47, CD14, CD117, CD90, CD73).
- Documentar la cantidad de células obtenidas de cada especie.
- Clonar células positivas a los marcadores de células inmaduras en cultivo.
- Diferenciar las células positivas en células con características de condrocitos.
- Diferenciar las células positivas en células con características de adipocitos.
- Diferenciar las células positivas en células con características de astrocitos.

IX. JUSTIFICACIÓN

Se han utilizado tratamientos a base de células autólogas somáticas para lesiones de cartílago articular, con resultados parcialmente adecuados y costosos con problemas de logística y traumáticos para el paciente.

Las células troncales son capaces de ser diferenciadas en varios tejidos incluyendo el cartilaginoso y por su carácter de inmadurez, representan una alternativa novedosa ya que no desencadenan respuesta inflamatoria al utilizarse en alotransplantes.

Dadas las desventajas prácticas y clínicas para el aislamiento de células a partir de médula ósea, técnicas menos invasivas pueden representar una alternativa a los tratamientos favoreciendo a los pacientes. La sangre y el tejido adiposo puede ser un candidato ideal práctico.

El método de aislamiento propuesto representa una técnica menos invasiva para el aislamiento de estas células y la fácil manipulación del tejido extraído facilita su empleo quirúrgico.

En el campo médico con equinos de alto rendimiento y las alteraciones musculoesqueléticas que se ven día con día son candidatas exactas para el tratamiento con células troncales mesenquimales diferenciadas.

X. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Estandarización del cultivo de Células troncales mesenquimales.

Se obtuvieron 12 muestras de sangre periférica y tejido adiposo de cerdos y caballos destinados al abasto, las cuales fueron procesadas para el aislamiento de células troncales mesenquimales en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). Los animales no presentaban ningún tipo de alteración fisiológica aparente y se encontraban entre los 4 y 7 años de edad (caballos) y entre los 6 y 10 meses de edad (cerdos).

Procesamiento de muestras de sangre.

Las muestras de sangre, se obtuvieron en tubos vacutainer de 5 ml con Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), el volumen con el cual se trabajó fue de 50 ml de sangre periférica extraídos por venopunción de la yugular en caballos y cerdos, las muestras se refrigeraron en una hielera hasta su llegada al laboratorio.

En el INR, las muestras fueron procesadas dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA), cada muestra se colocó en tubos de polipropileno para centrifuga con capacidad de 50 ml (Fig. 1), el volumen de muestra vertido en cada tubo fue de 10 ml, de tal forma que de cada una se tuvieron 5 tubos; esto para hacer una dilución 1:4 con solución salina fosfatada (PBS) [Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA], adicionada con antibióticos/antimicóticos al 1%, penicilina 10,000 UI, estreptomycin 10,000 µg y anfotericina B 25 µg.

Al mismo tiempo se vertieron 15 ml de Ficoll Paque^{MR} (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) en tubos nuevos de polipropileno de 50 ml (cat. CLS430829 Corning) y se vertieron 25 ml de la muestra diluida de sangre y PBS; quedando un volumen final de 40 ml, posteriormente se centrifugaron a 400 x g por 30 minutos.

Después de centrifugarlos, en el tubo de polipropileno de 50 ml se pueden observar 4 fracciones en el fondo del tubo (Fig. 1) quedan los eritrocitos, la siguiente fracción es el Ficoll Paque, sigue la capa de células linfoides y el sobrenadante que consiste en un poco de suero con PBS.

Figura 1. Tubo de polipropileno de 50 ml con las cuatro fases obtenidas por gradiente de concentración separando la muestra de sangre periférica diluida con PBS y Ficoll Paque.



Eliminando el sobrenadante, se tomaron las células que quedaron en la interface linfoide y se lavaron; este procedimiento consistió en diluir la interface tomada con PBS (alrededor de 10 ml, ya que al obtener la interface celular se arrastra suero y Ficoll Paque en un total de 5-8 ml aproximadamente) y se centrifugó a 200 x g por 10 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante. Las células una vez lavadas, se contaron, utilizando un colorante de viabilidad llamado azul tripano (Anexo 1).

Sabiendo el número total de células se dividieron en dos una parte para su análisis por citometría de flujo (marcadores de superficie) y la otra para iniciar su clonación *in vitro*.

Procesamiento de muestras de tejido adiposo.

Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron post mortem (inmediatamente después del sacrificio); se utilizaron guantes e instrumental estéril.

La capa más externa del sitio de obtención, se removió, de tal forma que el tejido de abajo fue considerado menos contaminado, con una navaja de

bisturí se cortó por secciones el tejido adiposo, en el caso de los caballos se obtuvo de la región dorsal del glúteo mayor y en los cerdos se obtuvo de la región mandibular lateral. El peso de la muestra fue de 4 gr de grasa aproximadamente y se introdujo inmediatamente en tubos de 50 ml de polipropileno (Corning, Life Sciences) con 30 ml de solución salina bufferada a pH. 7.4 (PBS) [Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA], adicionada con antibióticos/antimicóticos al 5%, penicilina 10,000 UI, estreptomina 10,000 µg y anfotericina B 25 µg.

Para aislar las células del estroma adiposo, se lavaron con volúmenes iguales de PBS y antibiótico al 10 % (Antibiotic-Antimycotic (100X), liquid, 15240-112, Gibco; Invitrogen Carlsbad, California). Posteriormente para eliminar la integridad del tejido se llevó a cabo la digestión (Fig. 2) con colagenasa tipo I (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ); esto con la finalidad de liberar las células del estroma adiposo.



Figura 2. El proceso de digestión, se llevó a cabo a 37°C por 60 minutos en tubos de 50 ml de polipropileno (Corning, Life Sciences) sujetos en un aparato de agitación continua (Shaker).

La proporción de colagenasa y tejido adiposo fue de 1mg en solución 0.1% (1mg/ml) por cada 0.5 g de tejido adiposo⁷⁴ a los cuatro gramos de muestra se les adicionaron 8 mg de colagenasa I. Después de la digestión, se realizó un procedimiento de centrifugación a 500 x g por 10 minutos. El sobrenadante que se eliminó ya que contenía adipocitos maduros, las células que quedaron en el fondo del tubo formaron un “pellet” o precipitado celular (éstas son llamadas células del estroma⁷⁴).

Las células del estroma, se lavaron para eliminar el exceso de grasa, utilizando PBS y repitiendo el procedimiento dos veces, posteriormente se contaron utilizando azul tripano. Con la población de células obtenida, se procedió a realizar los análisis por citometría de flujo y cultivo primario para su clonación *in vitro*.

Análisis por citometría de flujo.

Las células destinadas a los análisis de inmunotipificación por citometría de flujo, fueron suspendidas en PBS y puestas en contacto con los anticuerpos monoclonales para proteínas de superficie los cuales están marcados con un fluorocromo gracias al cual el citómetro de flujo hace la lectura, evaluando las poblaciones celulares existentes en la muestra.

El procedimiento es el siguiente: de la muestra de sangre periférica o de tejido adiposo, se tomaron 100 000 células las cuales se resuspendieron en 200 uL de PBS utilizando tubos de poliestireno de 5 ml (Falcon, Becton Dickinson) y posteriormente se añadieron 10 uL de la suspensión de anticuerpos. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti CD34, CD45, CD47, CD14, CD117, CD90, CD73 (BD Pharmingen™ wwwbdbiosciences.com). Las muestras se dejaron incubando por 15 minutos en el refrigerador a 4°C; después de este período se procedió a su lectura. Los datos fueron analizados con el software Cell Quest PRO™ (Becton Dickinson). La emisión de fluoresceína (FITC) se midió en FL1, PE en FL2, APC en FL3, y 7-AAD en FL4. Una media de 75,000 eventos fueron analizados con una emisión de laser de 88nm. La estrategia para los portales se hizo conforme a lo publicado por y cols. 1994⁷⁵. Este método analiza una región de la muestra (R1) representada por ejemplo por las células CD34+ seguida por las células CD90+ de la misma región (R2).

Las células englobadas en las dos áreas anteriores se muestran en la tercera región (R3) La compensación electrónica se usó para remover la fluorescencia inespecífica de las lecturas. Para cada marcador se calculó el porcentaje de células positivas analizado su nivel de expresión. El porcentaje

de células positivas se tomó como 99.5% considerándose una población positiva cuando el porcentaje de células positivas al marcador fue mayor a 0.1%⁷⁵.

Cultivo de células troncales mesenquimales.

Las células destinadas a cultivo, tanto de sangre periférica como de tejido adiposo (Fig. 3), se resuspendieron en medio de cultivo base el cual es Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 enriquecido con 5% de suero fetal bovino (FBS: Trace Scientific Ltd., Melbourne, Australia, Uin:53141 Lot:B01249-500) y 1% de antibiótico antimicótico a 37°C con 5% de CO₂^{54,74} y se cultivaron a una densidad de 8×10^3 por cm² en cajas T25 de cultivo de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson). Se dejaron dos semanas en expansión con cambio de medio de cultivo cada dos días utilizando DMEM/F12 enriquecido (Fig. 3). Esta fase del cultivo es muy importante ya que da lugar a la clonación celular y producción de precursores, para aumentar el tamaño de muestra y probar los distintos medios de cultivo al iniciar la estimulación de las células para su diferenciación. Las condiciones de cultivo utilizadas en todos los experimentos son las mismas: 37°C al 5% de CO₂.

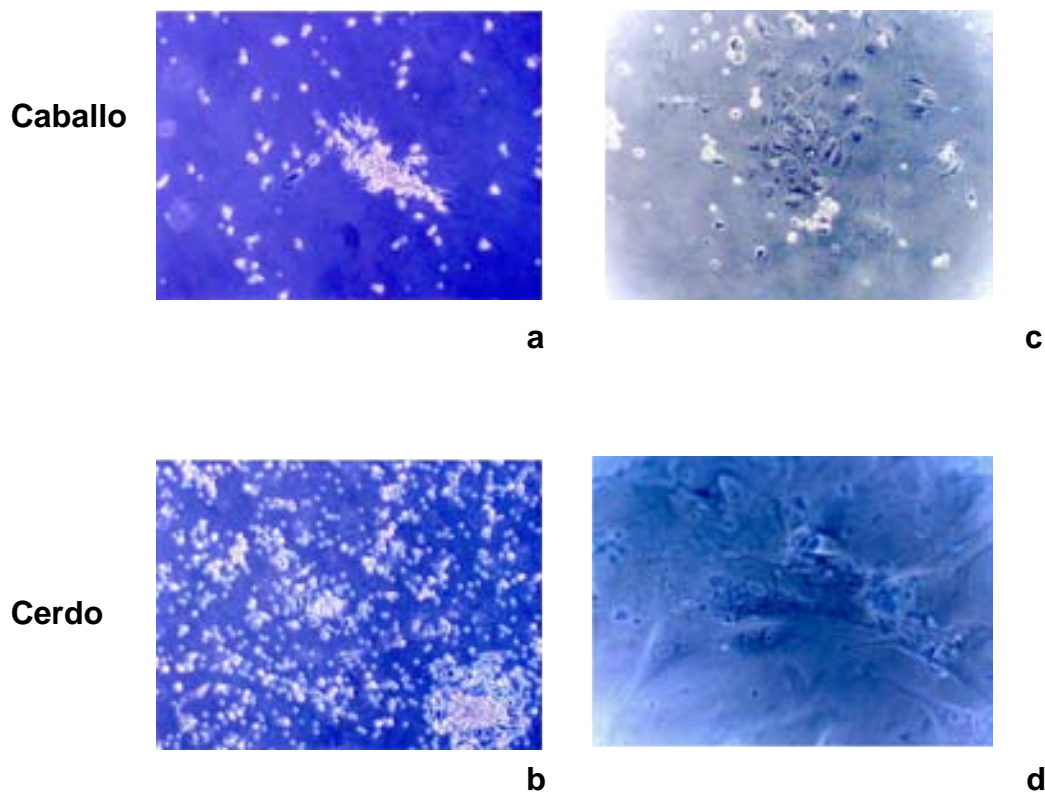


Figura 3. (a,b) CTM de origen sanguíneo; (c,d) CTM de tejido adiposo.

Protocolos de diferenciación celular.

Condrocitos.

Las células tanto de sangre periférica como de tejido adiposo se llevaron a confluencia (que las células llenaran toda la caja, Fig. 4) en las cajas de cultivo de 75 cm², posteriormente se recolectaron utilizando el protocolo para cosechar células con tripsina (anexo 2) y se sembraron en forma de cultivo tridimensional “pellet” (Fig. 5). Se utilizaron tubos de centrifuga de fondo cónico con un volumen de 15 ml de medio de cultivo DMEM F12 enriquecido con 5% de suero fetal bovino (FBS, Trace Scientific Ltd., Melbourne, Australia, Uin:53141 Lot:B01249-500) y 1% de antibiótico antimicótico, el número de células que se utilizó para tal experimento fue de 1.8×10^6 por “pellet”, esto se logró centrifugándolas a 200 x g por 10 minutos para compactarlas y formar el pellet en el fondo del tubo de centrifuga.

El medio de cultivo fue reemplazado por Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), insulina 1.5 mg/ml transferrina 6.26 mg/ml, ácido selénico 6.25 mg/ml, ácido linoleico 5.35 mg/ml, albumina sérica bovina 1.25 mg/ml, piruvato 1mM, fosfato 2 ascorbico 37.5 ng/ml, factor de crecimiento transformante b 3ng/ml, dexametasona 10^{-7} M y se dejó por 3 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 en conglomerado, se realizaron cortes histológicos de los cultivos tridimensionales para teñirlos con azul alciano y corroborar la producción de matriz extracelular.

El procedimiento fue el siguiente: los "pellets" fueron incluidos en una crio-resina la cual sirve para seccionar un tejido dentro del criotomo un aparato que se encuentra a -20°C; la resina sirve para darle consistencia y volumen a la muestra para realizar cortes finos y adherirlos a un portaobjetos.

Al final de todos los cortes cada laminilla se puso en una caja de petri para fijarla con paraformaldehido (PFA) al 4% por 30 minutos, se lavaron las laminillas con PBS dejándola por 5 minutos entre lavado y lavado repitiendo el procedimiento tres veces; finalmente se le añadió el colorante y se dejó a 4°C durante la noche.

Al día siguiente se lavó el exceso de colorante con PBS dejándola por 10 minutos entre lavado y lavado repitiendo por tres veces; finalmente se observaron las laminillas al microscopio.

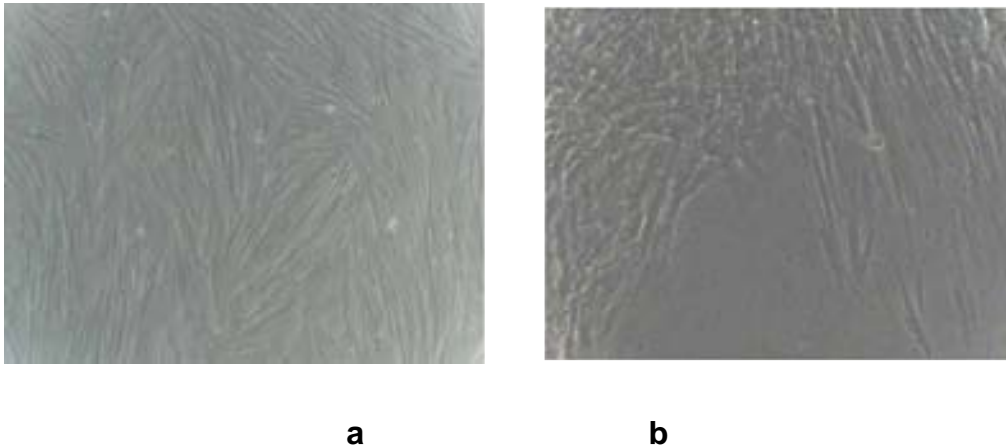


Figura 4. Células de sangre periférica de caballo (a) y cerdo (b) llevadas a confluencia.



Figura 5. Cultivo de células en “pellet”

Adipocitos:

Las células designadas para la diferenciación adipocítica se cultivaron en monocapa sembradas en cajas de cultivo T25 a una densidad de 8×10^3 con el medio de cultivo inicial hasta llegar al 100% de confluencia, posteriormente se cosecharon utilizando tripsina (anexo 2).

Las células fueron resembradas en cajas de seis pozos de 35 mm de diámetro cada pozo, ahí se inició la estimulación para encaminar las células inmaduras a un linaje adiposo, utilizando DMEM, FBS 10 %, insulina 2.5 mg, dexametasona 10^{-6} M, isobutil-metilxantina 0.5 mM, indometacina 60 mM.

Al término de la fase de cultivo se realizó una tinción con rojo nilo; colorante lipofílico que tiñe las vacuolas de los adipocitos; esto con el fin de evaluar la presencia de grasa dentro de las células estimuladas. El procedimiento que se siguió fue el siguiente: los cultivos fueron fijados con PFA al 4% por 30 minutos, posteriormente se lavó con PBS dejándola 5 minutos entre lavado y lavado, finalmente se colocó el colorante cuidando que cubriera toda la superficie del cultivo y se incubó durante la noche; al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS dejándola por 5 minutos entre lavado y lavado, finalmente se observó al microscopio.

Tejido nervioso:

El protocolo a seguir con las células que se designaron para diferenciar hacia un fenotipo de tejido nervioso, fue el siguiente^{76,77}: las células aisladas tanto de sangre periférica como tejido adiposo se cultivaron en Minimal Essential Medium alfa (alfa-MEM) suplementado con 10% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina y 25 ng/ml de anfotericina B, inicialmente se sembraron a 8,000 células/cm² en cajas T25 y se expandieron hasta confluencia. Posteriormente las células fueron cosechadas con tripsina y resembradas en cajas de 6 pozos de 35 mm cada pozo⁷⁶; el medio de cultivo inicial se cambió por DMEM con 20 % de FBS sin suplementación adicional.

Después de 24 horas y antes de iniciar la inducción, el medio se reemplazó con medio de neuro-preinducción DMEM/20% FBS/1 mM de β -mercaptoetanol (BME) después para realizar la diferenciación neuronal, se cambiaron las células a medio de cultivo libre de suero DMEM/ con un

aumento gradual de 1-10 mM BME probando las diferentes concentraciones y evaluando la respuesta de las células, a éstas ya que está indicado que después de 60 minutos de tratamiento empieza a haber cambios en la morfología⁷⁷.

Para el mantenimiento de los cultivos neuronales (1 semana) se empleó DMEM con 2% de dimetil sulfóxido (DMSO), 200 ug de butirato de hidroxianizol (BHA), 25 mM KCl, 2 mM de ácido valpórico, 10 uM de forskolina, 1 uM de hidrocortisona y 5 ug/ml de insulina.

Al término de la fase de diferenciación, se realizó una técnica de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti nestina; proteína presente en células neurales. Primero se fijaron los cultivos utilizando PFA al 2.5% por 20 minutos, posteriormente se lavó por tres veces con PBS dejándola por 5 minutos entre lavados; se añadió la solución bloqueadora (Zymed) reposando las muestras por 10 minutos y se lavaron tres veces dejando el PBS por 5 minutos entre cada lavado. Se añadió el anticuerpo primario contra nestina (Santa Cruz Biotech.) y se dejó incubando durante toda la noche a 4°C. Al otro día se lavaron las muestras por tres veces con PBS esta vez dejándola por 10 minutos entre lavado y lavado, ya eliminado el exceso de anticuerpo primario se añadió el anticuerpo secundario (Jackson InmunoResearch) y se dejó incubar por una hora a 37°C; terminado el tiempo se retiró el exceso de anticuerpo lavando con PBS tres veces. El anticuerpo secundario utilizado se compró biotinilado de tal forma que para observar la respuesta en el microscopio se reveló la reacción utilizando diaminobencidina (DAB).

XI. RESULTADOS

A partir de la sangre periférica del caballo se obtuvieron un total de 6×10^4 células adherentes por cada 50 ml de sangre completa procesados con Ficoll Paque^{MR}; después de dos semanas se cosecharon 2×10^6 de células por caja de cultivo T25.

En el cerdo se obtuvieron 5×10^4 células mononucleares por cada 50 ml de sangre periférica y al cabo de dos semanas se obtuvieron 5×10^5 células por caja de cultivo (T25).

De las muestras obtenidas de sangre periférica, se realizaron lecturas con el citómetro a los días cero, 15 y 30 de cultivo, el fenotipo al día cero en células de caballo fue CD34+, CD90+, CD 73+, CD45-, CD14-, CD117- (Fig. 6), el cual se fue perdiendo en las dos lecturas posteriores.

Con respecto a las células de origen sanguíneo de los cerdos, sólo se encontró antigenicidad cruzada con los anticuerpos de humano anti CD34 y anti CD117 (Fig. 7); del mismo modo el fenotipo inicial se fue perdiendo a medida que aumentaba el tiempo de cultivo.

En los histogramas se muestran dos ejes en cada uno se nombra el anticuerpo con el cual se marcaron, cada imagen presenta cuatro cuadrantes, en el cuadrante superior izquierdo se muestra las células que son positivas al anticuerpo enlistado en el eje de las ordenadas; en el cuadrante inferior izquierdo se muestran las células que no fueron positivas a ninguno de los anticuerpos; en el cuadrante inferior derecho aparecen las células positivas al anticuerpo enlistado en el eje de las abscisas; y en el cuadrante superior derecho se muestran las células que fueron positivas a los dos anticuerpos enlistados en ambos ejes.

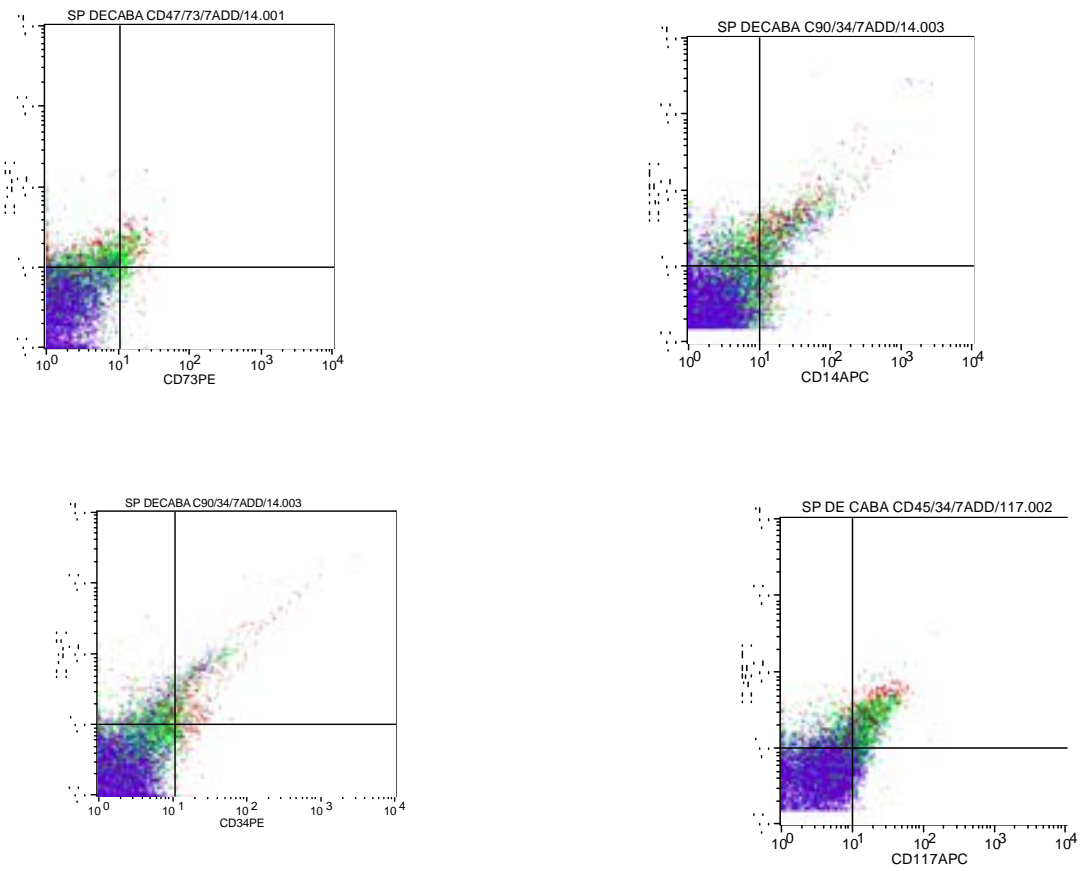


Figura 6. Análisis por citometría efectuado al concentrado de células mononucleares aisladas de sangre periférica completa en caballos.

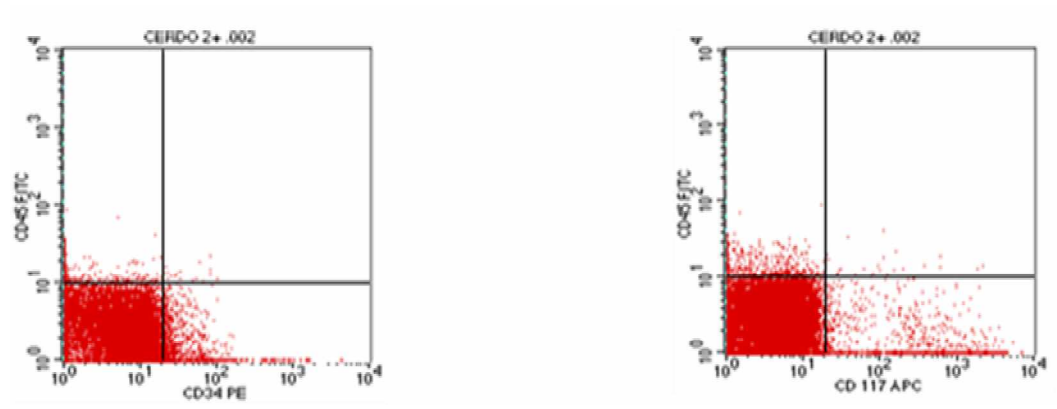


Figura 7. Células aisladas de sangre periférica en el cerdo, en el cuadrante inferior derecho de las figuras, se observan células positivas a CD34 y CD117 respectivamente.

De las células del tejido adiposo se aislaron en el caballo 3.5×10^5 células adherentes por gramo de grasa; obteniendo al cabo de dos semanas de cultivo 2.5 millones de células.

En el cerdo se aislaron 3×10^5 células adherentes por gramo de grasa y después de dos semanas de cultivo se cosecharon 2.3×10^6 de células por caja de cultivo (T25).

Se realizaron lecturas con el citómetro de flujo a los días cero, 15 y 30 de cultivo, el fenotipo inicial en células de caballo fue CD117+, CD90+, CD14-, CD47- (Fig. 8), el cual se fue perdiendo en las dos lecturas posteriores.

El fenotipo inicial en células de cerdo fue CD90+, CD117+, CD34+ (Fig. 9) del mismo modo a mayor tiempo de cultivo dejaron de expresar los marcadores.

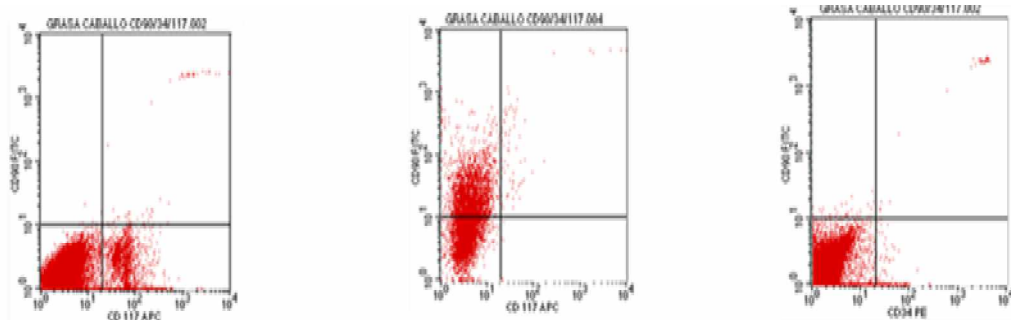


Figura 8. Lecturas positivas de los diferentes marcadores en las células aisladas de tejido adiposo de caballo, de izquierda a derecha se observan en los diferentes cuadrantes células positivas a CD90, CD117 y CD34.

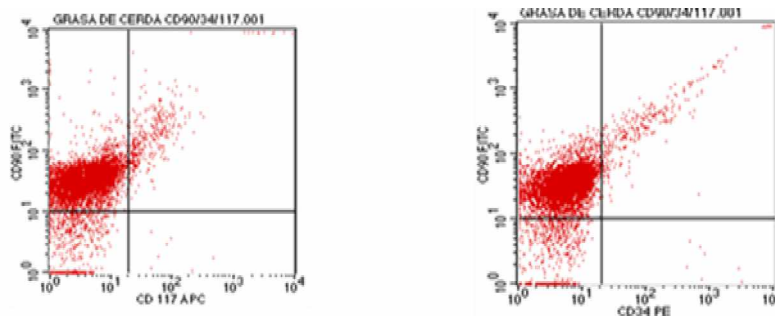


Figura 9. Lecturas positivas de los marcadores en células aisladas de tejido adiposo en cerdos, del mismo modo se observan células positivas a CD90, CD34 y Dobles positivas en el cuadrante superior derecho.

Diferenciación celular.

Para los cultivos de diferenciación, se aplicaron distintos protocolos utilizados para células mesenquimales extraídas de médula ósea; solo se adaptaron las concentraciones de factores de crecimiento y fármacos añadidos.

A partir de este punto las células extraídas tanto de sangre periférica como de tejido adiposo se manipularon de la misma forma, hablando de concentraciones de factores de crecimiento, fármacos, tiempos y técnicas de cultivo.

Condrocitos:

Para iniciar el cultivo de diferenciación celular hacia linaje condral, se realizó un ajuste a las cantidades de factores añadidos al medio por la sensibilidad que presentaron las células al cambio de medio, como se muestra en la Fig. 10, las células sufrieron desprendimiento de la superficie de cultivo y cambios en su citoplasma, sugerentes a muerte celular.

El medio al cual se adaptaron muy bien fué DMEM, insulina 1.5 mg/ml transferrina 6.26 mg/ml, ácido selénico 6.25 mg/ml, ácido linoléico 5.35 mg/ml, albumina sérica bovina 1.25 mg/ml, piruvato 1mM, fosfato 2 ascorbico 37.5 ng/ml, factor de crecimiento transformante b (TGF-b) 3ng/ml, dexametasona 10^{-7} M)

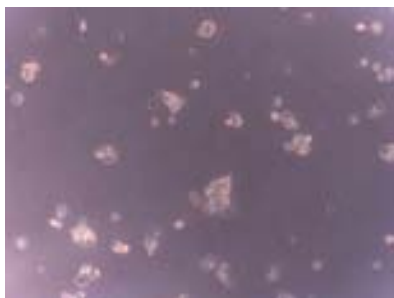
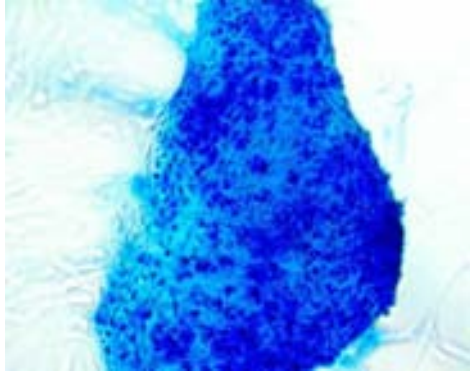
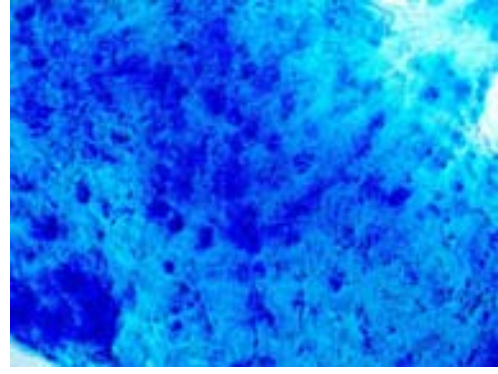


Figura 10. Muerte celular por cambio de medio de cultivo.

Al realizar la tinción con azul alciano, se corroboró el comportamiento del colorante (control positivo) al teñir cartílago aislado de la superficie articular (caballo Fig. 11^a y cerdo Fig. 11^b); el color azul inundó toda la matriz del cartílago probando que el colorante si tiñe la matriz cartilaginosa. En los cortes histológicos de los “pellets” obtenidos con células de sangre periférica, se encontró una reacción negativa en la superficie celular (Fig. 12); por el contrario en los cortes histológicos de los “pellets” obtenidos con células obtenidas del estroma adiposo se observó una reacción positiva en ciertas áreas de la superficie de cultivo probando que las células produjeron componentes sulfatados en su matriz (Fig. 13).



11^a



11^b

Figura 11. Fragmento de cartílago maduro teñido con azul alciano, en la imagen se muestra como se tiñe la matriz del tejido, haciendo evidente la presencia de compuestos sulfatados.

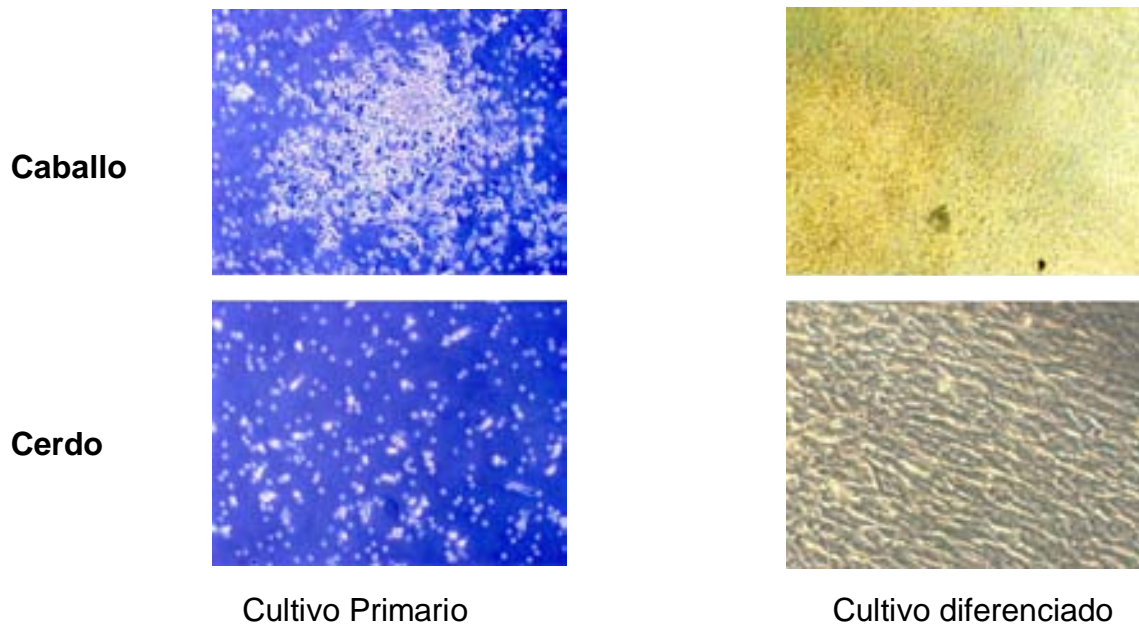


Figura 12. Cultivo primario de células obtenidas de sangre periférica (nótese el fenotipo celular inicial: células alargadas con citoplasma irregular) y cultivo diferenciado (corte histológico de los cultivos tridimensionales “pellet”) posterior a la tinción con azul alciano.

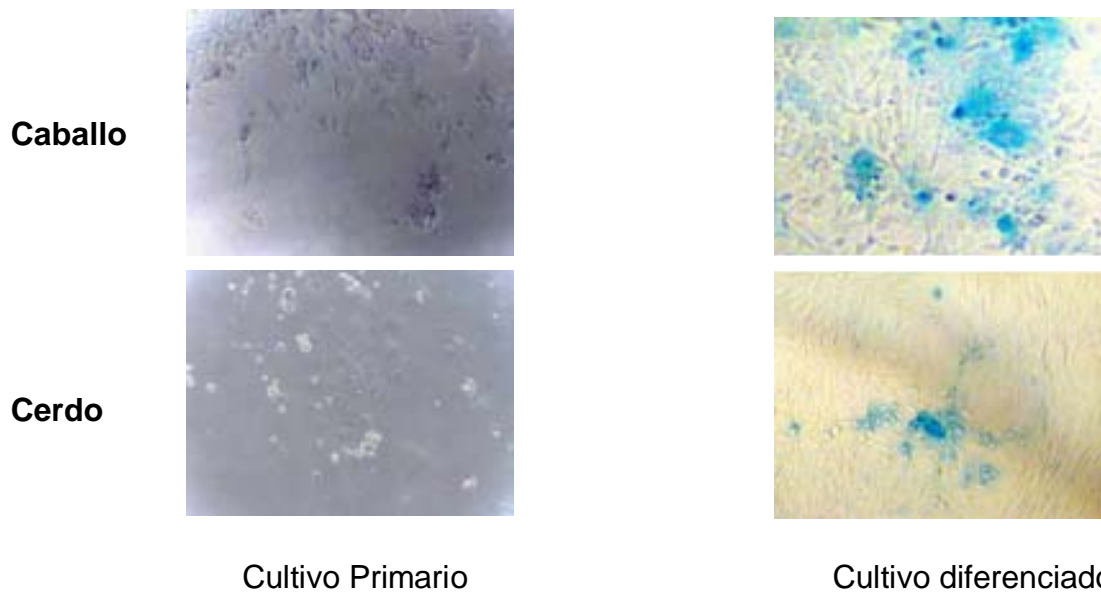


Figura 13. Cultivo primario de células de tejido adiposo (nótese el fenotipo celular inicial: células alargadas con citoplasma irregular) y cultivo diferenciado (corte histológico de los cultivos tridimensionales “pellet”) posterior a la tinción con azul alciano.

Adipocitos:

Las células designadas para la diferenciación adipocítica, se adaptaron primero al medio de cultivo base y cambiándolo por el de inducción; DMEM, suero fetal bovino 10 %, insulina 2.5 mg, dexametasona 10^{-6} M, isobutilmetilxantina 0.5 mM e indometacina 60 mM; con este medio se cultivaron por 7 días cambiando el medio cada 48 horas. Finalmente se realizaron las tinciones con rojo nilo obteniéndose células positivas al colorante tanto de las células aisladas de sangre periférica (Fig. 14) como de los cultivos de estroma adiposo (Fig. 15); indicando acúmulos de lípidos dentro del citoplasma (Fig. 16). Cabe mencionar que el cambio de fenotipo fue tal que aún sin el colorante las células exhibieron en su citoplasma un aumento en el tamaño y número de vacuolas.

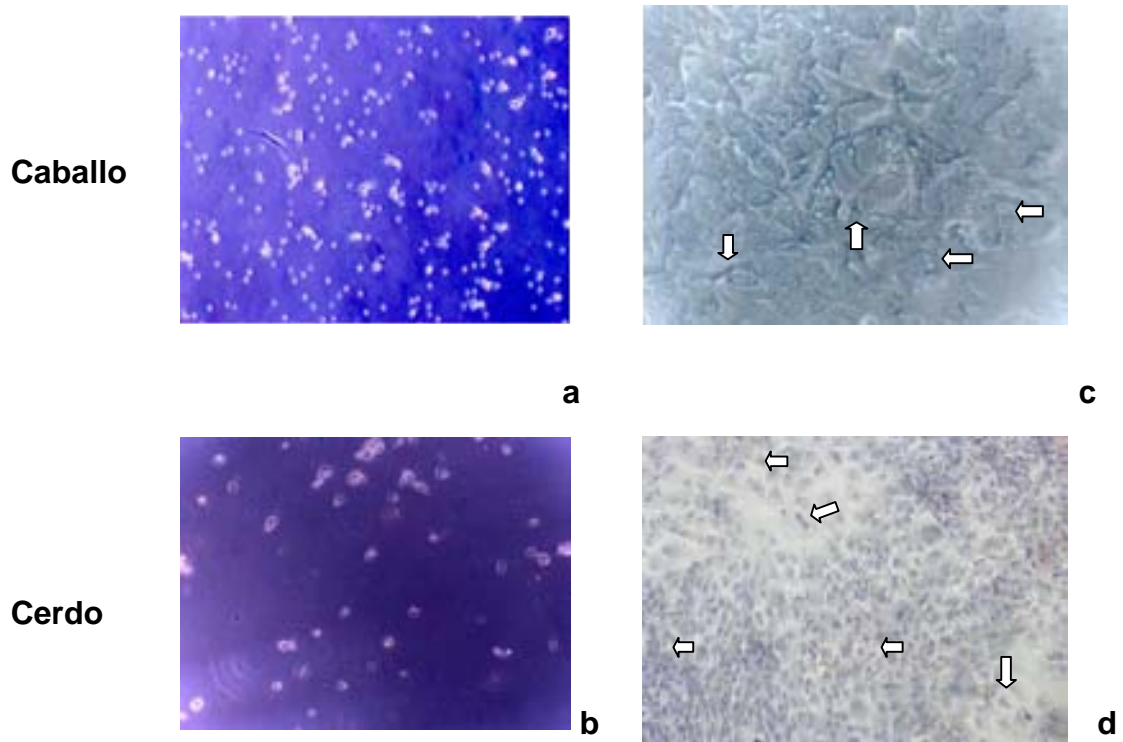
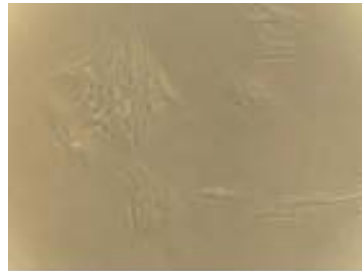
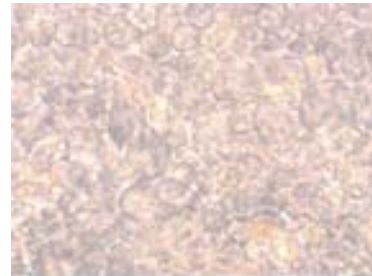


Figura 14. (a,b) células de sangre periférica durante la fase de cultivo primario (se puede llamar fenotipo fibroblástico a la forma espigada de su citoplasma); (c,d) células de tejido adiposo al día 14 de cultivo, día 7 de diferenciación (es evidente la formación de vacuolas gigantes dentro del citoplasma de la célula).

Caballo



a

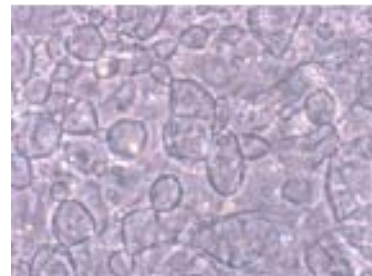


c

Cerdo



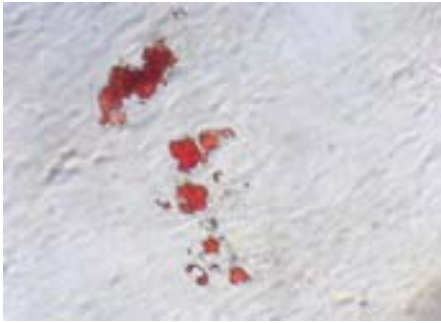
b



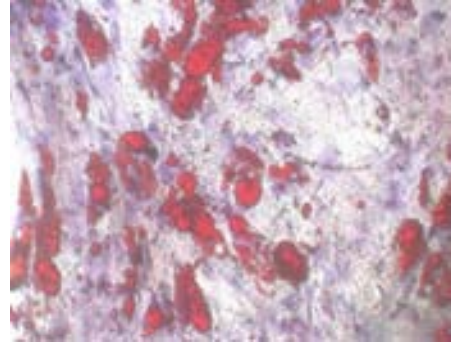
d

Figura 15. (a,b) células de tejido adiposo durante la fase de cultivo primario (se puede llamar fenotipo fibroblástico a la forma espigada de su citoplasma); (c,d) células de tejido adiposo al día 14 de cultivo, día 7 de diferenciación (es evidente la formación de vacuolas gigantes dentro del citoplasma de la célula).

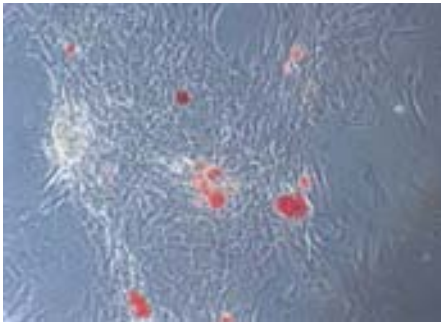
Se verificó la diferenciación por medio de histoquímica utilizando Rojo Nilo el cual tiñe los cúmulos de lipidos dentro de las células ⁷⁸ (Fig. 16).



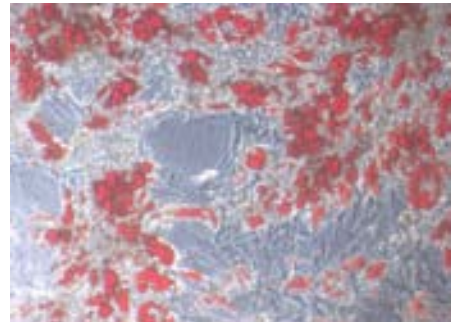
Células de sangre periférica
Caballo



Células del estroma adiposo
Caballo



Células de sangre periférica
Cerdo



Células del estroma adiposo
Cerdo

Figura 16. Se observan los cultivos ya diferenciados de las células extraídas de sangre periférica y estroma de tejido adiposo (positivos al rojo nilo).

Tejido nervioso:

Las células destinadas a la formación del linaje nervioso, sufrieron cambios muy drásticos en su microambiente; iniciando la etapa de cultivo con alfa-MEM enriquecido; DMEM con 20 % de FBS, medio de neuro-preinducción

DMEM/20% FBS/1 mM de β -mercaptoetanol (BME) 24 horas antes de la neuroinducción; finalmente DMEM/ con un aumento gradual de 1-10 mM BME.

Para el mantenimiento de los cultivos neuronales (1 semana) se empleó DMEM con 2% DMSO, 200 ug de butirato de hidroxianizol (BHA), 25 mM KCl, 2 mM de ácido valporico, 10 uM de forskolina, 1 uM de hidrocortisona y 5 ug/ml de insulina, el cambio de fenotipo (Fig. 17) fue muy marcado en los cultivos de células extraídas de sangre periférica; por el contrario de las células extraídas del estroma adiposo. Sin embargo los dos tipos celulares fueron positivos al ser incubados con el anticuerpo anti-nestina.

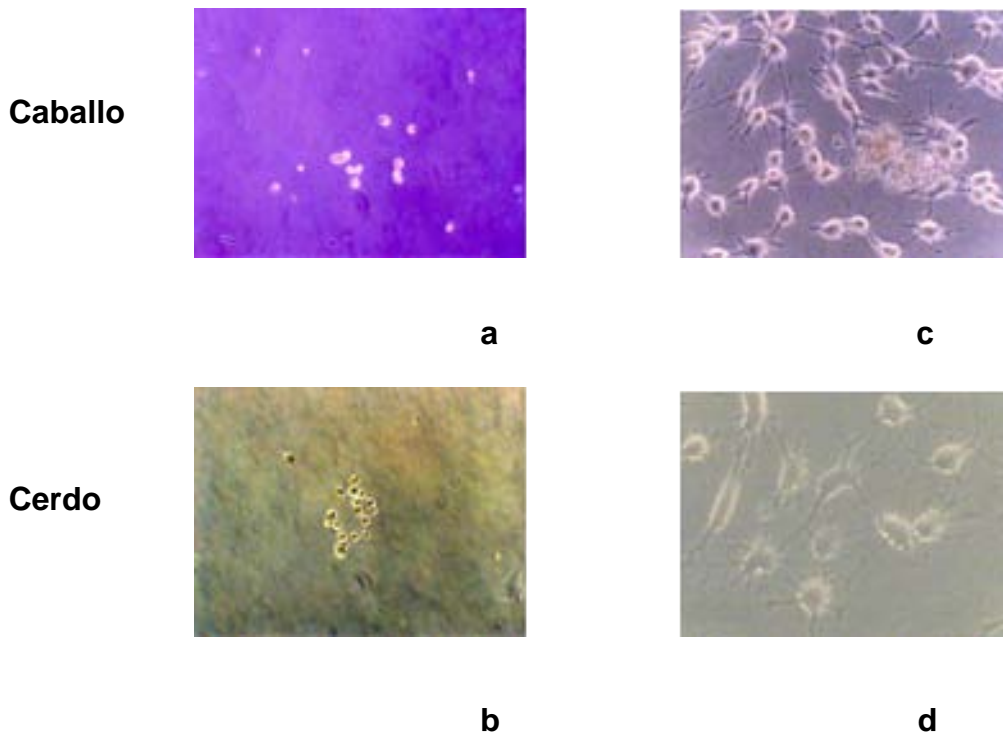


Figura 17. (a,b) células de sangre periférica al inicio del cultivo primario; (c,d) células de sangre periférica en la fase final de diferenciación día 30 de cultivo, 15 de diferenciación hacia fenotipo neuronal.

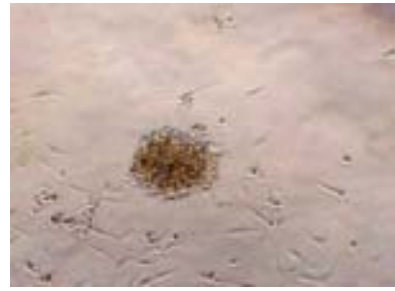
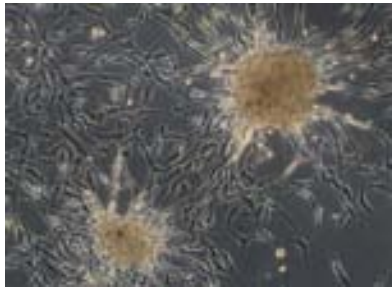


Figura 18. Cultivo de células precursoras de sangre periférica en la etapa final de diferenciación neural y positivas a nestina.

Para los cultivos de células extraídas del estroma adiposo (Fig. 18), el cambio de fenotipo no fue muy evidente sin embargo fueron positivas a la detección de nestina.

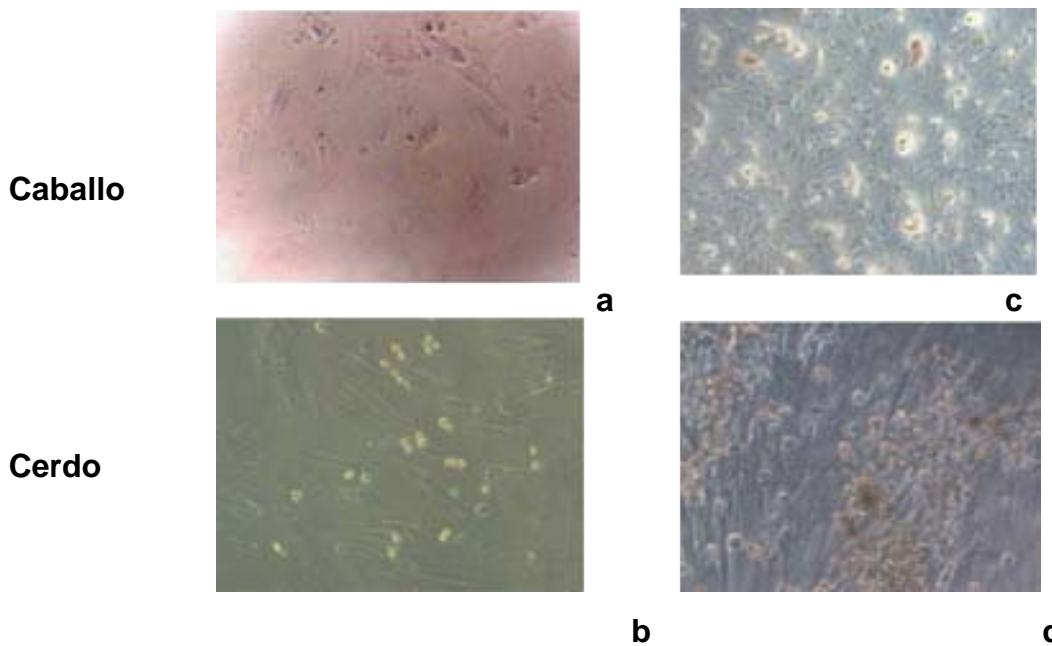


Figura 19. (a,b) células de tejido adiposo al día 3 de cultivo-expansión; (c,d) células de tejido adiposo al día 30 de cultivo, presentan positividad a la marca del anticuerpo anti-nestina representado con la coloración café de las células. .

Se realizaron pruebas utilizando el anticuerpo anti-nestina para reconocer células de encéfalo de ratón (Fig. 19); como control positivo y se observó que el anticuerpo marcó muy bien.

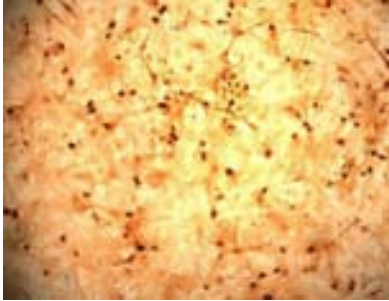


Figura 20. Células de Cerebro de Ratón positivas al anticuerpo anti-nestina (control positivo).

XII. DISCUSION

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica y tejido adiposo en 12 individuos adultos (caballos y cerdos), el procedimiento utilizado tanto para células mononucleares^{23, 40, 79, 80} como para tejido adiposo^{37, 54, 74} se tomó de protocolos previamente publicados. Para aislar los precursores de sangre periférica se adaptó el protocolo de Sanchez-Ramos utilizando una dilución 1-4 en lugar de 1.077 g/ml, evaluando la separación de la fracción mononuclear a simple vista, el protocolo es parecido al del Dr. Koerner, sin embargo resultó más efectivo no dejar sedimentando la muestra antes de diluirla.

El protocolo utilizado para la digestión del tejido adiposo fue tomado de los protocolos reportados por Yoshimura, Miyazaki y Mitchell resultándonos muy efectivo cambiando el tiempo de digestión a una hora.

Al realizar el aislamiento de las células se comprobó la presencia de marcadores específicos de células troncales mesenquimales utilizando anticuerpos monoclonales sintetizados contra células humanas, los anticuerpos monoclonales sólo reconocen una parte del antígeno contra el cual se sintetizaron; esto indica antigenicidad cruzada presumiendo homología en la secuencia proteica de los receptores.

Los fenotipos obtenidos en sangre periférica fueron CD34+, CD90+, CD73+, CD45-, CD14-, CD117- en el caballo y CD34+ y CD117+ en el cerdo. En el tejido adiposo se encontraron en el caballo los siguientes marcadores CD117+, CD90+, CD14-, CD47- y en el tejido adiposo del cerdo CD90+, CD117+, CD34+. Los marcadores CD34, CD90, CD117 se encuentran en células troncales mesenquimales, el CD73, CD14 son específicos de precursores hematopoyéticos y el CD45, CD47 son de células linfoides y fibroblastos respectivamente. Todos estos resultados son similares a los encontrados por McEwan C.³³ en su trabajo con células embrionarias; lo que

corroborar que los marcadores con los que trabajamos están presentes en células inmaduras. Por otro lado el doctor Yoshimura K y Miyasaki, 2005^{34, 74} en su trabajo con células inmaduras de grasa, presenta un fenotipo diferente; las células con las que trabajan son positivas a CD13, CD90, y CD105, moderadamente positivas a CD9, CD166, y CD54, y negativas a CD31, CD34, CD66b, CD106 y CD117 y presentan una plasticidad similar a las que se aislaron en este trabajo.

Con el fenotipo encontrado en las células aisladas de sangre periférica y tejido adiposo se puede presumir que las células que se cultivan son células troncales mesenquimales, sin embargo para poder asegurar esta premisa, es necesario según la literatura^{13, 24, 29, 81-84}, evaluar su capacidad para diferenciarse hacia diferentes tejidos.

De tal forma que se iniciaron los protocolos de diferenciación para evaluar la plasticidad de las células aisladas hacia linaje condral, linaje neural y adiposo, como parte del tejido mesodérmico del cual son origen las células que se obtuvieron en las muestras. Al añadir al medio de cultivo los factores de crecimiento y fármacos indicados en los protocolos, se obtuvo en los cultivos celulares un cambio de fenotipo característico de los fenotipos celulares encontrados en los tejidos a los cuales se pretendió llegar con la estimulación celular, sugiriendo un cambio en la expresión de proteínas derivado de un cambio en el metabolismo celular.

Cada tejido tiene células específicas que lo integran y poseen una función en especial; lo que las diferencia es su metabolismo y la capacidad de producir proteínas y factores que otras no pueden; esto se traduce como la expresión de genes específicos en la célula integrante del tejido los cuales pueden o no expresarse dependiendo del microambiente en el que se encuentre. El cartílago por ejemplo posee sus células funcionales que son los condrocitos, estas células producen una matriz que caracteriza al propio cartílago la cual está formada entre otras de colágena tipo II, tipo X y

compuestos sulfatados como los glicosaminoglicanos. El tejido nervioso expresa un tipo propio de proteínas y algunas de ellas están presentes en la superficie de sus células integrantes, una de ellas es la nestina, proteína presente en los precursores neuronales y células de la glia. Por otro lado existen tejidos que tienen células con características físicas especiales como el tejido adiposo, los adipocitos almacenan lípidos dentro de su citoplasma en forma de grandes vacuolas, depósitos que sirven como reserva energética.

En este estudio para comprobar el cambio de fenotipo se realizaron diferentes pruebas con técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica para comprobar la diferenciación de las células inmaduras aisladas de sangre periférica y tejido adiposo hacia los linajes condral, adiposo y nervioso.

Para el tejido condral se realizó la tinción con azul alciano; este colorante se caracteriza por unirse a los compuestos sulfatados como los que integran la matriz condral en el cartílago^{79, 85}; de tal forma que si se detectan este tipo de compuestos en un cultivo se puede especular que las células integrantes del cultivo producen una matriz integrada por compuestos sulfatados. Al principio de iniciaron cultivos en monocapa; estos no mostraron tener afinidad por el azul alciano; por el contrario permanecieron sin color debido a que no produjeron matriz celular rica en compuestos sulfatados. El metabolismo de una célula cultivada en monocapa va a ser diferente al de una célula cultivada con un método de cultivo tridimensional, aún cuando se le añadan los mismos factores de crecimiento y fármacos al medio de cultivo; por tal motivo se realizó una técnica de cultivo la cual llamamos cultivo en conglomerado o en “pellet” para verificar si las células cultivadas a alta densidad pudieran exhibir la producción de matriz extracelular rica en compuestos sulfatados.

En los ensayos realizados con los cortes histológicos de “pellets” con células aisladas de sangre periférica sometidas al medio de cultivo estimulante para diferenciación hacia linaje condral no se obtuvieron resultados positivos, similares a los reportados por Dr. Koerner al tratar de diferenciar precursores

sanguíneos a condrocitos. Por el contrario cuando las células inmaduras procedentes de tejido adiposo se incubaron con el medio de cultivo condral al final de la fase de diferenciación presentaron una tinción positiva del azul alciano lo cual nos dice que empezaron a sintetizar matriz celular integrada con compuestos sulfatados. Esto indica que las células posiblemente produzcan otro tipo de proteínas similares a las que se encuentran en el tejido cartilaginoso.

En el tejido adiposo natural un adipocito se reconoce gracias a que dentro de su citoplasma lleva grandes vacuolas llenas de ácidos grasos; en el experimento con las células inmaduras estimuladas hacia linaje adiposo, se utilizó el rojo nilo, colorante que tiene gran afinidad por los lípidos añadiendo una coloración rojo brillante a las vacuolas de ácidos grasos dentro de los adipocitos, resultado similar al publicado por el Dr. Koerner en 2006 que obtuvo células adiposas de precursores sanguíneos aislados de médula ósea y sangre periférica. Al término de la fase de cultivo para diferenciación adipocítica, se efectuó la técnica antes mencionada obteniéndose resultados positivos de ambos grupos celulares hacia este tipo de linaje, traduciéndose como la acumulación de ácidos grasos dentro del citoplasma celular donde antes no la había.

En los ensayos de plasticidad que se efectuaron con las muestras de células aisladas para estimular su diferenciación neural, se efectuaron diferentes ensayos variando las concentraciones de los factores añadidos al medio de cultivo. Para corroborar el cambio de metabolismo en las células, se elaboró una técnica de inmunohistoquímica, detectando la presencia de la nestina neuronal en los cultivos diferenciados, en los cultivos celulares obtenidos a partir de sangre periférica las células mostraron un acumulo de anticuerpos traduciéndose como una respuesta positiva al anticuerpo. Por el contrario en las células extraídas de tejido adiposo no se encontró acumulo de complejos antígeno anticuerpo en la superficie celular, traduciéndose como una respuesta negativa a la nestina⁸⁶, el doctor Drapeau en 2005 se dedicó a buscar esta proteína en tejido de cicatrización estipulando que es un marcador exclusivo de células inmaduras comprometidas a un linaje neural.

XIII. CONCLUSIONES

1. Se logró el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica y células del estroma adiposo, así mismo se logro realizar cultivos de las mismas y clonaras *in vitro*.
2. Se obtuvieron lecturas positivas a los marcadores presentes en células inmaduras (Precursores o Células Mesenquimales).
3. Se evaluó la plasticidad tanto de células mononucleares aisladas de sangre periférica como de tejido adiposo; pudiendo lograr la diferenciación de las células a linaje condral, adiposo y nervioso.
4. La plasticidad celular entre las células de cerdo y caballo no mostraron diferencia, sin embargo la presencia de marcadores no fue similar.

XIV. BIBLIOGRAFIA

1. Han CD, Kang HJ. Changes in the hyaline articular cartilage after air exposure. *Yonsei Med J* 1990;31:53-9.
2. Atik OS, Uslu MM, Eksioglu F. Osteochondral multiple autograft transfer (OMAT) for the treatment of cartilage defects in the knee joint. *Bull Hosp Jt Dis* 2005;63:37-40.
3. Ossendorf C, Kaps C, Kreuz PC, Burmester GR, Sittinger M, Erggelet C. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R41.
4. Sellers SE, Tisdale JF, Bodine DM, et al. No discrepancy between in vivo gene marking efficiency assessed in peripheral blood populations compared with bone marrow progenitors or CD34+ cells. *Hum Gene Ther* 1999;10:633-40.
5. Roman J, Serrano J, Jimenez 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.
6. Engelhardt M, Douville J, Behringer D, et al. Hematopoietic recovery of ex vivo perfusion culture expanded bone marrow and unexpanded peripheral blood progenitors after myeloablative chemotherapy. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:249-59.
7. Strecker T, Feyrer R, Horch RE, Weyand M, Kneser U. Simultaneous heart valve replacement and reconstruction of the radiation-damaged chest wall with a delayed vertical rectus abdominis myocutaneous flap. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132:980-1.
8. Okano H. [Identification of neural stem cells in adult human brain: its implication in the strategy for repairing the damaged central nervous system]. *Rinsho Shinkeigaku* 2005;45:871-3.
9. Tamai N, Myoui A, Hirao M, et al. A new biotechnology for articular cartilage repair: subchondral implantation of a composite of interconnected

porous hydroxyapatite, synthetic polymer (PLA-PEG), and bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2). *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13:405-17.

10. Hiemstra C, Zhong Z, Dijkstra PJ, Feijen J. PEG-PLA hydrogels by stereocomplexation for tissue engineering of cartilage. *J Control Release* 2005;101:332-4.

11. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85:740-7.

12. Moyses E, Segura S, Liard O, Mahaut S, Mechawar N. Microenvironmental determinants of adult neural stem cell proliferation and lineage commitment in the healthy and injured central nervous system. *Curr Stem Cell Res Ther* 2008;3:163-84.

13. Ting AE, Mays RW, Frey MR, Hof WV, Medicetty S, Deans R. Therapeutic pathways of adult stem cell repair. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;65:81-93.

14. Bullough R, Finnigan T, Kay A, Maffulli N, Forsyth NR. Tendon repair through stem cell intervention: Cellular and molecular approaches. *Disabil Rehabil* 2008;1-6.

15. Sohur US, Emsley JG, Mitchell BD, Macklis JD. Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:1477-97.

16. Uchida K, Momiyama T, Okano H, et al. Potential functional neural repair with grafted neural stem cells of early embryonic neuroepithelial origin. *Neurosci Res* 2005;52:276-86.

17. Privat A. [Stem cells and neural repair]. *Bull Acad Natl Med* 2005;189:605-13; discussion 13-4.

18. Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, Macklis JD. Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog Neurobiol* 2005;75:321-41.

19. Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG. Circulating skeletal stem cells. *J Cell Biol* 2001;153:1133-40.

20. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Taei A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation* 2004;72:224-9.
21. Chan J, Waddington SN, O'Donoghue K, et al. Widespread distribution and muscle differentiation of human fetal mesenchymal stem cells after intrauterine transplantation in dystrophic mdx mouse. *Stem Cells* 2007;25:875-84.
22. Fiegel HC, Lange C, Kneser U, et al. Fetal and adult liver stem cells for liver regeneration and tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2006;10:577-87.
23. Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 2000;164:247-56.
24. Verma S, Younus J, Stys-Norman D, Haynes AE, Blackstein M. Dose-intensive chemotherapy with growth factor or autologous bone marrow/stem cell transplant support in first-line treatment of advanced or metastatic adult soft tissue sarcoma: a systematic review. *Cancer* 2008;112:1197-205.
25. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
26. Csaki C, Matis U, Mobasheri A, Ye H, Shakibaei M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol* 2007;128:507-20.
27. Guillot PV, Cui W, Fisk NM, Polak DJ. Stem cell differentiation and expansion for clinical applications of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 2007;11:935-44.
28. Zhao M, Amiel SA, Christie MR, et al. Evidence for the presence of stem cell-like progenitor cells in human adult pancreas. *J Endocrinol* 2007;195:407-14.
29. Zhang J, Li L. Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem* 2008;283:9499-503.
30. Villadsen R, Fridriksdottir AJ, Ronnov-Jessen L, et al. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J Cell Biol* 2007;177:87-101.

31. Salinas CN, Anseth KS. The enhancement of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by enzymatically regulated RGD functionalities. *Biomaterials* 2008;29:2370-7.
32. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell* 2007;1:35-8.
33. McEwan C, Melton DW. A simple genotyping assay for the Hprt null allele in mice produced from the HM-1 and E14TG2a mouse embryonic stem cell lines. *Transgenic Res* 2003;12:519-20.
34. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* 2006;208:64-76.
35. Zhang Q, Guo R, Schwarz EM, Boyce BF, Xing L. TNF inhibits production of stromal cell-derived factor 1 by bone stromal cells and increases osteoclast precursor mobilization from bone marrow to peripheral blood. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R37.
36. Yu S, Tanabe T, Dezawa M, Ishikawa H, Yoshimura N. Effects of bone marrow stromal cell injection in an experimental glaucoma model. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;344:1071-9.
37. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res* 2007;327:449-62.
38. Rota M, Kajstura J, Hosoda T, et al. Bone marrow cells adopt the cardiomyogenic fate in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17783-8.
39. O'Marcaigh AS, DeSantes K, Hu D, et al. Bone marrow transplantation for T-B- severe combined immunodeficiency disease in Athabaskan-speaking native Americans. *Bone Marrow Transplant* 2001;27:703-9.
40. Koerner J, Nestic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24:1613-9.

41. Espinosa-Heidmann DG, Caicedo A, Hernandez EP, Csaky KG, Cousins SW. Bone marrow-derived progenitor cells contribute to experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4914-9.
42. Moreno M, Azinovic I, Lopez-Picazo JM, et al. Radiation therapy after high-dose chemotherapy with peripheral blood stem cell support for high-risk breast cancer. *Am J Clin Oncol* 2002;25:347-53.
43. del Canizo MC, Martinez C, Conde E, et al. Peripheral blood is safer than bone marrow as a source of hematopoietic progenitors in patients with myelodysplastic syndromes who receive an allogeneic transplantation. Results from the Spanish registry. *Bone Marrow Transplant* 2003;32:987-92.
44. Martinez-Jaramillo G, Flores-Guzman P, Montesinos JJ, et al. In vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors present in mobilized peripheral blood from normal subjects and cancer patients. *Stem Cells Dev* 2004;13:382-9.
45. Della Bella S, Taddeo A, Calabro ML, et al. Peripheral blood endothelial progenitors as potential reservoirs of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *PLoS ONE* 2008;3:e1520.
46. Pufe T, Petersen W, Fandrich F, et al. Programmable cells of monocytic origin (PCMO): a source of peripheral blood stem cells that generate collagen type II-producing chondrocytes. *J Orthop Res* 2008;26:304-13.
47. Suuronen EJ, Veinot JP, Wong S, et al. Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133+ progenitors expanded from the peripheral blood. *Circulation* 2006;114:1138-44.
48. Andersen HB, Holm M, Hetland TE, et al. Comparison of short term in vitro cultured human mast cells from different progenitors - Peripheral blood-derived progenitors generate highly mature and functional mast cells. *J Immunol Methods* 2008;336:166-74.
49. Egan CG, Lavery R, Caporali F, et al. Generalised reduction of putative endothelial progenitors and CXCR4-positive peripheral blood cells in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2008;51:1296-305.

50. Case J, Hicks C, Trickett A, Kwan YL, Manoharan A. The expansion of megakaryocyte progenitors from CD34+-enriched mobilized peripheral blood stem cells is inhibited by Flt3-L. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:76-82.
51. Grande T, Bueren JA. The mobilization of hematopoietic progenitors to peripheral blood is predictive of the hematopoietic syndrome after total or partial body irradiation of mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:612-8.
52. Saito H, Kato A, Matsumoto K, Okayama Y. Culture of human mast cells from peripheral blood progenitors. *Nat Protoc* 2006;1:2178-83.
53. Kasbia G, Al-Gahtani F, Tay J, et al. Reduced hemoglobin on day of peripheral blood progenitor cell collection is associated with low graft content of vascular progenitors and increased toxicity after autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Transfusion* 2008.
54. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 2006;24:376-85.
55. Miyazaki K, Masuya M, Yamaguchi M, et al. [Angioimmunoblastic T-cell lymphoma occurring four months after autologous peripheral blood stem cell transplantation with high-dose chemotherapy for follicular lymphoma]. *Rinsho Ketsueki* 2005;46:1065-70.
56. Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, et al. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:3296-300.
57. Torres FC, Rodrigues CJ, Stocchero IN, Ferreira MC. Stem cells from the fat tissue of rabbits: an easy-to-find experimental source. *Aesthetic Plast Surg* 2007;31:574-8.
58. Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol* 2006;24:150-4.
59. Dragoo JL, Lieberman JR, Lee RS, et al. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg* 2005;115:1665-73.

60. Charlton DE, Utteridge TD, Beddoe AH. Microdosimetry of haemopoietic stem cells irradiated by alpha particles from the short-lived products of ²²²Rn decays in fat cells and haemopoietic tissue. *Int J Radiat Biol* 1996;69:585-92.
61. Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng* 2006;12:1137-42.
62. Grossberg S, Bullock D, Dranias MR. Neural dynamics underlying impaired autonomic and conditioned responses following amygdala and orbitofrontal lesions. *Behav Neurosci* 2008;122:1100-25.
63. Gramsbergen A. Neural compensation after early lesions: a clinical view of animal experiments. *Neurosci Biobehav Rev* 2007;31:1088-94.
64. Jones BW, Marc RE, Watt CB, Vaughan DK, Organisciak DT. Neural plasticity revealed by light-induced photoreceptor lesions. *Adv Exp Med Biol* 2006;572:405-10.
65. Smith RK, Webbon PM. Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *Br J Sports Med* 2005;39:582-4.
66. Smith RK. Stem cell technology in equine tendon and ligament injuries. *Vet Rec* 2006;158:140.
67. Juncosa-Melvin N, Matlin KS, Holdcraft RW, Nirmalanandhan VS, Butler DL. Mechanical stimulation increases collagen type I and collagen type III gene expression of stem cell-collagen sponge constructs for patellar tendon repair. *Tissue Eng* 2007;13:1219-26.
68. Korbling M. Allogeneic blood stem cell transplantation: the US experience. *Hematol Cell Ther* 1996;38:456-7.
69. Korbling M, Champlin R. Peripheral blood progenitor cell transplantation: a replacement for marrow auto- or allografts. *Stem Cells* 1996;14:185-95.
70. Burt RK, Traynor A, Oyama Y, Craig R. High-dose immune suppression and autologous hematopoietic stem cell transplantation in refractory Crohn disease. *Blood* 2003;101:2064-6.
71. Soderholm JD, Malm C, Juliusson G, Sjudahl R. Long-term endoscopic remission of crohn disease after autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Scand J Gastroenterol* 2002;37:613-6.

72. Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, et al. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells* 2008;26:1695-704.
73. Arguero R, Careaga-Reyna G, Castano-Guerra R, Garrido-Garduno MH, Magana-Serrano JA, de Jesus Nambo-Lucio M. Cellular autotransplantation for ischemic and idiopathic dilated cardiomyopathy. Preliminary report. *Arch Med Res* 2006;37:1010-4.
74. Miyazaki T, Kitagawa Y, Toriyama K, Kobori M, Torii S. Isolation of two human fibroblastic cell populations with multiple but distinct potential of mesenchymal differentiation by ceiling culture of mature fat cells from subcutaneous adipose tissue. *Differentiation* 2005;73:69-78.
75. Sutherland DR, Keating A, Nayar R, Anania S, Stewart AK. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp Hematol* 1994;22:1003-10.
76. Krabbe C, Zimmer J, Meyer M. Neural transdifferentiation of mesenchymal stem cells--a critical review. *APMIS* 2005;113:831-44.
77. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 2000;61:364-70.
78. Dennis JE, Merriam A, Awadallah A, Yoo JU, Johnstone B, Caplan AI. A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J Bone Miner Res* 1999;14:700-9.
79. Kilic E, Ceyhan T, Cetinkaya DU. [Evaluation of differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells to cartilage and bone cells]. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007;41:295-301.
80. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2:477-88.
81. van der Bogt KE, Sheikh AY, Schrepfer S, et al. Comparison of different adult stem cell types for treatment of myocardial ischemia. *Circulation* 2008;118:S121-9.

82. Slavin MA, Heath CH, Thursky KA, et al. Antifungal prophylaxis in adult stem cell transplantation and haematological malignancy. *Intern Med J* 2008;38:468-76.
83. Shiratori S, Yasumoto A, Tanaka J, et al. A retrospective analysis of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL): clinical impact of graft-versus-leukemia/lymphoma effect. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:817-23.
84. Shigematsu A, Kondo T, Yamamoto S, et al. Excellent outcome of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a conditioning regimen with medium-dose VP-16, cyclophosphamide and total-body irradiation for adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2008;14:568-75.
85. Rahman MS, Tsuchiya T. Enhancement of chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes by biodegradable polymers. *Tissue Eng* 2001;7:781-90.
86. Drapeau J, El-Helou V, Clement R, et al. Nestin-expressing neural stem cells identified in the scar following myocardial infarction. *J Cell Physiol* 2005;204:51-62.

XV. ANEXOS

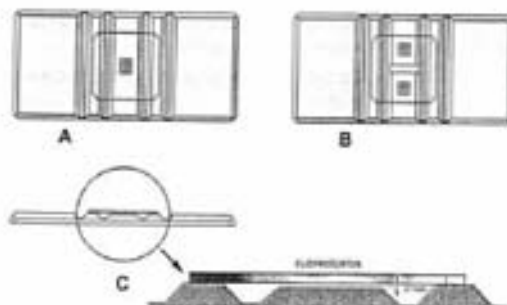
Anexo 1

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 μl de muestra y 100 μl de azul tripano; se revuelven bien
- 5.- Se recuperan 100 μl 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

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

En el caso del caballo se obtendrán muestras de la región dorsal del glúteo mayor, se lavará el area con lodo espuma y se enjuagará con alcohol del 96° se realizará la incisión en la piel para obtener de 3-5 gramos de grasa subcutánea.

En los cerdos se realizará la asepsia de la región a incidir al igual que como se describió anteriormente la del caballo y se obtendrán igual de 3-5 gramos de tejido adiposo para proceder a la digestión enzimática.

Las muestras se transportarán al Laboratorio en solución PBS con 10 % de antibiótico (Antibiotic-Antimycotic (100X), liquid, 15240-112, Gibco; Invitrogen).