



Universidad Central de  
Venezuela  
Facultad de Ciencias.  
Escuela de Biología.

## **Diferenciación condrogénica de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo en cultivos con cartílago de ratón.**

### **TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller **Emily Sandoval Guillen**, como requisito para optar al título de Licenciado en Biología.

**Tutora:** Dra. M<sup>a</sup>. Lorena Márquez

CARACAS, VENEZUELA  
MARZO – 2012

## **DEDICATORIA**

A Dios por estar conmigo en todo momento y se no hubiese sido su voluntad no estaría aquí llegando a una de mis metas propuestas como lo he logrado en este momento.

A ti Dios por ser mi guía.

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A Dios por permitirme conocer gente tan maravillosa en mi camino que de una o otra manera me han ayudado a ser quien soy hoy en día.
- ❖ A mis padres y mi familia por apoyarme incondicionalmente porque en ellos encontré las fuerzas para culminar mi carrera.
- ❖ A mi tutora, la Dra. María Lorena Márquez por convertirse en mas que una profesora para mí. Por ser mi amiga, escucharme y apoyarme cuando creí que no podía.
- ❖ A la profesora Dra. Elizabeth Merentes por brindarme toda su sabiduría siempre que la necesité, apoyarme en todo sentido y ser una persona digna de dar el ejemplo en la vida.
- ❖ A las personas que integraron mesa redonda, por guiarme, apoyarme en todo sentido siempre que los necesité profesores: Gilberto Payares, Cristina Sanoja, Valentina Salas, Dora.
- ❖ A mis compañeros de Laboratorio: Zenaida, Felipe, Lorena, Mariangela, Marlene, Eliana, Bélgica, Sra. Meri, Sra. Dora porque además de apoyarme llenaron de entusiasmo y de alegría todos los momentos que me permitieron compartir con ustedes.
- ❖ A mi tía Yeny por ayudarme a madurar como persona, además de permitirme formar parte de su familia como nunca lo imaginé.
- ❖ A mis tías Tania, Leida, Nora y Rosa por consentirme y darme cariño cuando lo busqué.

- ❖ A mis casi hermanos Juana y Marco por escucharme siempre y compartir conmigo momentos increíbles.
- ❖ A todos mis primos pero en especial a Rosio y José por apoyarme siempre.
- ❖ A mis amigos Sandra, Erika, Jennire, Lady, Luis por aceptarme en sus vidas y permitirme crecer con ellos sabiéndome dar aliento y cariño cada quien a su manera, ayudando a sobrellevar los obstáculos que se presentaron en la carrera.
- ❖ A mi bello por estar siempre a mi lado.

## RESUMEN

Actualmente existe una alta incidencia de patologías causadas por la destrucción de cartílago. Como sabemos el cartílago es un tejido avascular con una capacidad limitada de proliferación y de reparación es por ello que existen diversas técnicas para el abordaje terapéutico y producción del cartílago por bioingeniería de tejidos. Una de las alternativas más estudiadas y con mayores avances en la actualidad, es la utilización de células madre, células indiferenciadas que tienen la capacidad de convertirse en diversos tipos celulares, incluso generar células diferenciadas más allá de los límites del propio tejido donde se encuentren. Entre las diversas fuentes de obtención de células madre tenemos al tejido adiposo, el cual por diversos estudios se ha demostrado que es una fuente rica en células madre mesenquiales (CMM), son de fácil obtención y pueden diferenciarse a diversos linajes como el epidérmico, osteogénico y condrogénico. También se sabe que el cultivo de condrocitos es poco viable cuando hablamos de bioingeniería de tejidos por lo cual es importante continuar la búsqueda de condiciones para la producción de este tipo celular. En este sentido, el objetivo del presente estudio fue inducir el proceso de diferenciación condrogénica de las CMM del tejido adiposo empleando un sistema de co-cultivo con cartílago de ratón, además de evaluar el efecto sobre las CMM del medio en el cual fueron mantenidos los co-cultivo. Para ello se aislaron y establecieron los cultivos de CMM, fibroblastos y condrocitos para luego realizar los co-cultivos. Se empleó dos sistemas de co-cultivo, el primero un co-cultivo de CMM con fibroblastos y el segundo un co-

cultivo de CMM con condrocitos. Además cada una de los sistemas fué mantenido en dos medios diferentes, un medio nutritivo básico y un medio condrogénico. La inducción hacia el linaje condrogénico se evaluó mediante el uso de técnicas histoquímicas. Estos resultados indican que en los sistemas empleados se observa una inducción hacia el linaje condrogénico, ya que se demostró la presencia de componentes de matriz como GAGs ácidos carboxilados y GAGs sulfatados. Sin embargo, en el sistema de co-cultivo de CMM con fibroblastos mantenidos en medio nutritivo esta inducción no se observó. Esto nos permite concluir que la presencia de condrocitos, así como el uso de un medio condrogénico son necesarios para la inducción de las CMM hacia el linaje condrogénico, además de que existe una sinergia entre los factores producidos por los condrocitos y los componentes presentes en el medio condrogénico, en el proceso de inducción de estas CMM.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ABREVIATURAS.....	VII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Cartílago.....	1
1.1.1 Desarrollo del cartílago.....	1
1.1.2 Composición del cartílago.....	3
1.1.3 Tipos de cartílago.....	4
1.1.3.1 Cartílago hialino.....	5
1.1.3.2 Cartílago elástico.....	5
1.1.3.3 Cartílago fibroso.....	6
1.1.4 Crecimiento del cartílago.....	6
1.1.4.1 Crecimiento aposicional.....	6
1.1.4.2 Crecimiento intersticial.....	7
1.1.5 Regeneración y reparación del cartílago.....	7
1.1.6 Patologías asociadas del cartílago.....	8
1.1.6.1 Artritis.....	8
1.1.6.2 Osteoartritis.....	8
1.1.7 Bioingeniería de tejidos.....	9
1.2 Células Madres.....	9
1.2.1 Clasificación de las células madres.....	10
1.2.2 Características, función y fuentes de obtención de las CMM de tejidos adultos.....	12
1.2.2.1 Características de la CMM.....	12
1.2.2.2 Función “ <i>in vivo</i> ” de la CMM de tejidos adultos.....	13
1.2.2.3 Fuentes de obtención de las CMM de tejidos Adultos.....	14
1.3 Tejido adiposo.....	15
1.3.1 Tipos de tejido adiposo.....	15
1.3.1.1 Tejido adiposo blanco.....	15

	1.3.1.2 Tejido adiposo pardo.....	16
	1.3.2 Características de las CMM provenientes del tejido adiposo.....	17
	1.3.3 Plasticidad y transdiferenciación en CMM.....	17
	1.4 Microambiente.....	19
	1.4.1 Factores solubles.....	20
	1.4.2 Medios condicionados .....	24
	1.5 Interacción célula – célula.....	25
	1.6 Interacción célula – MEC.....	25
	1.7 Sistema de cultivos.....	26
	1.7.1 Sistemas tridimensionales.....	26
2	ANTECEDENTES.....	28
3	OBJETIVOS.....	36
	3.1 Objetivo General.....	36
	3.2 Objetivos Específicos.....	36
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
	4.1 Materiales Biológicos.....	37
	4.2 Aislamiento de los diferentes tipos celulares y establecimiento de cultivos en monocapa.....	37
	4.2.1 Células mesenquimales provenientes del tejido adiposo del epidídimo del ratón adulto.....	37
	4.2.2 Fibroblastos provenientes de fetos de ratón.....	38
	4.2.3 Condrocitos provenientes de fetos de ratón.....	39
	4.3 Subcultivos celulares.....	40
	4.3.1 CMM provenientes del tejido adiposo del epidídimo del ratón.....	40
	4.3.2 Fibroblastos provenientes de fetos de ratón.....	41
	4.3.3 Condrocitos provenientes de fetos de ratón.....	41
	4.4 Establecimiento de los Co-cultivos.....	41



4.4.1	Evaluación morfología e histológica de los co-cultivos.....	43
4.4.1.1	Hematoxilina-Eosina.....	44
4.4.1.2	Safranina O (Prophet y col., 1995).....	44
4.4.1.3	Azul de toluidina (Linch y Mellor, 1985).....	44
4.4.1.4	Azul Alcian pH 2,5 (Prophet, 1995).....	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Cultivos primarios y subcultivos.....	45
5.1.1	Células mesenquimales provenientes del tejido adiposo del epidídimo del ratón adulto .....	45
5.1.2	Fibroblastos provenientes de fetos de ratón.....	45
5.1.3	Condrocitos provenientes de fetos de ratón.....	47
5.2	Evaluación morfológica e histológica de la inducción de la diferenciación hacia el linaje condrogénico.....	48
5.2.1	Co-cultivo de CMM con fibroblastos mantenidos en medio nutritivo .....	48
5.2.2	Co-cultivo de CMM con fibroblastos mantenidos en medio condrogénico .....	51
5.2.3	Co-cultivo de CMM con condrocitos mantenidos en medio nutritivo .....	51
5.2.4	Co-cultivo de CMM con condrocitos mantenidos en medio condrogénico.....	54
6	DISCUSIÓN.....	56
7	CONCLUSIONES.....	64
8	BIBLIOGRAFÍA.....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

### FIGURAS

1. Clasificación de células madres.....	12
2. Esquema de los sistemas de co-cultivo.....	43
3. Fotomicrografía de una monocapa de células mesenquimales de cultivo primario coloreadas con Azul de Toluidina.....	46
4. Cultivo primario de fibroblastos coloreados con H/E.....	46
5. Cultivo en monocapa de condrocitos coloreadas con Azul de Toluidina.....	48
6. Cultivo en monocapa de condrocitos del primer pasaje coloreadas con H/E.....	49
7. Co-cultivo de células mesenquimales con fibroblastos en medio nutritivo coloreados con Azul Alcian pH 2,5.....	50
8. Co-cultivo de células mesenquimales con fibroblastos en medio nutritivo coloreadas con Safranina O.....	50
9. Co-cultivo de células mesenquimales con fibroblastos en medio condrogénico coloreados con azul Alcian pH 2,5.....	52
10. Co-cultivo de células mesenquimales con fibroblastos en medio condrogénico coloreadas con Safranina O.....	52
11. Co-cultivo de células mesenquimales con condrocitos en medio nutritivo coloreadas con Azul Alcian pH 2,5.....	53
12. Co-cultivo de células mesenquimales con condrocitos en medio nutritivo coloreados con Safranina O.....	53
13. Co-cultivo de células mesenquimales con condrocitos en medio condrogénico coloreadas con azul Alcian pH 2,5.....	54
14. Co-cultivo de células mesenquimales con condrocitos en medio condrogénico coloreadas con Safranina O.....	55

## ABREVIATURAS

CMM: células madres mesenquimales.  
DMEM: medio de cultivo Eagle's modificado por Dulbecco's  
DMSO: Dimetil sulfóxido  
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético  
EGF: factor de crecimiento epidérmico.  
GAGs: glicosaminoglicanos.  
MEC: matriz extracelular.  
IGF: factor de crecimiento similar a la insulina.  
TGF- $\alpha$ : factor de crecimiento transformante  $\alpha$ .  
TGF- $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$ .  
PBS: solución buffer fosfato  
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.  
PG: proteoglicanos.  
F12: medio de cultivo Ham's.  
FGF: factor de crecimiento de fibroblastos.  
BPM: proteína morfogénica ósea.  
SFB: suero fetal bovino.  
RER: retículo endoplasmático rugoso.  
REL: retículo endoplasmático liso.

## **1. INTRODUCCIÓN**

Hoy por hoy la gran prevalencia de enfermedades y lesiones junto con la capacidad insignificante para auto-repararse del cartílago es uno de los focos de investigación en bioingeniería del cartílago (Bigdeli y col., 2009).

### **1.1 Cartílago**

El cartílago, también llamado tejido cartilaginoso es un tejido conectivo especializado, constituido por células condrógenas (condrocitos y condroblastos), fibras colágenas, elásticas y matriz extracelular (MEC) la cual se forma y se mantiene a través de este tipo celular. Este tejido se especializa para proveer sostén, siendo una estructura avascular, fuerte y flexible. Las principales funciones son servir como almacén flexible; permitir que los huesos se muevan libremente en las articulaciones a la par que sostienen un gran peso y sirven como precursor de los huesos largos del organismo. Además ofrece poca resistencia a la presión, recuperando su forma cuando aquella cesa, propiedad que se conoce como resiliencia. (Surribas y Lawzewitsch, 1984; Gartner y Hiatt, 1997; Dellmann y Carithers, 1999; Mondalvo, 2010).

#### **1.1.1. Desarrollo del cartílago**

La formación del cartílago se lleva a cabo durante el proceso de gestación embrionaria, iniciándose con la formación de las capas germinales, donde a partir de las células mesenquimales que constituyen el mesodermo se desarrolla el brote primordial, éstas células condensan dando origen a un esbozo de esqueleto cartilaginoso que se forma

por acción de diversos factores paracrinos, activación de factores de transcripción, señalización interna y se ve facilitado por alta densidad de células; luego las células que conforman dicho esbozo comienzan a diferenciarse en condroblastos que secretan matriz cartilaginosa. Estos condroblastos se separan entre sí por efecto de la abundante MEC y al quedar encerrados por dicha matriz se transforman en condrocitos, los cuales son las células maduras del cartílago. La región más próxima al condrocito es un espacio denominado condroplasto, el cual es una laguna en la que se mantiene cada célula o conjunto de células, el interior de esta zona es llamado cápsula o matriz territorial y a medida que la matriz se aleja del condrocito esta zona recibe el nombre de matriz interterritorial, diferenciándose de la anterior por su baja concentración de proteoglicanos (PG), componente de la matriz cartilaginosa (Carbona y col, 2006; Ross y Pawlina, 2007; Sanchis, 2009).

Todo este proceso ocurre en el embrión formándose regiones específicas que se convierten en segmentos de cartílago, mientras que algunas células se vuelven indiferenciadas y alargadas simultáneamente con la pérdida de colágeno tipo II y aparece la expresión de colágeno tipo I. Esta región se conoce como la articulación entre zonas, la cual desempeña un papel fundamental en el desarrollo del cartílago articular, menisco y los ligamentos. Ésta se compone de tres capas: la capa central, formada por células dispuestas al azar entre dos capas condrogénicas más densas. En las capas condrogénicas, las células se alinean paralelamente a la región de las epífisis adyacente. Por otra parte, en el embrión humano durante la séptima semana, los condrocitos en la región central de los segmentos cartilaginosos se hipertrofian y la matriz comienza a calcificarse. El tejido óseo reemplaza al cartílago calcificado proceso que se describe como osificación endocondral, por lo cual éste constituye el principal centro de osificación. Los condrocitos en cada lado del centro

primario de osificación pasan por una secuencia de proliferación, maduración e hipertrofia de la placa en crecimiento. El tejido óseo se expande longitudinalmente, ya que continuamente reemplaza el cartílago hipertrófico. El crecimiento del tejido óseo a partir del primero y segundo centro de osificación, finalmente reemplaza todo el tejido del cartílago en el centro de los huesos largos, mientras que sólo la capa de cartílago que cubre la extremos de los huesos persiste durante toda la vida y proporciona una superficie suave para el conjunto de articulación, por lo que se llama cartílago articular (Wang y col. 2009).

### **1.1.2 Composición del cartílago**

El cartílago se compone por condrocitos, condroblastos y una gran cantidad de MEC. Como se menciona previamente, las células condrogénicas o condroblastos poseen una alta capacidad secretora y una vez que son rodeadas por la matriz se diferencian y se convierten en condrocitos. La MEC del cartílago ocupa el 90% o más del volumen total y se compone de macromoléculas estructurales y de sustancia fundamental que no es más que una sustancia amorfa con la consistencia de un gel y que está constituida en general por el agua, minerales y de sustancias inorgánicas (Paniagua y col., 2002).

Las macromoléculas estructurales de la MEC del cartílago se clasifican en tres grandes grupos: los colágenos, PG, y otras proteínas no colágenas. **Los colágenos** incluyen varios tipos entre ellos: II, VI, IX, X y XI, siendo el colágeno tipo II el de mayor abundancia, representando entre el 90 y 95% del total de colágeno en el tejido cartilaginoso. Los colágenos tipo II, IX, y XI forman la matriz de fibrillas, en la cual el colágeno tipo IX puede unirse covalentemente a una fibrilla en un extremo y en el otro extremo a otra molécula de colágeno tipo IX. Esta interacción permite que las fibrillas de

colágeno formen una malla, atrapando en el tejido otras macromoléculas como los PG. El colágeno tipo VI conecta los condrocitos y la MEC circundante, mientras que el colágeno tipo X, desempeña un papel en la mineralización. Los **PG** del cartílago incluyen agregan, decorina, fibromodulina, y perlecan. Estas moléculas constan de un núcleo de proteína y una o más cadenas laterales de glicosaminoglicanos (GAGs), los cuales están compuestos por polisacáridos de unidades repetidas de disacárido, que son modificadas con grupos amino, carboxilato o sulfato. Tomando en cuenta la composición de las unidades de disacárido y los grupos de sustitución, los GAGs se clasifican en condroitín sulfato, queratán sulfato, heparán sulfato y dermatán sulfato. Cada PG tiene una composición única de GAGs, por ejemplo el ácido hialurónico es una molécula de GAGs de alto peso molecular sin núcleo de proteínas. Los GAGs poseen características hidrofílicas y los agregados de PG grandes ayudan a mantener el alto contenido de agua en el tejido. Por lo tanto, PG agregados en conjunto con la malla de colágeno dan la rigidez del cartílago y resistencia a las repetidas cargas mecánicas (Ross y Pawlina, 2007; Wang y col., 2009; Sanchis, 2010).

### **1.1.3 Tipos de cartílago**

El tejido cartilaginoso de acuerdo a su composición y lugar donde se encuentra se puede clasificar en:

### **1.1.3.1 Cartílago hialino**

El cartílago hialino es el más abundante del cuerpo humano formado principalmente por fibrillas de colágeno tipo II. Se encuentra presente en el esqueleto nasal, la laringe, la tráquea, los bronquios, los arcos costales (costillas) y los extremos articulares de los huesos, este tejido es avascular, nutriéndose a partir del líquido sinovial. Posee un pericondrio, el cual es una capa de tejido conjuntivo denso que se adhiere firmemente al tejido cartilaginoso, formado por células llamadas fibroblastos que acompañan de manera permanente a algunos órganos en los que es determinante su presencia para el buen funcionamiento (Carbona y col., 2006; Sanchis, 2009).

### **1.1.3.2 Cartílago Elástico**

Este tipo de cartílago se encuentra en el pabellón auricular, paredes del conducto auditivo externo, trompa de Eustaquio y epiglotis, siendo en el mismo los condrocitos más abundantes y grandes que los del cartílago hialino. La MEC presenta abundante colágeno tipo II, fibras y láminas elásticas, formando un entretejido denso de finas fibras elásticas, las cuales le confieren elasticidad, distensibilidad y maleabilidad proporcionándole mayor flexibilidad, en comparación con la MEC del cartílago hialino. El cartílago elástico está rodeado por pericondrio y su crecimiento es tanto intersticial como por aposición, a partir de éste. Este tipo de cartílago no se calcifica (Carbona y col., 2006; Sanchis, 2009).



### **1.1.3.3 Cartílago Fibroso o fibrocartílago**

Este tipo de cartílago se diferencia de los otros dos tipos en la distribución de los condrocitos ya que se encuentran dispersos dentro de las fibras de colágeno, no cuenta con gran cantidad de matriz, ni con pericondrio. Los condrocitos del fibrocartílago suelen surgir de fibroblastos que comienzan a elaborar PG. A medida que la sustancia fundamental rodea el fibroblasto, la célula queda encerrada en su matriz y se diferencia en una célula condrocítica. El cartílago fibroso se encuentra en los discos intervertebrales, sínfisis púbica, meniscos de rodilla, y en la inserción de los tendones con los huesos donde su función primordial es soportar compresión y distensión, además de actuar como amortiguador. Se considera un tipo transicional entre el cartílago hialino y el tejido conectivo denso que forma parte de tendones y ligamentos (Carbona y col., 2006; Sanchis, 2009).

### **1.1.4 Crecimiento del cartílago**

El crecimiento del cartílago se efectúa mediante dos tipos de mecanismos, crecimiento por aposición o exógeno y crecimiento intersticial o endógeno.

#### **1.1.4.1 Crecimiento aposicional**

El crecimiento aposicional se da a partir de la capa interna del pericondrio presente en los cartílagos hialino y elástico, por proliferación de las células mesenquimatosas de la zona profunda del pericondrio generando de manera continua nuevas capas de cartílago. Lo

continúa un proceso de diferenciación de estas células hacia condroblastos, los cuales segregan componentes de MEC como fibras colágenas, quedando las mismas incluidas en dicha matriz. Entonces, el cartílago crece hacia el exterior por la aposición de capas sucesivas (Carbona y col., 2006).

#### **1.1.4.2 Crecimiento intersticial**

En el crecimiento intersticial los condrocitos suelen reunirse en pequeños grupos denominados grupos isógenos o nidos celulares, constituidos cada uno de ellos por la prole de un condrocito que ha pasado por varias divisiones mitóticas. De esta forma el crecimiento intersticial desarrolla dos tipos de disposiciones: si la mitosis se efectúa en una sola dirección tenemos un grupo de condrocitos alineados, denominado grupo isogénico axial, pero si las divisiones se realizan en todos los sentidos, tenemos un grupo isogénico coronario (Carbona y col., 2006).

#### **1.1.5 Regeneración y reparación del cartílago**

La capacidad de regeneración del cartílago es muy pobre, debido a que los condrocitos del cartílago del adulto son incapaces de dividirse; sin embargo, en las lesiones del cartílago próximas a la superficie sinovial (donde las células de la membrana sinovial no han sido afectadas), puede ocurrir cierta cicatrización, a expensas de las células sinoviales que proliferan y producen fibrocartílago. Aunque se trata de un tejido con alta capacidad de resistencia, se ha demostrado en múltiples casos que, una vez que la célula condrocítica ha sufrido lesión, se observa que manifiesta una incapacidad en la reparación. También puede influir la propia avascularidad inherente al tejido; otras razones podrían ser

la baja capacidad migratoria y la confinación que tienen al microambiente cartilaginoso. Un condrocito maduro se limita principalmente a la producción de MEC en aras de la preservación de la superficie articular; sin embargo, al alcanzar la madurez le resulta difícil la división mitótica y, de hecho, la proliferación es escasa. Situación que conlleva irremediablemente a la pérdida paulatina de la celularidad del cartílago, y con esto, a la disminución en la MEC (Carbona y col., 2006).

### **1.1.6 Patologías asociadas al cartílago**

Actualmente, existe una alta incidencia de patologías causadas por la progresiva destrucción del cartílago. Estas patologías degenerativas representaran en pocos años enfermedades crónicas; las mismas están muy relacionadas con la edad y afectan la homeóstasis del cartílago (Guillen y col., 2005). Entre ellas podemos mencionar algunas como:

#### **1.1.6.1 Artritis**

La artritis es una enfermedad autoinmune, en la cual el sistema inmunológico ataca los componentes del cartílago, destruyendo al cartílago y el hueso subcondral. La prevalencia de la AR en la población mundial se sitúa entre 0,5 y 1% (Whang y col., 2009).

#### **1.1.6.2 Osteoartritis (OA)**

También llamada artrosis es una enfermedad degenerativa de las articulaciones, que se caracteriza por una progresiva pérdida de cartílago y una mayor formación de hueso subcondral, encontrando el nuevo hueso en formación en los márgenes de las articulaciones

(osteofitos). Más del 10% de la población de 65 años de edad sufre de artrosis, la principal causa de discapacidad en los ancianos (Hickey y col., 2003; Whang y col., 2009).

Para el tratamiento de estas patologías, existen diferentes tipos de terapia, sin embargo no son muy exitosas por lo cual hoy en día el abordaje terapéutico se basa principalmente en la producción de cartílago por bioingeniería de tejidos.

### **1.1.7 Bioingeniería de tejidos**

La bioingeniería de tejidos es la unión interdisciplinaria de los principios y métodos de ciencias de la ingeniería celular, molecular, biológica y la medicina clínica para desarrollar y mejorar las estrategias para recuperar tejidos dañados que tiene un enorme potencial médico para las personas que presentan daños en el tejido o enfermedades degenerativas (Falke y Atala., 2000; Whang y col., 2009). En esta ciencia el uso de las células madre es de gran importancia.

## **1.2 Células madre**

Las células madre son una de las alternativas más estudiadas y con mayores avances, en la bioingeniería de tejidos. Su característica principal es que son células indiferenciadas que tienen la asombrosa capacidad de convertirse en diversos tipos celulares.

En el 2006, el Comité de la Sociedad Internacional de Terapia Celular de células madre mesenquimales (CMM) propuso establecer un conjunto mínimo de cuatro criterios para la identificación de estas células. Estos criterios son los siguientes:

- a) Se adhieren al plástico en condiciones normales de cultivo.

- b) Tienen la capacidad de diferenciación condrogénica, adipogénica y osteogénica.
- c) Expresan marcadores de superficie como CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166.
- d) Carecen de la expresión de marcadores de linaje hematopoyético como c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19 y antígenos leucocitario humanos (HLA)-DR (Dominici y col., 2006).

Estas células representan un sistema de reparación para el cuerpo, pudiendo dividirse potencialmente sin límite para sustituir otras células que se han dañado (Perin, 2008).

### **1.2.1 Clasificación de las células madre**

Las células madre se pueden clasificar en dos tipos según el estadio de desarrollo del organismo de donde se extraigan: a) Células madre embrionarias, que tienen la capacidad de formar cualquier tipo de célula del cuerpo, no obstante, existen problemas éticos muy controversiales sobre su utilización en humanos. b) Las células madre adultas que son intrínsecas a varios tejidos. Las mismas son capaces de mantener, generar y reemplazar las células diferenciadas en su propio tejido como consecuencia de la renovación fisiológica. Actualmente se conoce que estas células madre mesenquimales generan células con la capacidad de diferenciación mas allá de los límites del propio tejido en donde se encuentran (Korbling y Estrov, 2003), no obstante presentan ciertas desventajas ya que se dividen de forma finita y pueden poseer mutaciones que no se manifiestan (Pecorino, 2001).

Además, estas células se pueden clasificar de acuerdo a su potencialidad, entendiéndose ello como la capacidad intrínseca que poseen de generar todos, uno o diversos tipos celulares (Figura 1), en base a lo cual se consideran tres tipos de células madre: a) totipotentes, como el cigoto y las células de la mórula, las cuales pueden generar un organismo completo y las membranas extraembrionarias; b) pluripotentes, como las de la masa interna del blastocisto y las células germinales embrionarias de la cresta gonadal entre la quinta y décima semana que generan cualquier tipo celular del organismo adulto y por último, c) las multipotentes que se encuentran en el tejido adulto y tienen la capacidad de generar células pero de la misma capa embrionaria que le dio origen al tejido.

Además, se han descrito dos tipos de células multipotentes: las células madre adultas que se encuentran en la médula ósea, tracto respiratorio, intestino, sistema nervioso, testículos, piel entre otros, y CMM que se encuentran distribuidas en los tejidos conectivos del cuerpo como el adiposo, cartílago, tejido óseo, tejido hematopoyético, tejido conectivo denso y laxo (Pecorino, 2001; Flores y Paniagua, 2006; Zamudio, 2008).

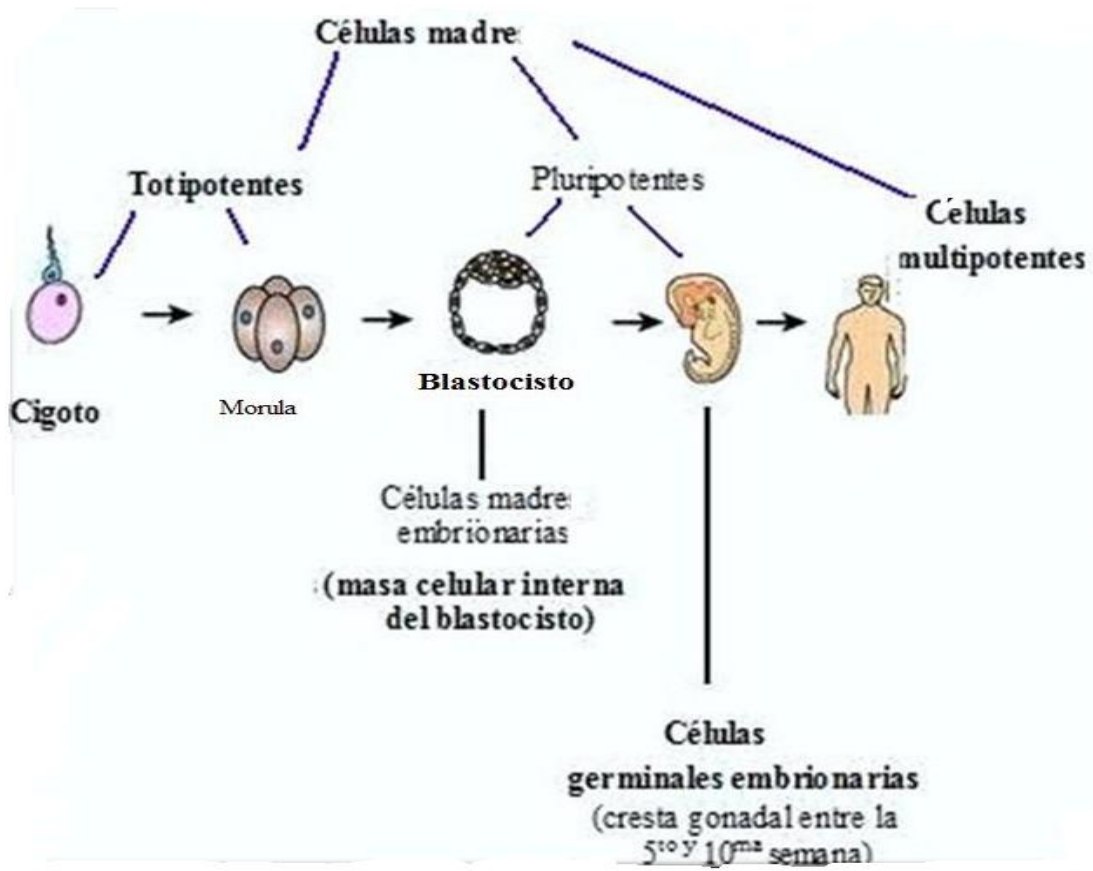


Figura 1. Clasificación de células madre. Tomado y modificado de Pecorino (2001).

## 1.2.2 Características, función y fuentes de obtención de las CMM de tejidos adultos

### 1.2.2.1 Características de la CMM

Las CMM tienen como característica principal presentar capacidad clonogénica, es decir, una CMM puede generar una línea de células genéticamente idénticas, con la capacidad de diferenciación “*in vivo*” hacia los tipos de células del tejido en el cual ellas residen, y en condiciones “*in vitro*”. Además que pueden diferenciarse a una amplia variedad de linajes celulares según el microambiente circundante y estas células poseen la

capacidad propia de renovación durante el período de vida del organismo (Roura y col., 2005; Rodríguez, 2005).

### **1.2.2.2 Función “*in vivo*” de las CMM de tejidos adultos**

Las CMM tienen como función fundamental en el organismo, mantener la homeóstasis, que es un proceso en el cual algunas células diferenciadas son eliminadas periódicamente y reemplazadas por nuevas células que se derivan de las células madre preexistentes en el tejido (Pellettieri y col., 2007). También sirven como reservorio para la renovación y reparación ya que, poseen un alto potencial autorrenovación mediando algunos mecanismos para evitar el rechazo alógeno. En este sentido, múltiples estudios han demostrado que evitan el alorreconocimiento, interfieren con las células dendríticas y la función de las células T e inducen un microambiente inmunosupresor local por la secreción de citocinas. El efecto inmunorregulador de las CMM humanas se incrementa cuando las células están expuestas a un medio ambiente inflamatorio caracterizado por un aumento local de interferón gamma (IFN) (Wang y col., 2009; Consuelo y col., 2010).

Por lo tanto, las CMM reflejan una población de células de regenerativas que pueden ser movilizadas en caso de lesión, enfermedad o degeneración, para inducir un mecanismo de reparación en conjunto con factores de crecimiento secretados por las mismas células.

Por otro lado, las CMM afectan el funcionamiento del sistema inmunológico. En este sentido algunos estudios realizados demuestran que pueden inhibir la proliferación de linfocitos inducida por aloantígenos, mitógenos como fitohemaglutinina y concavalina A, y anticuerpos anti CD3 y CD28. Así mismo, durante la maduración de las células dendríticas,



las CMM pueden inhibir la expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígenos (Pellettieri y col., 2007; Wang y col., 2009; Consuelo y col., 2010).

Considerando que la mayoría de este tipo de células poseen la capacidad reparadora de los tejidos, en los últimos años se han identificado y estudiado las CMM de diversos tejidos animales. Además se ha desarrollado una serie de técnicas que han permitido aislarlas, cultivarlas y manipularlas en condiciones “*in vitro*”.

### **1.2.2.3 Fuentes de obtención de CMM de tejidos adultos**

Las CMM de tejidos adultos se aislaron y caracterizaron originalmente a partir de medula ósea basándose en la capacidad de adherencia al plástico. Estas células en cultivo son capaces de mantener su potencialidad de diferenciación por largo tiempo y mostrar características de las células progenitoras. Actualmente diversos estudios han demostrado, que las CMM pueden ser aisladas con diferentes técnicas de una variedad de tejidos mesenquimales como cordón umbilical, pulpa dental, membrana sinovial, músculo, sangre, dermis, pericitos, hueso trabecular, periostio y tejido adiposo, entre otros ( Pittenger y col., 1999; Chen y Tuan, 2008; Wang y col., 2009). Haciendo referencia a este último tejido se ha demostrado en diversos estudios “*in vitro*” que el tejido adiposo es una fuente rica en CMM; éstas han sido aisladas de lipoaspirados o a partir de abdominoplastias (Zuk y col., 2002; Chen y Tuan, 2008; Bohrsen y col., 2009; Hildner y col., 2009; Hwang y col., 2011).

### **1.3 Tejido adiposo**

El tejido adiposo es un tejido conjuntivo especializado que cumple una función importante en la homeostasis energética; está conformado por adipocitos individuales o reunidos por grupos, los cuales derivan de las CMM indiferenciadas que están en la adventicia de las vénulas pequeñas (Ross y Pawlina, 2007).

#### **1.3.1 Tipos de tejido adiposo**

En los mamíferos existen dos tipos de tejido adiposo, el tejido adiposo unilocular o blanco y el tejido adiposo multilocular o pardo. Ambos sirven de aislamiento y protección al cuerpo, pero cada uno de ellos también cumple funciones específicas (Geneser, 2003).

**1.3.1.1 El tejido adiposo blanco** representa la mayor parte del tejido adiposo del adulto, en humanos es aproximadamente el 10% del peso corporal. También se le denomina tejido adiposo unilocular porque las células contienen una enorme gota lipídica, los adipocitos son células ovaladas aplanadas, muy grandes representan un diámetro hasta de 120µm, con un citoplasma reducido a una fina banda periférica que se separa de la gota lipídica por filamentos de vimentina, dispuestos tangencialmente a la gota, en donde el núcleo se encuentra desplazado al citoplasma. En el citoplasma además se destacan mitocondrias pequeñas, un complejo de Golgi poco desarrollado y canales tortuosos de retículo endoplasmático rugoso (RER) y retículo endoplasmático liso (REL). Este tejido se encuentra vascularizado, por lo cual cada adipocito está en contacto con al menos un capilar (Paniagua y col., 2002; Geneser, 2003).

Una de las funciones de los adipocitos del tejido adiposo blanco es el de producir leptina, una hormona que informa al cerebro del estado nutricional del individuo para regular la ingesta y el gasto energético y de amortiguar órganos vitales (Geneser, 2003).

**1.3.1.2** En contraste, **el tejido adiposo pardo** constituye una variante del tejido adiposo blanco, se encuentra en los mamíferos en los fetos y en los recién nacidos pero es raro en los adultos. Son células más pequeñas que las del tejido adiposo blanco presentan una morfología poligonal, el citoplasma no contiene una sola gota lipídica si no múltiples gotas lipídicas de tamaño variable, el núcleo no está desplazado y puede ser incluso central. El RER, REL y el aparato de Golgi se encuentran poco desarrollados.

La principal función de este tejido es controlar la ingesta de agua y de alimento además de mantener la temperatura. Adicionalmente es importante mencionar que el tejido adiposo pardo se caracteriza por ser lobulado y se distinguen más capilares que en el tejido adiposo blanco, dado que la irrigación sanguínea es más rica (Geneser, 2003; Ross y Pawlina, 2007).

Además de los adipocitos, en el tejido adiposo también se encuentran otros tipos celulares como las células del estroma vascular; componentes que incluye células musculares, células endoteliales, fibroblastos, células sanguíneas, células precursoras de adipocitos y poblaciones de células progenitoras indiferenciadas (Ross y Pawlina, 2007).

Diferentes estudios han demostrado que a partir del tejido adiposo se puede obtener CMM las cuales no requieren de muchos factores específicos para proliferar y mantener su potencial de diferenciación. La función de estas células “*in vivo*” es la de ser precursora de los adipocitos que forman parte de la masa total del tejido adiposo del organismo pero “*in vitro*” esta población de células es capaz de diferenciarse hacia distintos linajes celulares como: osteogénico, condrogénico, miogénico, neurogénico entre otros (Zuk y col., 2002; Rodríguez, 2009; Merentes, 2009; Hwang y col., 2011).

### **1.3.2 Características de las CMM provenientes del tejido adiposo**

A nivel morfológico, las células madre mesenquimales del tejido adiposo se observan como células fusiformes, que forman colonias similares a los fibroblastos. Pittenger y col. en 1999, demostraron mediante ensayos de diferenciación hacia distintos linajes celulares, que estas células no son fibroblastos. Estos linajes pueden ser osteogénico, adipogénico, miogénico, condrogénico y neurogénico (Pittenger y col., 1999; Rodríguez, 2005 y 2009; Merentes, 2009).

Para caracterizar el fenotipo de las CMM existen una serie de anticuerpos monoclonales que permiten determinar el fenotipo de estas células, los cuales expresan antígenos de superficie tales como SH2, SH3, CD9, CD10 (CALLA), CD13 (aminopeptidasa), CD29 ( $\beta$ 1-integrina), CD49e( $\alpha$ -5 integrina), CD55 (DAF), CD106 (ALCAM), Vimentina y STRO-1. Estos han sido considerado como marcadores de las CMM (Gomillón y col., 2006).

### **1.3.3 Plasticidad y transdiferenciación en CMM**

Como ya se ha mencionado, existe un gran número de evidencias experimentales que apoyan la idea de que las CMM poseen la capacidad de generar tipos celulares especializados diferentes al de su origen embrionario, cuestionando de esta manera el paradigma tradicional de la biología del desarrollo, sugiriendo que estas células, poseen una enorme plasticidad. Los datos sugieren que las CMM tienen la capacidad de transdiferenciarse y aunque se han postulado mecanismos alternativos, como la fusión

celular, aparentemente esta transdiferenciación puede ocurrir a través de un proceso de de-diferenciación y re-diferenciación (Beltrán y col., 2005).

La evidencia de un estado mayor de potencial de diferenciación de las CMM ha llevado a introducir el concepto de **Plasticidad Celular**, que es la capacidad de una CMM de un tejido específico para generar un tipo celular especializado diferente al de su origen embrionario. Por lo tanto, al evaluar la plasticidad en condiciones experimentales, deben cumplirse criterios básicos que incluyen: la capacidad de autorenovación, la diferenciación morfológica y funcional hacia tipos celulares de un origen embrionario y por lo menos a un tipo celular de diferente linaje.

De la misma manera se ha cuestionado el proceso de diferenciación celular debido a que habla también de la clasificación de las células madre como unipotentes en donde éstas se encuentran comprometidas a un linaje específico a lo largo de toda la vida del organismo; lo cual está siendo debatido gracias a los resultados de diferentes trabajos de investigativós. En donde se ha denominado **Transdiferenciación** a la capacidad de las CMM para dar origen a células de diferente origen embrionario probablemente debido a la influencia de factores del microambiente extracelular, lo cual implica la conversión de una célula a otro tipo de célula de un linaje distinto, acompañado de la pérdida de marcadores específicos y de la función del tipo celular original y de la adquisición de marcadores y función de otro tipo celular (Beltrán y col., 2005).

La transdiferenciación involucra la reprogramación genética de la célula y si ésta reprogramación ocurre directamente o a través de un proceso de múltiples pasos, todavía es un tema en investigación. Sin embargo, se ha propuesto que esta conversión celular puede

sucedan por la activación directa de un programa de diferenciación que altere la especificidad del linaje original, o a través de un proceso de pérdida de diferenciación (des-diferenciación) de una célula de un tejido específico a un estado primitivo, seguido de la re-diferenciación hacia un nuevo linaje celular. Por ello es posible que el microambiente en el cual se introduzcan las CMM induzca una reprogramación genética por la expresión de diversos factores solubles sobre las células, y ser capaces de ejercer un efecto en la activación de genes silenciados (Beltrán y col., 2005; Calderón, 2007; Zamudio, 2008).

#### **1.4 Microambiente**

Podemos definir microambiente como el entorno que rodea a las células en donde se encuentre, dicho entorno está compuesto por diversas sustancias y factores producidos y secretados naturalmente en el lugar donde se encuentre la célula o a través del torrente sanguíneo teniendo efecto en otro lugar. Este efecto puede ser estimulador o inhibitorio y actúa sobre los receptores de las células diana por diferentes vías: La endocrina donde las células secretoras liberan el factor a la sangre alcanzando a la célula diana en un lugar alejado; la paracrina, donde una molécula de señalización es producida por una célula y se difunde hasta una célula diana que se encuentra cercana y la autocrina, que se da por unión de la célula y una molécula de señalización producida por ella misma. *In vivo* se dan las tres vías, mientras que "*in vitro*" sólo las dos últimas (Lodish y col., 2005). Los factores antes mencionados regulan la morfología, proliferación, diferenciación y metabolismo de las CMM. Todo esto sugiere que el microambiente forma un papel fundamental en el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre mesenquimales, y en la inducción hacia un tipo celular específico (Rodríguez, 2009).

A pesar de la capacidad para cultivar y mantener estas células “*in vitro*” , la verdadera naturaleza de las CMM, solo puede ser entendida mediante el estudio del microambiente que los rodea. Es ahí donde juegan un papel importante los factores epigenéticos que son todos aquellos factores no genéticos que intervienen en la determinación del desarrollo del organismo. En este sentido diversos estudios “*in vivo*” e “*in vitro*”, han mostrado que estos factores tienen una profunda influencia sobre la morfología, proliferación, diferenciación y respuesta metabólica de las células madre mesenquimales. Entre los factores podemos mencionar: la composición del medio, densidad celular, organización espacial, fuerzas mecánicas, interacción célula-célula, célula-matriz extracelular y factores de crecimiento específicos (Pittenger y col., 1999).

#### **1.4.1 Factores solubles**

Factores solubles pueden ser suministrados a las células en el medio de cultivo o con la utilización de una matriz “*in vitro*” o pueden encontrarse en el microambiente donde son trasplantadas “*in vivo*” permitiendo la inducción de las células hacia otro linaje (Calderón, 2007; Zamudio, 2008). Estos factores influyen sobre el comportamiento de las células madre, y pueden estar presentes en el medio de manera soluble (**Factores solubles**), y presentar una naturaleza biológica (proteínas u hormonas), ó química ( $\beta$ -mercaptoetanol, alcoholes, etc.) (Freshney, 2000). Además son responsables en parte, de la inducción a la diferenciación y transdiferenciación de células. Se encuentran formando parte del suero, utilizado muchas veces en la suplementación del medio, pero además puede adicionarse, creando así los denominados medios inductores; muy utilizados actualmente

en la canalización de un fenotipo determinado en las células poco diferenciadas y células madre. Estos, pueden ser fisiológicos y no fisiológicos.

Los fisiológicos se dividen en: esteroides (hidrocortisona), hormonas peptídicas (insulina, tirotropina), citoquinas, factores de crecimiento transformante, interleucinas, vitaminas, minerales; y los no fisiológicos como por ejemplo DMSO (Dimetil Sulfoxido). Ambos tipos de factores junto con los factores epigenéticos han sido señalados como responsables de regular el proceso de diferenciación celular en cultivo (Freshney, 2000).

La acción de los compuestos solubles de naturaleza orgánica sobre los cultivos de CMM es objeto de estudio. Hoy por hoy se conoce la acción de algunos de ellos en la diferenciación celular, por lo que son utilizados en los medios inductores de diferenciación. Así como por ejemplo los medios de diferenciación condrogénica contienen ácido ascórbico, insulina, dexametasona, TGF- $\beta$ , BMP, entre otros (Pittenger y col., 1999; Wang y col., 2009).

Entre los efectos de estos factores solubles encontramos a la dexametasona glucocorticoide sintético eleva la actividad de enzimas como la colagenasa y la fosfatasa alcalina; tiene una influencia en el fenotipo de las células indiferenciadas a distintas concentraciones, induciendo la expresión del sistema cartilaginosa, la secreción de una matriz ósea o la formación de inclusiones lipídicas. Otro factor soluble de importancia es la insulina, la cual es una hormona polipeptídica secretada naturalmente por las células pancreáticas tipo  $\beta$ , actuando de manera autocrina o paracrina por la unión a su receptor de membrana. *In vivo*, se encarga de regular el metabolismo de la glucosa y la síntesis lipídica, "*in vitro*" es necesaria para el mantenimiento de las células, debido a sus propiedades



como mitógeno. La insulina juega un papel importante en el mantenimiento del fenotipo diferenciado, en la estimulación de la síntesis de glicógeno y de ácidos grasos.

El ácido ascórbico, puede actuar como: antioxidante, agente donador de electrones, cofactor para el óptimo funcionamiento de otras enzimas y sustrato de enzimas (Mathews y col., 2003). Estudios del efecto de este factor soluble sobre las células en cultivo revela varias funciones, todas ellas asociadas con un fenotipo ósteo-condrogénico, estimulando la síntesis de componentes de la MEC principalmente la secreción de procolágeno y su conversión a colágeno (Portal, 2009). De la misma manera, **las Vitaminas** ejercen un papel importante en el control del desarrollo y mantenimiento del cartílago. La vitamina A influye en el crecimiento del cartílago, su falta hace que disminuya el espesor de las placas de crecimiento epifisiarias que determinan la longitud del futuro hueso y su exceso también reduce el crecimiento de dichas placas. La vitamina C determina que se forma la matriz cartilaginosa, en su ausencia no se desarrollan ni las fibras ni la sustancia fundamental. La vitamina D no es necesaria para el mantenimiento del cartílago pero sí lo es impiden la calcificación. La ausencia de esta vitamina, asociada a la falta de calcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) y fósforo (P), impide la osificación del cartílago. En este proceso de regulación también la hormona hipofisaria del crecimiento (GH) es necesaria para el desarrollo del cartílago, en concreto para que se produzca proliferación celular. Otra hormona como la tirotropina (TSH) favorece el desarrollo del cartílago mediante la producción de hormonas ( $\text{T}_3$  y  $\text{T}_4$ ). Recientemente se ha estudiado el efecto estimulador de la proliferación celular de los condroblastos por la calcitonina, hormona segregada por las células parafoliculares de la glándula tiroidea (Paniagua y col., 2002).

Por otra parte el, suero fetal de Bovino (SFB) provee componentes como aminoácidos, lípidos, factores de crecimiento, vitaminas, hormonas e inhibidores de proteasas, en cantidades desconocidas, que varían en los diferentes lotes, lo que afecta el comportamiento de las células en cultivo y pueden potenciar la acción de unos factores epigénicos sobre otros (Bianco y col., 2001).

Dentro de los factores solubles también encontramos a los **Factores de Crecimiento**, los cuales son moléculas de señalización que pueden actuar como mitógenos promoviendo la proliferación de ciertos tipos de células o como morfógenos induciendo el cambio en el fenotipo de células diana.

Existe una gran cantidad de factores de crecimiento, muchos de ellos agrupados en familias. Los más conocidos son el factor de crecimiento epidermal (EGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento transformante (TGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), las proteínas morfogénicas óseas (BMP), el factor de crecimiento transformante tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Miguell y col., 2001; Estrada y col., 2006).

Entre los factores que influyen sobre la proliferación y diferenciación de las CMM hacia el linaje condrogénico existe un gran número de factores de crecimiento que inducen vías de señalización intracelulares a través de la unión a receptores de superficie celular y de esta manera las células se inducen a proliferar, diferenciarse, y sintetizar las proteínas de la MEC demostrándose que la presencia de los factores de crecimiento son esenciales para la formación de cartílago *in vivo* e *in vitro* (Wang y col., 2009).

Los miembros de la superfamilia de TGF- $\beta$  se encuentran muy relacionados estructuralmente, y regulan algunas de las interacciones de desarrollo más importantes. Tal es el caso de la familia TGF- $\beta$ 1, 2,3 y 4 que son importantes en la regulación y formación

de MEC entre las células, y además regulan la división celular (positiva y negativamente). TGF- $\beta$ 1 incrementa la cantidad de MEC que producen los condrocitos, TGF- $\beta$ s se ha demostrado que tiene el mayor potencial condrogénico inductivo en las CMM para aumentar la síntesis de MEC en los condrocitos, así mismo el EGF presenta fuertes efectos reguladores sobre los condrocitos y condrogénesis de las CMM. La BMP-2, miembro de la superfamilia de TGF-b, y el FGF-18 también se ha demostrado que promueven la condrogénesis de las CMM. Al mismo tiempo estas proteínas junto con IGF incrementan la producción de PG (Chen y Tuan, 2008; Wang y col., 2009).

#### **1.4.2 Medios condicionados**

En la actualidad se están utilizando medios condicionados para el mantenimiento e inducción de la diferenciación de las CMM “*in vitro*”. Se denomina medio condicionado al medio de cultivo celular que contiene los factores secretados por las células en cultivo en un tiempo dado (Rodríguez, 2009). Un medio condicionado es el de fibroblasto obtenido a partir de cultivos de fibroblastos. Como se sabe, los fibroblastos en condiciones “*in vivo*” e “*in vitro*” sintetizan una serie de factores crecimiento entre los que podemos mencionar el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), FGF, IGF, TGF- $\beta$ , entre otros. Adicionalmente las células tipo fibroblastos sintetizan componentes de MEC como el colágeno, elastina, PG y GAGs, entre otros (Citado en Rodríguez, 2009).

En base a esto se puede afirmar que los medios condicionados proporcionan una fuente de factores solubles y componentes de MEC sintetizados por las células en cultivo, pudiendo dichos factores y componentes ayudar a crear un microambiente muy similar a las condiciones que rodean a las CMM en un nicho particular (Rodríguez, 2009).

### **1.5 Interacción célula – célula**

Se conoce que la interacción célula-célula influye en la transcripción y vía de especialización de las células vecinas. Esto supone la generación y recepción de señales moleculares que pueden activar o desactivar la síntesis y expresión de proteínas. Durante la diferenciación celular hay períodos críticos donde adquiere fundamental importancia el contacto con otras células o con sus productos. La presencia de un tipo celular específico induce a las células adyacentes para que se diferencien de cierto modo, un tipo celular puede inducir la dirección de desarrollo del otro (Freshney, 2000; Pellettieri y Sánchez, 2007).

### **1.6 Interacción célula – MEC**

Así como la interacción célula-célula, la interacción célula-MEC es una fuente importante de señales que influyen sobre el comportamiento, crecimiento, migración, adhesión y diferenciación celular. La MEC consiste en un arreglo de macromoléculas secretadas por células de un ambiente inmediato. Estas macromoléculas forman una región de material no celular en el intersticio entre las células. La MEC es una región crítica para la mayor parte del desarrollo animal (Geneser, 2003). Muchas moléculas entre ellos los factores de crecimiento y proteasas (inhibidores y receptores) están asociados bioquímica y funcionalmente con la MEC

## 1.7 Sistema de cultivos

Para la realización de los estudios de cultivo “*in vitro*” ya sea establecimiento de cultivos o inducciones, es necesario el mantenimiento de las células en sistemas de cultivo apropiados dependiendo del objetivo propuesto. El tipo de cultivo a aplicar toma en cuenta el tipo de células y la biología de las mismas, en el caso de inducciones. Para las células anclaje-independientes es más adecuado utilizar cultivos en suspensión debido a que estas células no expresan moléculas de adhesión, por el contrario las células anclaje-dependientes son cultivadas en monocapa, teniendo mejores resultados sobre superficies de plástico previamente tratadas que facilitan la adhesión celular. También están los cultivos de “*feeder layer*”, que consisten en hacer crecer las células de interés sobre otra capa de células, principalmente fibroblastos a los cuales se les inactiva su división celular por irradiación con rayos X o por el uso de Mitomicina C. Este tipo de cultivo es ampliamente aplicado en la ingeniería de tejidos para la creación de piel, ya que los queratinocitos, células encargadas de producir todos los estratos epidérmicos, solo crecen sobre *feeder layer* de fibroblastos, los cuales liberan factores al medio que hacen posible el crecimiento de los queratinocitos, además de establecer las interacciones necesarias para su correcto desarrollo (Freshney, 2000). En el caso de inducciones, sobre todo del tipo condrogénico u ósteo-condrogénico se utilizan cultivos tridimensionales.

### 1.7.1 Sistema tridimensionales

Los sistemas tridimensionales en cultivo han brindado la posibilidad de simular de alguna manera la arquitectura del tejido *in vivo*, permitiendo ubicar las células

espacialmente y darles características muy parecidas al tejido nativo, este aspecto es importante para inducir la diferenciación hacia un linaje celular específico (Rodríguez, 2009). Entre estos sistemas de cultivo encontramos a los co-cultivos que permiten en condiciones “*in vitro*” la inducción por interacción celular indirecta, estratificación y polarización celular. Uno de los sistemas de cultivo tridimensional es el de co-cultivo, el cual se basa en la utilización de insertos que poseen una membrana de policarbonato que permite la recombinación de células de diferentes linajes, siendo en el caso de las CMM y las células epidérmicas, lo cual permitió el intercambio de factores solubles sintetizados por las células, liberados al medio de cultivo y que pueden inducir la diferenciación de las CMM hacia un linaje celular específico (Freshney, 2000).

A pesar de que en la inducción de las CMM hacia el linaje condrogénico se han utilizado diversos sistemas de cultivo tridimensional, el cultivo de estas células en un sistema tridimensional utilizando membranas Millipore de policarbonato no ha sido reportado. Es por ello que es nuestro interés emplear ese tipo de co-cultivo, ya que de esta manera podríamos contribuir a conocer un poco más sobre el microambiente natural que se tiene en el proceso de desarrollo. Así mismo podría ayudarnos a entender mejor las interacciones entre las células mesenquimales, los condrocitos y los fibroblastos.

## 2. ANTECEDENTES

El término de células madre aparece por primera vez en el año 1948 cuando Lepak, reportó un caso de transmutación de una leucemia mieloide en una leucemia linfática o en una leucemia temprana de células madre indiferenciadas. A pesar de haber trabajado con células extraídas de organismos adultos, no es sino hasta finales los años 60 y durante la década de los setenta, cuando las células madres adultas son estudiadas. Friedenstein y colaboradores empleando ratones y cobayos, describieron por primera vez una población de células adherentes de médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético. Dichas células fueron denominadas como mecanocitos estromales o unidades formadoras de colonias de fibroblastos (Citado en Figueroa y col., 2006).

En la década de los 80 varios grupos de investigación se dieron a la tarea de caracterizar la población celular de la medula ósea, capaz de originar el estroma medular, hueso y cartílago. Durante esta etapa los investigadores trabajaron intensamente en la caracterización y la biología de las CMM. Los estudios se basaban en modelos animales, principalmente ratones, a los que se les trasplantaban células de medula ósea de ratones singénicos (Citado en Figueroa y col., 2006).

En un trabajo realizado por Owen y colaboradores (Citado en Figueroa y col 2006) demostró que estas células tipo fibroblastos tienen la capacidad de originar tejido óseo, cartilaginoso y conjuntivo, y que a partir de una pequeña cantidad de células de medula ósea se generaban una gran cantidad de células estromales, lo que dejaba claro el gran potencial de diferenciación de estas células. Por otro lado Friedenstein y

colaboradores demostraron que las colonias de morfología fibroblastoide, formadas al cultivar *in vitro* una suspensión de células provenientes de médula ósea, derivadas de un solo progenitor mostraron también una gran capacidad proliferativa. A finales de los 80 Owen y Friedenstein propusieron que existía una célula troncal presente en el tejido conjuntivo asociado a la médula ósea, capaz de dar origen a diferentes tipos celulares, entre los que se incluía el tipo condrogénico (Citado en Figueroa y col., 2006).

Ya para la década de los 90 Caplan y colaboradores lograron obtener y diferenciar las CMM de humanos adultos modificando el método utilizado por Friedenstein. Su metodología consistía en obtener médula ósea de aspirados de cresta ilíaca de donadores sanos y células de médula de la epífisis femoral. Estos encontraron que de todas las células mononucleares sembradas, únicamente una baja proporción tenían la capacidad de adherirse y formar colonias. La mayor parte de las células adheridas tenían una morfología fibroblastoide, con pocas células poligonales, adipocíticas o redondeadas (Citado en Figueroa y col., 2006). Sin embargo, faltaban estudios más detallados sobre su biología. Así pues se llevaron a cabo por varios grupos de investigadores la caracterización y obtención de las células CMM además de su identificación a través de anticuerpos monoclonales y diferentes tipos de tinciones.

Los estudios de Pittenger y colaboradores (1999) demostraron la capacidad *in vitro* de las CMM humanas para diferenciarse en células adiposas, osteoblastos y condrocitos. Estos experimentos realizados a partir de colonias formadoras de fibroblastos (CFF) aisladas, demostraron además, que la diferenciación de estas células depende de su ambiente, y que no todas las CFF tienen el mismo potencial de diferenciación.



Varios grupos de investigadores han estudiado la plasticidad de las CMM. Entre ellos Rodríguez (2005), realizó un trabajo de inducción de células madre mesenquimales del estroma del tejido adiposo de ratón hacia el linaje ósteo-condrogénico, utilizando diferentes sistemas de cultivo tales como monocapa y células embebidas en matriz de colágeno tipo I, encontrando que estos modelos fueron los mejores sistemas para la inducción hacia el linaje osteogénico, no así para el condrogénico. Posteriormente Bosnakovski y col. (2006), trabajaron con la diferenciación de células madre mesenquimales de médula ósea (MSC) hacia un linaje condrogénico y su relación con la MEC de diferentes tipos de colágeno, demostrando que el colágeno tipo II, es el único que tiene el potencial para inducir y mantener la condrogénesis de las MSC, y con la interacción previa con el factor de crecimiento transformante beta1 (TGF- $\beta$ 1) aumenta la diferenciación. Araos en 2009, estableció cultivos en monocapa, así como un sistema de micromasas de células madre del cordón umbilical; donde las células sometidas a inducción mediante el empleo de medios condrogénicos u osteogénicos mostraron una diferenciación hacia estos linajes.

Merentes (2009), en un estudio sobre la inducción de CMM obtenidas de diferentes fuentes, como por ejemplo el tejido adiposo, el cual a través de señales presentes en el microambiente "*in vitro*", logró inducir las a diferenciarse hacia otros linajes. Determinó que estas células mesenquimales inducidas pueden expresar proteínas específicas del linaje ósteo-condrogénico, muscular y del fenotipo neural luego de su inducción con los diferentes sistemas de cultivo, factores solubles y de crecimiento, así como la utilización de biomatrices de colágeno tipo I.

Ya para el 2010, Masoumeh y Vahideh realizaron el aislamiento, identificación y diferenciación de células madre derivadas del tejido adiposo de ratón denominados por ellos (ADSCs) hacia los linajes adipogénico, cardiogénico y neurogénico usando medios inductores. Ellos demostraron que el tejido adiposo tiene una población de células madre que expresan marcadores específicos de las células mesenquimales y la mayoría de ellos carecen de la expresión de marcadores de células hematopoyéticas y células endoteliales. Además estas células recién aisladas expresan Oct4 que es una molécula típica de la pluripotencialidad de las células embrionarias. También determinaron que estas células al ser inducidas, expresan características propias del linaje adipogénico, neurogénico y cardíaco; lo cual sugiere que las ADSC son un buen candidato de células pluripotenciales para futuras terapias de remplazo celular. Otro estudio realizado con este tipo celular, fue llevado a cabo por Hellingman y colaboradores en el 2010, donde demostraron que la diferenciación “*in vitro*” de estas células, tiene lugar en etapas similares a las de osificación endocondrial embrionaria, donde los receptores de factor de crecimiento de fibroblastos (FGFRs) son expresados diferencialmente, indicando que la modulación con subtipos de FGF durante diferentes etapas, condensación mesenquimal, seguida por diferenciación condrogénica e hipertrofia, afecta la cantidad de cartílago formado.

Con respecto a la utilización de matrices, se han realizado varios estudios, entre estos el llevado a cabo por Kisiday y col. (2008) quienes utilizaron dos tipos de hidrogeles para evaluar la condrogénesis de las células madre mesenquimales de médula ósea (BM- MSC) y células progenitoras derivadas del tejido adiposo (ADPC), encontrando que el mejor sistema es el de agarosa y que existe un incremento en la condrogénesis de las BM- MSC en comparación con ADPC. Zhang y colaboradores (2009), utilizaron una matriz, en

este caso de alginato de calcio, con células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (CMTA) para reparar un defecto producido en el cartílago articular. Ellos demostraron que las células por sí solas tienen la capacidad de reparar el defecto del cartílago producido. Las CMTA cultivadas en una matriz con alginato de calcio permitió reparar el defecto del cartílago de manera que no se observan diferencias entre el cartílago reparado y el cartílago normal, a diferencia del cartílago reparado con células solas que formaron una red de tejido fibroso fino, mientras que el cartílago reparado con gel de alginato de calcio solo formó una red suave de alginato de calcio sin células homogéneas en deposición. En otra investigación Dickhut y colaboradores (2010) utilizaron una matriz de biocompuestos bifásicos reabsorbibles para señalar el uso de biomateriales como estimuladores de condrogénesis de CMM. Cada uno de los biomateriales evaluados permitió mejorar la deposición de proteoglicanos comparado con cultivos convencionales de micromasas libres de biomaterial. Los biocompuestos bifásicos mostraron una alta biofuncionalidad en una forma continua estable con una mejoría en la condrogénesis y aportando localmente el TGF- $\beta$ 1, el cual puede ser utilizado para mejorar las estrategias asistidas por matriz en la reparación del cartílago.

Así mismo la utilización de los sistemas tridimensionales para la inducción de las CMM ha sido ampliamente desarrollado; entre algunos de los trabajos realizados tenemos el de Kinard y col. (1997), quienes desarrollaron un modelo de co-cultivo entre las células endoteliales de arteria pulmonar y células del músculo liso de porcino sobre una membrana porosa de policarbonato en un medio definido. Este modelo permite una interacción directa entre ambos tipos celulares permite la posibilidad de analizar por separado su comportamiento. Empleando dicho modelo, demostraron que las células

endoteliales pierden la expresión del factor von Willebrand, pero mantienen la expresión de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), mientras que células del músculo liso mantienen la síntesis de  $\alpha$ -actina y su fenotipo contráctil. Así mismo, en los co-cultivos de células endoteliales y células del músculo liso, se incrementó la proliferación, no así en co-cultivos autólogos.

Jiang y colaboradores (2005), desarrollaron un modelo de co-cultivo en el cual se emplea un cultivo en micromasa de condrocitos y posteriormente lo cubren con osteoblastos permitiendo la interacción directa entre estos tipos celulares. Se observó que se mantiene el fenotipo de los condrocitos y los osteoblastos.

Un sistema tridimensional de microesferas mesenquimales fue introducido por Bohrsen y col. (2009). Este permitió una diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica eficiente de las células progenitoras mesenquimales de ratón bajo condiciones estandarizadas. Así mismo demostraron que el sistema necesita de un número 7 veces menor de células en comparación con otros protocolos clásicos de diferenciación. Al mismo tiempo Hildner y col. (2009), a través de un sistema tridimensional de co-cultivos de células madre derivadas de tejido adiposo (ASC) y condrocitos articulares autólogos (HAC) cultivados en micromasas, difieren claramente en su potencial condrogénico comparado con un cultivo de HAC. La sustitución de HAC con ASC resultó en una disminución de la condrogénesis comparada con el 100% de HAC estándar. Sin embargo cuando los datos fueron relacionados con el porcentaje inicial de HAC se observó un efecto contributorio por parte de ASC, esto indica que el sistema tiene potencial para mejorar la regeneración del cartílago. Así mismo, Najmuddin y Kyriacos (2009), mediante un sistema

de co-cultivo de células de menisco y condrocitos articulares en un soporte de ácido poli L-láctico lograron establecer un tejido de menisco funcional.

De modo similar, Rodríguez (2009), realizó un estudio comparativo del potencial de diferenciación hacia el linaje epitelial de las células mesenquimales provenientes del tejido adiposo de ratón y de humano bajo la influencia de diferentes condiciones inductoras “*in vitro*”, entre ellas el co-cultivo de células mesenquimales del tejido adiposo con células epidérmicas y/o fibroblastos utilizando membranas microporosas, con lo cual logró demostrar que hay inducción hacia este linaje epitelial en los co-cultivos de células mesenquimales con células epidérmicas.

En cuanto a los factores reguladores de los condrocitos, un estudio llevado a cabo en el 2011, por Schroepel y colaboradores sugieren una relación entre los efectos reguladores de los factores de transcripción y crecimiento en la función de los condrocitos articulares adultos y su significado en la osteoartritis (OA). Estos involucran moléculas de señalización transcripcional específicas como Nfat1, factor nuclear de activación de células T), Runx2 (factor de transcripción asociado a la diferenciación de los osteoblastos),  $\beta$ -Catenina (proteína asociada a la vía de señalización Wnt, conocida por inducir la maduración condrocítica y la osificación endocondral durante el desarrollo esquelético) afectando la expresión de múltiples factores anabólicos y/o catabólicos en condrocitos articulares, los cuales juegan un importante papel en el desarrollo de OA, mayor que el efecto de una sola citoquina /proteínasa catabólica asociada con la degradación del cartílago osteoartrítico.

Diversos estudios se han realizado en la caracterización de las CMM y su inducción hacia diferentes linajes, quedando claro que uno de estos linajes es el

condrogénico. Se sabe que el cultivo de condrocitos es poco viable cuando hablamos de bioingeniería de tejidos por lo cual es importante continuar la búsqueda de condiciones para la producción de este tipo celular. Es por ello que en este estudio se evaluaron algunas condiciones en el mantenimiento e inducción de las CMM hacia el linaje condrogénico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Inducir el proceso de diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales del tejido adiposo empleando un sistema de co-cultivo con cartílago de ratón.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Aislar las células mesenquimales del tejido adiposo de ratón adulto.
- Establecer el cultivo en monocapa de las células mesenquimales del tejido adiposo de ratón.
- Obtener los condrocitos y fibroblastos de fetos de ratón.
- Establecer el cultivo en monocapa de condrocitos y fibroblastos.
- Establecer los co-cultivos de células mesenquimales con condrocitos y/o fibroblastos.
- Evaluar el efecto del medio inductor sobre la diferenciación condrogénica.
- Evaluar a nivel estructural la diferenciación condrogénica de las células mesenquimales mantenidas en co-cultivo.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. Material biológico**

Para el establecimiento del cultivo de las células mesenquimales se utilizaron ratones machos adultos jóvenes (Mus musculus) de la cepa NMRI, mientras que para la obtención de los condrocitos y fibroblastos se utilizaron fetos obtenidos de ratones hembras de la cepa NMRI, con 18 a 20 días de gestación. Estos fueron obtenidos del bioterio del Instituto de Biología Experimental (IBE) y fueron gentilmente suministrados por el Dr. Gilberto Payares.

### **4.2. Aislamiento de los diferentes tipos celulares y establecimiento de cultivos en monocapa:**

#### **4.2.1. Células mesenquimales provenientes del tejido adiposo del epidídimo del ratón adulto.**

Las células del tejido adiposo fueron obtenidas según el método seguido por Rodríguez (2005) con algunas modificaciones. Para ello se sacrificaron los ratones adultos por dislocación cervical, se realizó un corte transversal en la piel en la parte baja del abdomen, se levantó y se separó de la musculatura subyacente para exponer el tejido adiposo del epidídimo, el cual se colocó en una solución tampón de fosfato salino (PBS) con antibióticos (estreptomicina 200 mg/ml y penicilina 200 U/ml) y luego se seccionó en pequeños trozos. Seguidamente, a estos trozos de tejido, se le añadió colagenasa tipo I (SIGMA) al 0,05% y fueron colocados en agitación continua durante 30 minutos a 37°C.



Transcurrido este tiempo los trozos se dejaron sedimentar, y el sobrenadante se centrifugó durante 5 minutos a 1500 g. Posteriormente el taco celular se lavó dos veces con medio de cultivo Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM) suplementado con 15% suero fetal bovino (SFB) (Gibco), más antibióticos siendo el mismo denominado medio nutritivo.

La viabilidad celular fue determinada con el colorante de exclusión azul tripano, cuantificándose el número de células con la ayuda de un hemocitómetro.

Las células fueron sembradas a una densidad de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio nutritivo 1. Los cultivos se incubaron a 37°C, en una atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente se cambió el medio a las 24 horas de cultivo para eliminar los restos celulares y el cultivo fue mantenido realizando cambios periódicos del medio, hasta que alcanzó la semiconfluencia, luego se realizaron los subcultivos con el fin de amplificar la población de células mesenquimales. Las células que se obtuvieron fueron utilizadas para los ensayos de inducción de la diferenciación en co-cultivos y caracterización histoquímica.

#### **4.2.2 Fibroblastos provenientes de fetos de ratón**

Para la obtención de los fibroblastos se utilizó el método descrito por Freshney (2000). El ratón en gestación fue sacrificado por dislocación cervical e inmediatamente se realizó la disección en condiciones de asepsia. Para esto se hizo una incisión en la piel a nivel medio ventral. Seguido de un corte a lo largo de la línea media del abdomen quedando expuestas las vísceras. En esta fase se lograron observar los cuernos uterinos que contienen los fetos los cuales fueron extraídos y transferidos a una placa de Petri con PBS, una vez allí se eliminaron las membranas extraembrionarias: Luego se cortó la cabeza y se

extrajeron las vísceras, quedando la carcasa la cual fue lavada. Una vez eliminados los restos de sangre, se procedió a realizar cortes de aproximadamente 1 mm. Posteriormente se realizó una digestión enzimática con tripsina/EDTA (0,125%/0,02% en una relación 1:1) a 37°C con agitación continua por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se dejaron sedimentar los trozos, se retiró el sobrenadante y se inactivó la acción de la tripsina añadiendo con 5 ml medio DMEM + 10% SFB, más antibióticos (denominado medio nutritivo). Luego se centrifugó por 10 minutos a 1158 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el taco celular en medio nutritivo, y finalmente las células fueron sembradas en una relación aproximadamente  $1 \times 10^6$  células. Los cultivos se incubaron a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. A las veinticuatro horas se cambió el medio para eliminar los restos celulares y se mantuvo el cultivo hasta que alcanzó la semiconfluencia, realizando cambios periódicos del medio, luego se realizó el subcultivo con el fin de amplificar la población de fibroblastos, los cuales fueron utilizados para establecer los cocultivos.

#### **4.2.3 Condrocitos provenientes de fetos de ratón**

Para la obtención de condrocitos, se utilizaron fetos de ratón con 18 a 20 días de gestación según la metodología descrita previamente (4.2.2). En este caso se aisló el esternón y se eliminó el tejido muscular. Una vez aislado el tejido cartilaginoso se cortó en pequeños trozos de 1 mm aproximadamente. Estos fueron sometidos a una digestión enzimática en incubados en tripsina/EDTA (0,125%/ 0,02%) durante una hora a 37°C. Se inactivó la acción de la tripsina añadiendo medio de cultivo Ham's F12 (Gibco) con 10% SFB más antibióticos. Se dejó sedimentar los trozos y se descartó el sobrenadante, el

sedimento se lavó con PBS y se sometió seguidamente a la digestión enzimática esta vez con colagenasa tipo II a una concentración de 0,1mg/ml en medio de cultivo Ham's F12 con 10% SFB y se incubó a 37°C con agitación continua durante 2 horas. La suspensión celular resultante se filtró para eliminar los restos de mayor tamaño, el filtrado se centrifugó 10 minutos a 1158 g.

Se eliminó el sobrenadante y el taco celular se lavó dos veces en PBS para eliminar los restos de enzima, se resuspendió en medio condrogénico (medio Eagle's modificado por Dulbecco's mas Ham's (DMEM/F12) en una relación 1:1 suplementado con 10% SFB, 50µg/ml de ácido ascórbico, 10 µl/ml de Insulina,  $1 \times 10^{-7}$  M de Dexametasona mas estreptomycinina 200 mg/ml y penicilina 200U/ml) y se realizó el contaje y se sembró a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en medio de cultivo condrogénico.

Los cultivos fueron incubados a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 horas se cambió el medio de cultivo para eliminar los restos celulares y se mantuvieron los cultivos hasta que alcanzaron su semiconfluencia realizando cambios periódicos del medio. Finalmente se realizaron los subcultivos con el fin de amplificar la población de células.

### **4.3 Subcultivos celulares**

#### **4.3.1. Células mesenquimales provenientes del tejido adiposo del epidídimo del ratón.**

Para la realización de los subcultivos, las células fueron sometidas a un proceso de tripsinización, con una solución de tripsina/EDTA (0,125% / 0,02%), incubando a 37°C por 3 min. La enzima se inactivó con medio nutritivo 1 y la suspensión celular fue centrifugada

a 1500 g por 5 min, el taco celular obtenido se resuspendió en medio nutritivo. Las células fueron sembradas a una concentración de aproximadamente  $1 \times 10^6$  células. Finalmente, los cultivos se incubaron a 37°C, en atmósfera húmeda al 5% de CO<sub>2</sub>. La viabilidad celular se determinó según el apartado (4.2.1).

El mantenimiento de los subcultivos se realizó de la misma forma y bajo las mismas condiciones que los cultivos primarios descritos previamente. La morfología fue evaluada con un microscopio invertido de contraste de fase Olympus IX50 acoplado a una computadora y los registros, tanto de éste como de los demás experimentos, fueron tomados por el programa TV TUNER.

#### **4.3.2 Fibroblastos provenientes de fetos de ratón**

El subcultivos de fibroblastos se realizó empleando la metodología descrita en el apartado (4.3.1), y su crecimiento celular fue registrado de la misma manera.

#### **4.3.3 Condrocitos provenientes de fetos de ratón**

Se siguió la metodología descrita en el apartado (4.3.1). Con la diferencia de que el taco celular obtenido fue resuspendido en medio condrogénico. El mantenimiento de los subcultivos se realizó de la misma forma y bajo las mismas condiciones que los cultivos primarios descritos previamente.

#### **4.4 Establecimiento de los Co-cultivos**

Este sistema de cultivo se basó en la utilización de insertos, los cuales poseen una membrana Millipore de policarbonato que permite la interacción de células de

diferentes linajes, permitiendo el intercambio de los factores solubles sintetizados por las células, en este caso los factores solubles liberados por los condrocitos pueden inducir la diferenciación de las células mesenquimales hacia un linaje celular específico (Freshney, 2000).

Para el establecimiento de los co-cultivos se emplearon células mesenquimales del primer subcultivo, así como condrocitos y/o fibroblastos del primer pasaje. Los sistemas de co-cultivo fueron los siguientes:

**Sistema 1.** Co-cultivo de células mesenquimales y condrocitos:

Condrocitos del primer subcultivo fueron sembrados en placas 3x4 a una densidad de  $1 \times 10^5$  células. Así mismo, las células mesenquimales del primer subcultivo fueron sembradas sobre el inserto a una densidad de  $1 \times 10^5$  células. Los insertos fueron transferidos a la placa donde previamente se sembraron los condrocitos y se les agregó medio condrogénico o medio nutritivo. Esto fue para evaluar el efecto del medio. La interacción celular se mantuvo durante 15 días.

**Sistema 2.** Co-cultivo de células mesenquimales y fibroblastos:

Se siguió la metodología descrita para el sistema 1, con la diferencia que en lugar de condrocitos las células sembradas en la placa fueron fibroblastos del primer pasaje (Figura 2).

Los co-cultivos fueron mantenidos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> por al menos 15 días con cambios de medios periódicos. La evaluación de la inducción de la diferenciación celular se estudió mediante microscopía de contraste de fase y coloraciones histoquímicas.

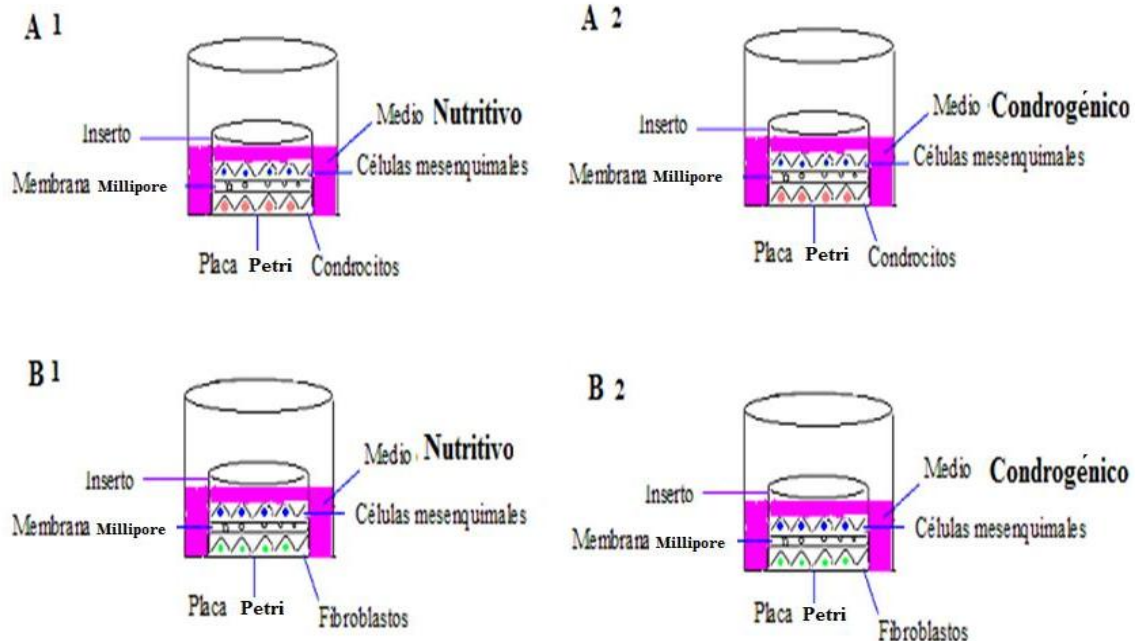


Figura 2. Esquema de los sistemas de co-cultivo.

#### 4.4.1 Evaluación morfológica e histológica de los co-cultivos.

Para observar los cambios morfológicos que ocurrieron durante la diferenciación “*in vitro*” de las células mesenquimales del tejido adiposo de ratón en los diferentes sistemas de co-cultivo, se realizaron observaciones periódicas al microscopio de contraste de fase tomándose los registros fotográficos correspondientes.

Por otro lado se analizaron las características citoquímicas mediante las coloraciones citológicas de las monocapas de las células en los co-cultivos, para ello se fijaron los co-cultivos con metanol al 100% durante 5 min y dejaron en etanol al 70%, posteriormente a los cueles se realizó las coloraciones respectivas.

#### **4.4.1.1 Hematoxilina-Eosina (H/E)**

Las muestras previamente fijadas fueron hidratadas y coloreadas con hematoxilina durante 1 min 30 seg.; lavadas con agua corriente, luego se pasaron por alcohol 50% por 30 seg.; posteriormente se colorearon con eosina por 1 min y finalmente fueron deshidratadas en una batería ascendente de alcoholes (70% a 100%).

#### **4.4.1.2 Safranina O (Prophet, 1995)**

Las muestras previamente fijadas fueron deshidratadas en una batería de alcohol y coloreadas con hematoxilina de hierro durante 7 min, se lavaron con agua corriente y se tiñeron con el colorante Fast Green durante 3 min, luego fueron lavadas con ácido acético al 1% (10-15 min) y finalmente coloreadas con safranina O al 1% durante 5 min, lavadas y observadas al microscopio.

#### **4.4.1.3 Azul toluidina (Linch y Mellor, 1985)**

Las muestras previamente fijadas con metanol fueron hidratadas con agua corriente y coloreadas con una solución de azul de toluidina al 0,1 % durante 10 min y luego se lavaron en agua corriente y se observaron al microscopio.

#### **4.4.1.4 Azul Alcian pH 2,5 (Prophet, 1995)**

Las muestras previamente fijadas fueron lavadas en solución de ácido acético 3% durante 3 min, luego coloreadas con azul Alcian pH 2,5 durante 30 min, contrastadas con hematoxilina férrica (30 seg). Seguidamente, se lavaron con agua corriente y luego con agua destilada, y finalmente observadas al microscopio.

## **5. RESULTADOS**

En este trabajo se realizó un estudio comparativo de la diferenciación condrogénica de las CMM de ratón en co-cultivos con condrocitos. Para ello se aislaron células mesenquimales, condrocitos y fibroblastos. Además se establecieron los cultivos en monocapa de estos tipos celulares.

### **5.1 Cultivos Primarios y Subcultivos de:**

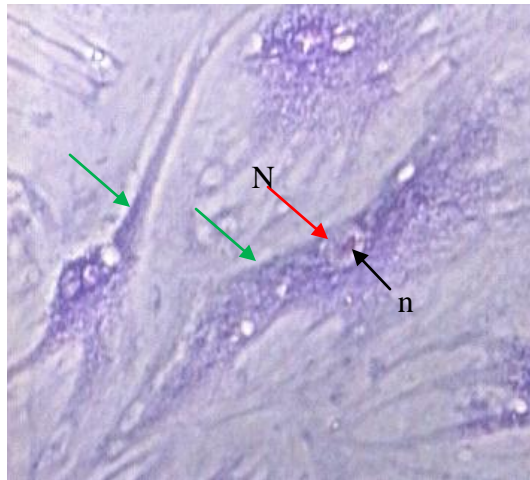
#### **5.1.1 Células mesenquimales provenientes del tejido adiposo del epidídimo del ratón adulto**

Durante el establecimiento y mantenimiento de CMM se observó una población heterogénea formada por células de citoplasma ancho y en mayor proporción células tipo fibroblastos que presentan una morfología fusiforme (Figura 3) con un citoplasma poco extendido, alargado con un núcleo central ovalado (N) el cual presenta un nucléolo (n) prominente, se diferencia de las células de citoplasma ancho las cuales presentan un citoplasma muy extendido. En los subcultivos se observó una población celular semejante.

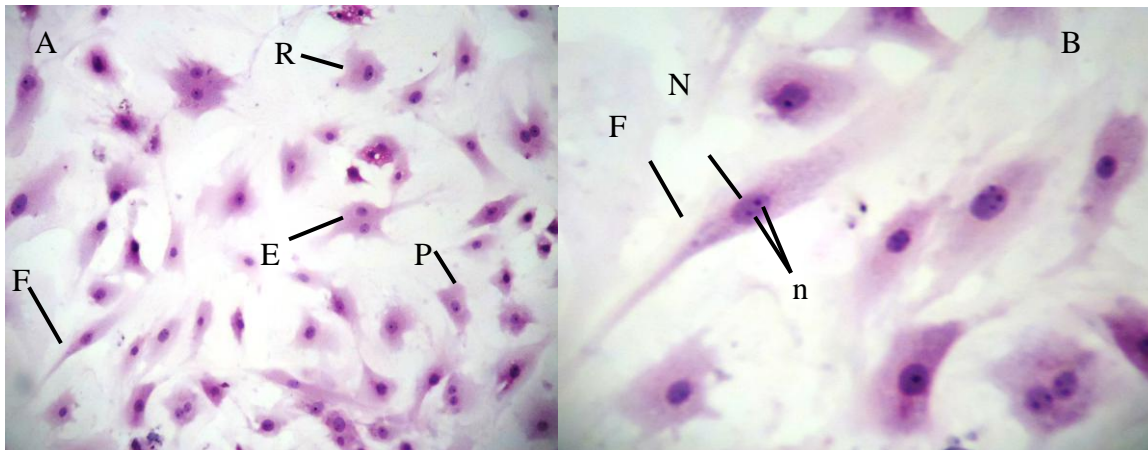
#### **5.1.2 Fibroblastos provenientes de fetos de ratón**

En relación al establecimiento del cultivo de fibroblastos de fetos de ratón, al igual que en el cultivo primario de células mesenquimales, se observó una población heterogénea (Figura 4A) donde se pueden diferenciar células redondeadas (R), poligonales (P), estrelladas (E) y células fusiformes (F), las cuales son predominantes. A mayor aumento (Figura 4B) se muestra un detalle donde se pueden ver diferentes tipos celulares,





**Figura3.** Fotomicrografía de una monocapa de células mesenquimales de cultivo primario coloreadas con Azul de Toluidina. Se muestran células tipo fibroblastos con morfología fusiforme (Flechas verdes) donde se aprecia el núcleo ovalado central (N) y nucléolo (n.) 5 días de cultivo. 200X.



**Figura 4.** Cultivo primario de fibroblastos coloreados con H/E. A. Población heterogénea de células tipo fibroblastos (F) con morfología fusiforme, células redondeada (R), células estrelladas (E) y células poligonales (P). 100X. B. Célula tipo fibroblasto (F) donde se aprecia la morfología fusiforme con núcleo(N) ovalado central prominente y uno o dos nucléolos (n). 2 días de cultivo. 250X.

destacándose una célula tipo fibroblasto con su morfología fusiforme típica (F), lo cual presenta pocas prolongaciones un núcleo (N) central ovalado e intensamente basófilo, mostrando además uno o dos nucléolos (n).

Una vez realizado el subcultivo se obtuvo una población más homogénea, presentando principalmente células tipo fibroblastos.

### **5.1.3 Condrocitos provenientes de fetos de ratón**

En el establecimiento y mantenimiento de los cultivos de condrocitos se hicieron al menos tres subcultivos como podemos ver en la figura 5 (Ay B) mostrándose que se produjo un cambio tanto morfológico, como en las características tintoriales de los cultivos. A nivel morfológico se observa en la figura 5A que los condrocitos presentan una morfología poliédrica típica, mientras que los condrocitos del tercer pasaje (Figura 5B) muestran una morfología fusiforme y predominante lo cual sugiere un proceso de desdiferenciación.

Con respecto a las características tintoriales también podemos ver que existen cambios. El colorante Azul de Toluidina es un colorante metacromático el cual evidencia componentes de matriz principalmente PG ácidos, ya que estos compuestos hacen que vire el colorante a color morado. Al comparar los cultivos del 1<sup>er</sup> y 3<sup>er</sup> pasaje (Figura 5A y 5B), observamos que en el primero se produce una mayor metacromasia sugiriéndonos la presencia de PG ácidos, mientras que en el tercer pasaje (Figura 5B) no se evidencia este cambio de color sugiriéndonos que estas células no están produciendo PG ácidos, lo cual apoya la sugerencia de un proceso de desdiferenciación. Estos resultados nos llevan a escoger los cultivos del primer (Figura 6) y/o segundo pasaje para realizar los co-cultivos debido a que se requiere que las células mantengan sus características tanto morfológicas como fisiológicas para realizar la interacción.

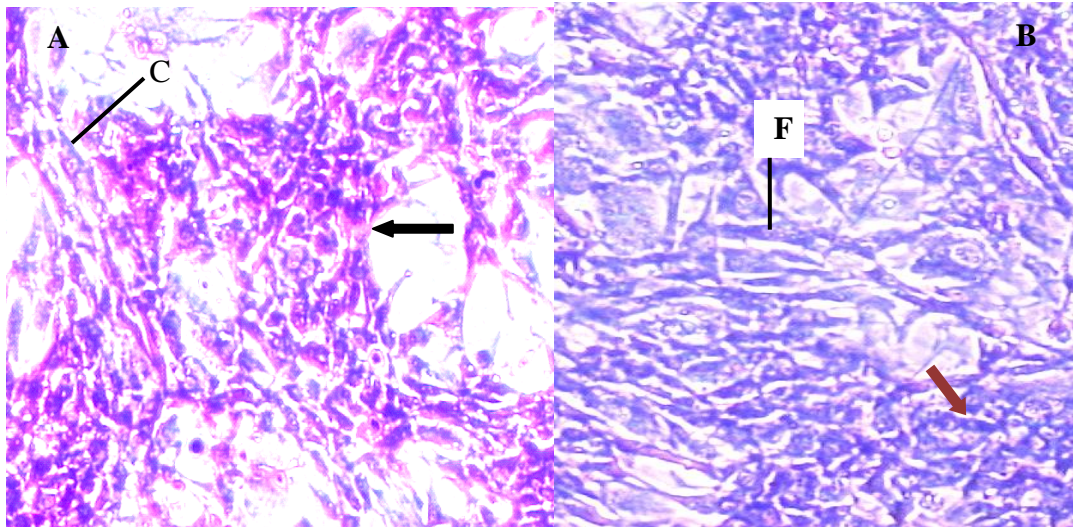


Figura 5. Cultivo en monocapa de condrocitos coloreadas con Azul de Toluidina. A. Primer pasaje; se observan células con su morfología típica hexagonal (C) nótese la intensa coloración morada en la MEC ( **➡** ). B. Tercer pasaje; se puede ver que las células tienen una morfología tipo fibroblasto (F) y que la coloración de la matriz se torna azul ( **➡** ). 2 días de cultivo. 100X.

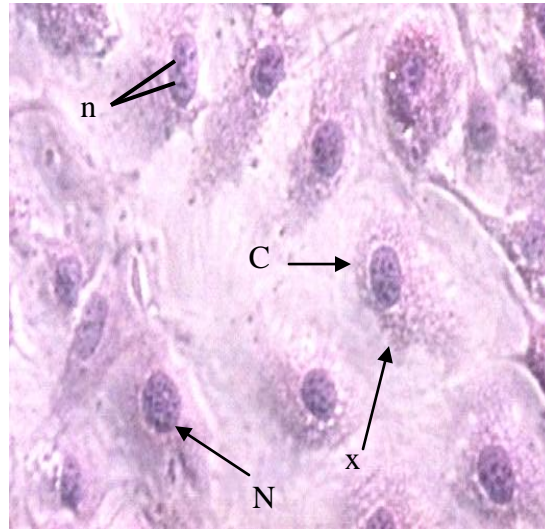
## 5.2 Evaluación morfológica e histológica de la inducción de la diferenciación de las CMM hacia el linaje condrogénico

La inducción de la diferenciación de las CMM del tejido adiposo hacia un linaje condrogénico se realizó empleando un modelo de co-cultivo (Figura 2). Además se estudió el efecto de dos medios diferentes, esto es un medio nutritivo y un medio condrogénico. Los mostrándose los resultados a continuación. El proceso de inducción se evaluó mediante dos técnicas histoquímicas: empleamos la coloración Azul Alcian pH 2,5 y una coloración Safranina O.

### 5.2.1 Co-cultivo de CMM con fibroblastos mantenidos en medio nutritivo

En la figura 7 se muestra una micrografía de las CMM del tejido adiposo co-cultivadas con fibroblastos y mantenidos con medio nutritivo y coloreado con Azul Alcian pH 2,5 el cual evidencia la presencia de GAGs ácidos carboxilados, allí podemos ver que

las células CMM forman cúmulos (C) o agregados celulares, sin embargo bajo estas condiciones no se observó la tinción característica que muestra la presencia de GAGs ácidos carboxilados.



**Figura6.** Cultivo en monocapa de condrocitos 1 pasaje coloreadas con H/E. Allí podemos ver una población de células con morfología hexagonal (C) con un citoplasma moderadamente basófilo (x) con núcleo prominente y levemente excéntrico (N) con múltiples nucléolos (n). 1 día de cultivo. 200X.

Así mismo se realizó la coloración Safranina O, la cual evidenció GAGs sulfatados. Al igual que cuando se realizó la coloración Azul Alcian pH 2,5 en este sistema no se observó la presencia de GAGs sulfatados ya que como podemos apreciar en la figura 8, no se produjo reacción con dicho colorante, sugiriendo la ausencia de estos compuestos en la matriz.

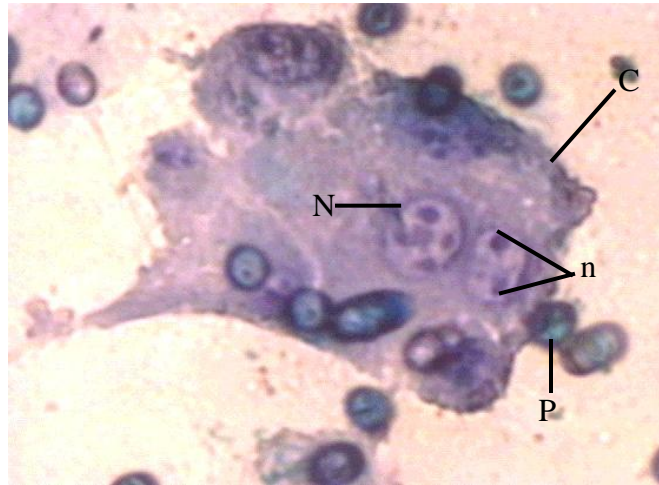


Figura 7. Co-cultivo de células mesenquimales con fibroblastos en medio nutritivo coloreados con Azul Alcian pH 2,5. Se observó que las células mesenquimales forman cúmulo (C), donde se distingue los núcleos (N) ovalados en los cuales presentan varios nucléolos (n). Cuando se colorearon no se evidenció la tinción característica que demuestra la presencia de GAGs ácidos carboxilados del tejido cartilaginoso en los cúmulos. Además se observan los poros de la membrana (P). Co-cultivo de 15 días. 400X.

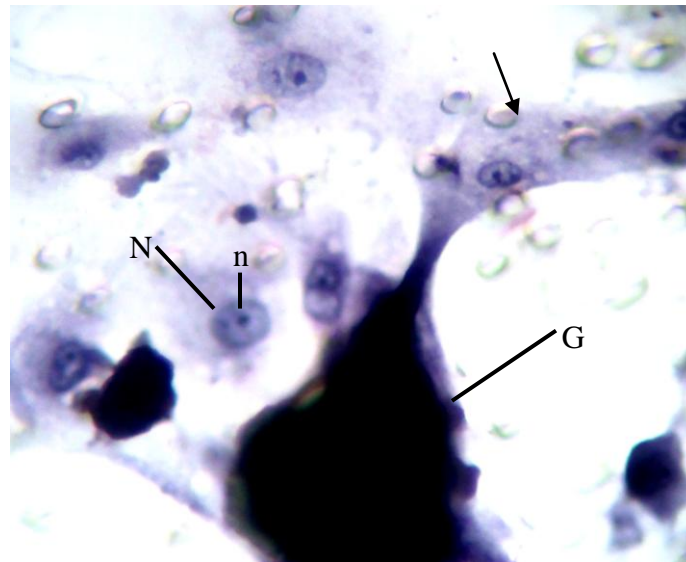


Figura 8. Co-cultivo de células mesenquimales con fibroblastos en medio nutritivo coloreadas con Safranina O. En la micrografía se observan células aisladas con núcleo (N) ovalado prominente y uno o dos nucléolos (n), morfología característica de las células mesenquimales (Flecha negra) y grupos de células (G). No se evidencia la presencia de GAGs sulfatados debido a que no se observa reacción con el colorante. Co-cultivo 15 días. 400X.

### **5.2.2 Co-cultivo de CMM con fibroblastos mantenidos en medio condrogénico**

Cuando se empleó el mismo sistema pero mantenido en medio condrogénico se observó que al igual que en el sistema anterior, las CMM tienden a formar cúmulos (C) ó agregados celulares, sin embargo al colorear con Azul Alcian pH 2,5 se produjo una reacción en la MEC con dicho colorante Figura 9 (A→C) sugiriendo la presencia de GAG ácidos carboxilados. De igual manera, al colorear con Safranina O (figura 10) se observó una leve reacción de la matriz, evidenciando la presencia de GAGs sulfatados.

### **5.2.3 Co-cultivo de CMM con condrocitos mantenidos en medio nutritivo**

Cuando se colorearon las CMM co-cultivadas con condrocitos mantenidos en medio nutritivo con Azul Alcian pH 2,5 (Figura 11) apreciamos una reacción de las MEC similar a la observada en el sistema previamente descrito, sugiriendo la presencia de GAGs ácidos carboxilados, mientras que al colorear con Safranina O (Figura 12) podemos ver una reacción de la MEC mayor que la observada previamente (Figura 10), indicando que hay una mayor presencia de GAGs sulfatados.

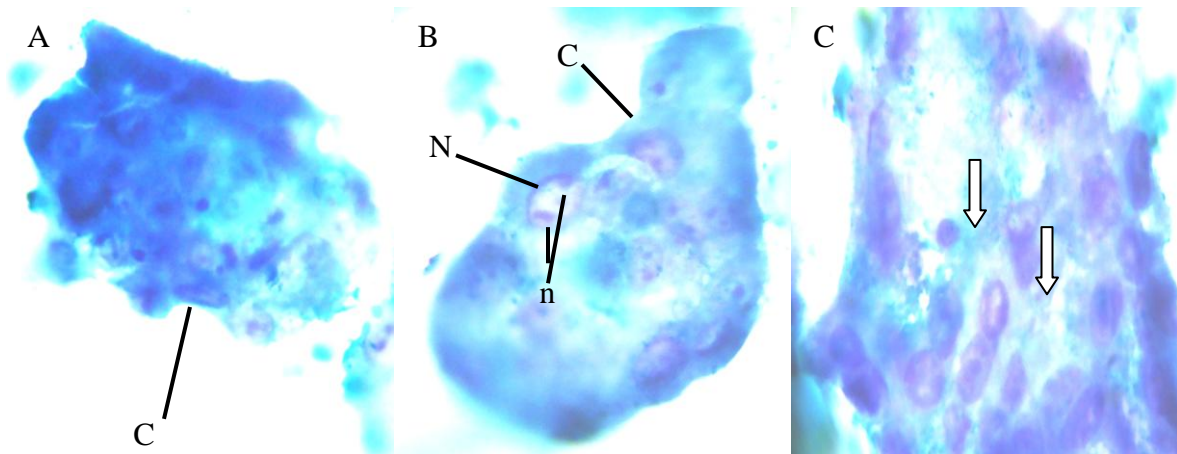


Figura 9. Co-cultivo de células mesenquimales con fibroblastos en medio condrogénico coloreados con azul Alcian pH 2,5.A-B. Se muestra un cúmulo de células (C) donde se puede diferenciar un núcleo (N) ovalado prominente con varios nucléolos(n).C En esta micrografía se puede apreciar la reacción de la MEC lo cual sugiere la presencia de GAGs ácidos carboxilados en los cúmulos de células mesenquimales (  $\Rightarrow$  Co-cultivo de 15 días. 1000x.

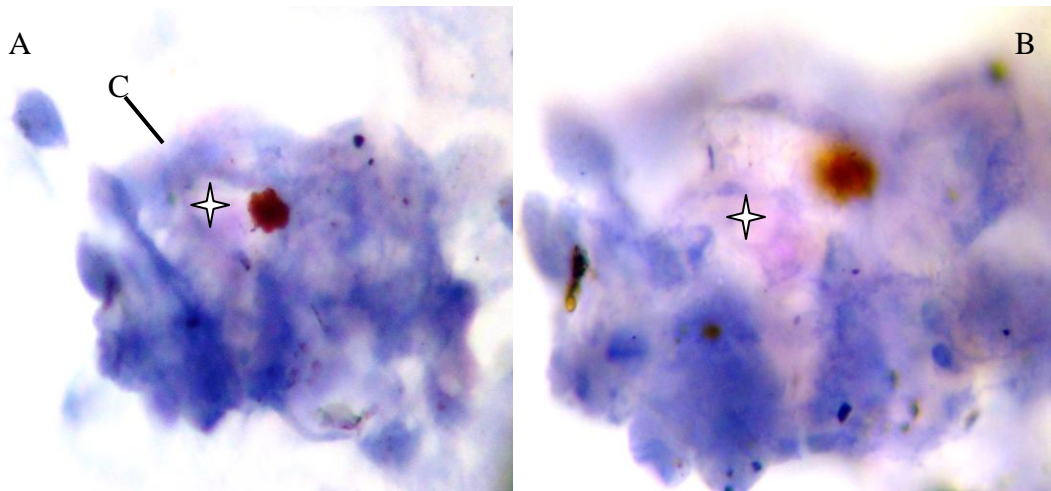
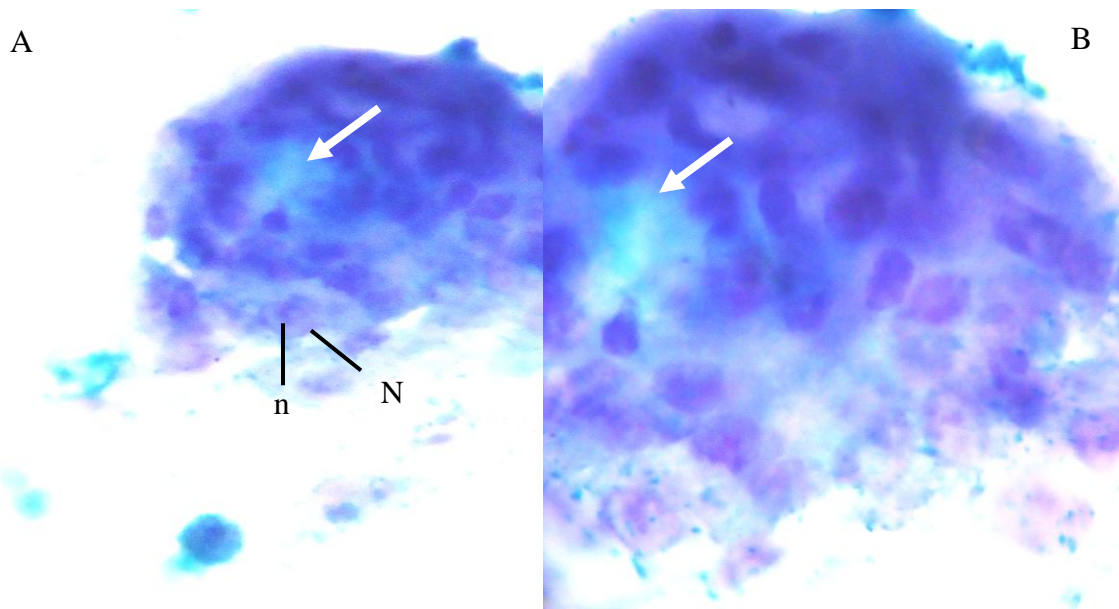
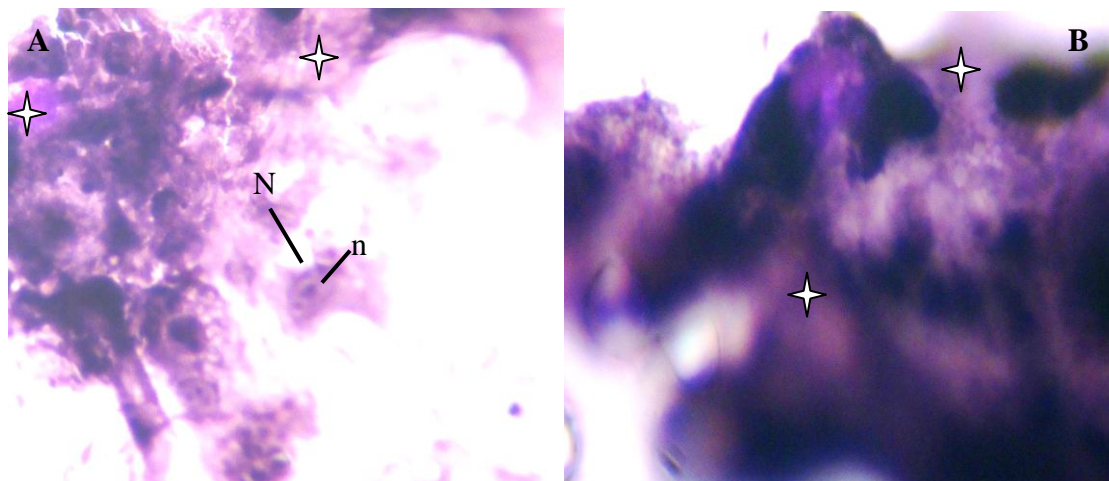


Figura 10. Co-cultivo de células mesenquimales con fibroblastos en medio condrogénico coloreadas con Safranina O. A. En la micrografía se observa un cúmulo de células mesenquimales (C), además se apreció una leve reacción de la MEC con el colorante. 250X. B. Detalle donde se aprecia la reacción de la matriz con una leve tinción naranja indicando la presencia de GAGs sulfatados (  $\star$  ). Co-cultivo 15 días. 400X.



**Figura 11.** Co-cultivo de células mesenquimales con condrocitos en medio nutritivo coloreadas con Azul Alcian pH 2,5. A. En la micrografía se muestra un cúmulo de células mesenquimales donde se pueden ver núcleos (N) ovalados prominentes con varios nucléolos (n). En la matriz se evidenció la presencia de GAGs ácidos carboxilados característicos del tejido cartilaginoso (Flecha blanca). 250X. B. Detalle donde se puede apreciar la intensa reacción de la MEC. Co-cultivo de 15 días. 1000X.



**Figura 12.** Co-cultivo de células mesenquimales con condrocitos en medio nutritivo coloreados con Safranina O. A-B. En las micrografías se muestran cúmulos de células mesenquimales donde se pueden diferenciar núcleos ovalados prominentes (N) con varios nucléolos (n), en estos se evidencia en la MEC la presencia de GAGs sulfatados debido a que se observa una leve coloración naranja (☆). 250X. B. Se evidencia la presencia de GAGs sulfatados en la matriz de estos cúmulos de células. Co-cultivos 15 días. 1000X.



#### 5.2.4 Co-cultivo de CMM con condrocitos mantenidos en medio condrogénico

Al realizar el co-cultivo de CMM con condrocitos y mantenidos con medio condrogénico observamos una mayor cantidad de cúmulos celulares; al evaluar estos cultivos con Azul Alcian pH 2,5 se evidenció una mayor intensidad en la reacción de la matriz (Figura 13 A y B). Cuando se evaluaron los co-cultivos con Safranina O (Figura 14) también se observó una intensa reacción en la matriz de estos cúmulos o agregados celulares ( ✧ ). Estos resultados nos sugieren una mayor presencia tanto de GAGs ácidos carboxilados como de GAGs sulfatados, componentes característicos de la MEC del tejido cartilaginoso.

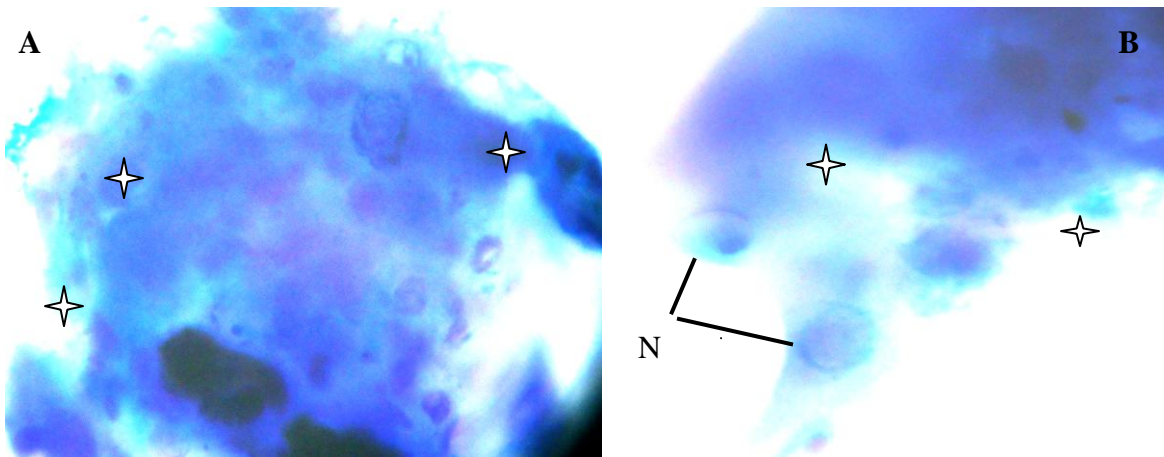


Figura 13. Co-cultivo de células mesenquimales con condrocitos en medio condrogénico coloreadas con azul Alcian pH 2,5. A-B. En las microfotografías se muestran los cúmulos de células mesenquimales donde se evidencia la presencia de GAGs ácidos carboxilados en la MEC ( ✧ ). B. Cúmulo de células mesenquimales donde se aprecian los núcleos (N) ovalados prominentes de las células. Co-cultivo de 15 días. 1000x.

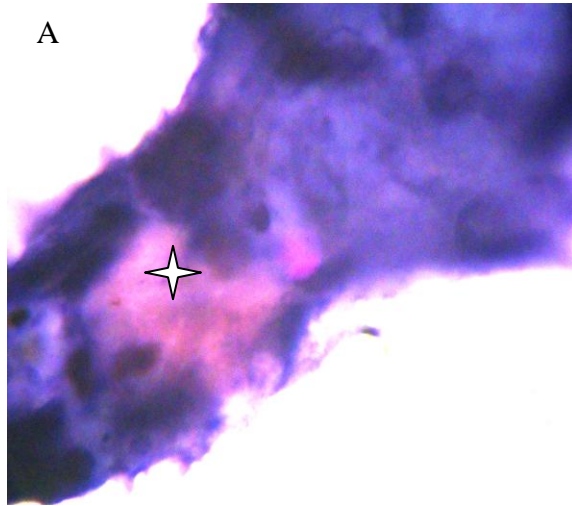


Figura. 14. Co-cultivo de células mesenquimales con condrocitos en medio condrogénico coloreadas con Safranina O. A. Se aprecia una intensa reacción que evidencia la presencia de GAGs sulfatados ( \* ) cultivo de 15 días. 1000X.

## 6. DISCUSIÓN

Como se ha referido anteriormente, la bioingeniería de tejidos, es un nuevo campo de la medicina, el cual está íntimamente ligado al conocimiento y el desarrollo de la histología que está centrado principalmente en la creación de tejidos artificiales para su utilización como herramienta terapéutica (Alaminos y col., 2007b). Para conseguir su objetivo la bioingeniería de tejidos necesita una fuente adecuada de células que sean funcionales y viables (Alaminos y col., 2007a), así como biomateriales y señales moleculares de distinta naturaleza. De este modo para crear tejidos necesitamos aislar células con capacidad proliferativa, que se obtienen habitualmente de tejido adulto específicamente de liposucciones o aspirados de tejido adiposo, siendo éstos una fuente de células madre de fácil acceso y con un gran potencial de diferenciación (Hildner y col., 2009). Las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo son un tipo de célula mesenquimal con potencial de regeneración (Dickhut y col., 2010) que se pueden inducir hacia diferentes tipos de células, como las células de cartílago (Bohrnsen y col., 2009). En el aislamiento de las CMM la frecuencia de células tipo fibroblastos es variable. En nuestro estudio, en el aislamiento de estas CMM se observó una heterogeneidad en la población celular conformada principalmente por dos tipos celulares: Células tipo fibroblastos y células de citoplasma ancho estas últimas presentaron un citoplasma amplio, extendido y emitieron muchas prolongaciones, contrario al tipo celular cuyas características morfológicas son similares a las de los fibroblastos (presentando un núcleo central con uno o dos nucléolos y un citoplasma fusiforme). La confluencia de los cultivos de CMM se obtuvo

generalmente entre los 5 y 7 días de cultivo. Luego de ello, se procedió a llevar a cabo el subcultivo en donde se observó una mayor homogeneidad celular constituida en su mayoría por células con morfología fusiformes. Esto nos sugiere que el método empleado para aislar y establecer los cultivos de CMM del epidídimo de ratón adulto nos permitió obtener poblaciones homogéneas a partir del primer subcultivo, lo cual está relacionado con los requerimientos específicos “*in vitro*” de las poblaciones de células presentes en el cultivo primario.

Estos resultados son similares a los reportados por otros autores, los cuales describen la obtención de una población heterogénea en el cultivo primario conformada por células tipo fibroblasto (Pittenger y col., 1999; Chen y Tuan., 2008; Rodríguez, 2009; Merentes, 2009; Wang y col., 2009; Masoumet y Vahideh., 2010; Kock y col., 2011) y células de citoplasma ancho o células de aspecto senescente (Mitchell y col., 2003; Araos, 2009).

Las células similares a fibroblastos son descritas como CMM del epidídimo de ratón adulto. Este tipo celular y la morfología que adquieren en cultivo, es reportado además para otras fuentes de obtención de CMM como: gelatina de Wharton (Calderon, 2007; Araos, 2009), médula ósea (Pittenger y col., 1999), entre otros. Para determinar que realmente son células madre, es necesario la utilización de marcadores específicos como: CD73, CD90, y CD105, que carecen de la expresión de marcadores de linaje hematopoyético como c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19 y antígeno leucocitario humano (HLA)-DR (Dominici y col., 2006), entre otros, sin embargo en el presente trabajo no se realizó este tipo de evaluación.

Por otro lado, las células de citoplasma ancho, observado en los cultivos, se asemejan a las células senescentes pero estas permanecen vivas por largos períodos de tiempo sintetizando proteínas y ARN, aumentando de tamaño, además de esto deberían presentar ausencia de agentes mitógenos por lo que también se han descrito como una subpoblación de CMM de citoplasma ancho (Mithell y col., 2003; López y col.,2005).

Diversos estudios han demostrado que la población de células con potencial de diferenciación del tejido adiposo no parece requerir de muchos factores específicos para proliferar y mantener su potencial de diferenciación. Sin embargo, se ha reportado que estas células pueden variar en cuanto a potencialidad de diferenciación y compromiso hacia un linaje celular en particular. Esto adiciona una variable a los cultivos, lo que resulta importante para la selección, pureza y comportamiento del cultivo. También es importante mencionar que la potencialidad puede variar de un individuo a otro, lo cual puede estar relacionado con la edad y/o condiciones fisiológicas (Zuk y col., 2002). Además, estudios sobre los métodos de cultivo de células multipotentes del tejido adiposo en presencia y ausencia de SFB, han demostrado que sin SFB se mantienen los preadipocitos en el cultivo y el potencial de diferenciación adipogénico. Por el contrario, ante la presencia de SFB, la cantidad de preadipocitos va disminuyendo y se pierde el potencial de diferenciación de las células que pudiesen estar canalizadas hacia el linaje adipogénico, permitiendo de esta manera comprometerse con otros linajes celulares según el microambiente circundante (Rodríguez y col., 2004). En nuestro caso, empleamos un medio suplementado con SFB, lo cual nos permitió obtener cultivos donde no se observaron células tipo adipogénicas. Por otro lado en el establecimiento de los cultivos en monocapa de fibroblastos se evidenció una población heterogénea al igual que en los cultivos primarios de las células

mesenquimales. En en este caso se observaron células con morfología variable y que cuando fueron subcultivados se logró obtener una población homogénea principalmente de células tipo fibroblasto, a partir del primer subcultivo. En este caso, el medio contenía los aminoácidos esenciales, vitaminas, hormonas y algunos factores de crecimiento que son importantes para el metabolismo y funcionamiento celular adecuado de los fibroblastos “*in vitro*” (Freshney, 2000). Estas condiciones suministradas a los fibroblastos de fetos de ratón en los cultivos celulares permitieron el establecimiento, mantenimiento y proliferación “*in vitro*” de las células. Esta proliferación es evidente ya que se alcanzó la confluencia en 2 ó 3 días después de la siembra. De igual manera, en el establecimiento de los cultivos en monocapa de condrocitos se evidenció una proliferación celular muy similar a la de los fibroblastos, es decir, los condrocitos cultivados sobre plástico a altas densidades mostraron un crecimiento en monocapa con 2 ó 3 días para alcanzar la confluencia, esta característica es importante tomando en cuenta que el número de células es un factor limitante para la producción de cartílago, ya que se sabe que el cartílago es un tejido con baja tasa de recambio celular (Wang y col., 2009). En estos cultivos se logró observar la morfología típica característica de los condrocitos (Figura 6). Cuando se realizaron los subcultivos de los condrocitos observamos que entre el primer y segundo pasaje estas células mantienen su morfología característica y además producen componentes típicos de la MEC del cartílago lo cual fue evidenciado mediante una coloración con Azul de Toluidina, colorante que permite la identificación de PG ácidos (Figura 5A). Sin embargo se observó que estas características tanto morfológicas como fisiológicas se van perdiendo después del tercer pasaje (Figura 5B) aún estando bajo las mismas condiciones. Estos resultados son similares a los reportados por Márquez y Merentes 2008 y Márquez 2009,

quienes observaron que después del tercer pasaje las células van adquiriendo una morfología similar a la de los fibroblastos y dichas células comienzan a producir colágeno tipo I, lo cual indica un proceso de desdiferenciación.

El mantenimiento del fenotipo de los diferentes tipos de células utilizados fue un punto importante en este trabajo ya que estas células fueron necesarias para el establecimiento de los diferentes sistemas de co-cultivos. Es por ello que se utilizaron fibroblastos, condrocitos y células mesenquimales del primer pasaje.

Es importante destacar que durante el desarrollo del cartílago embrionario, las células mesenquimales se someten a un proceso complejo que consiste en la condensación celular, proliferación y diferenciación, además de necesitar de interacciones célula-célula y de interacción célula-matriz extracelular altamente organizadas, factores de crecimiento y estímulos de activación mecánica para diferenciarse hacia cartílago (Wang y col., 2009). En este sentido, durante la realización de este trabajo observamos que las células mesenquimales se agruparon formando cúmulos celulares, es decir se produjo una condensación de células, siendo probable que esto se deba al uso de las membranas de policarbonato donde éstas crecieron para realizar el co-cultivo, puesto que mientras se cultivaron en plástico esta agregación no se observó. Es de hacer notar que se ha demostrado que este tipo de membrana puede guiar la migración, fusión, polaridad y agregación células (Citado en Rodríguez, 2009) y junto con los componentes que secretan las células con las cuales fueron co-cultivadas, permitieron a través de la participación de los factores paracrinos, la activación de factores de transcripción, y la señalización interna, junto con la alta densidad de células facilita la diferenciación hacia el linaje condrogénico (Ross y Pawlina, 2007) es decir, la diferenciación de las CMM hacia los condrocitos la

cual va a depender del microambiente circundante (Rodríguez, 2005). Esto fue evidenciado en este trabajo ya que como pudimos ver, cuando las CMM fueron cultivadas en diferentes condiciones, se obtuvieron distintos resultados. Es decir cuando estas células fueron co-cultivadas con fibroblastos en un medio nutritivo, solo se observó la agregación celular, la cual fue menor que cuando se cultivó estos tipos celulares con medio condrogénico. Así mismo, cuando se empleó el medio condrogénico, en estos agregados se pudo evidenciar la presencia de componentes de matriz característicos del cartílago como lo son GAGs ácidos carboxilados y GAGs sulfatados (Figura 9 y 10).

Se sabe que los fibroblastos ejercen un control paracrino sobre las CMM, mediante la síntesis y liberación al medio de cultivo de factores de crecimiento como el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), TGF- $\alpha$ ; IGF; FGF; entre otros (Lim y col., 2002; Huang y col., 2008). Sin embargo en nuestro trabajo no se evidenció este control, al menos no se observó una promoción hacia la diferenciación condrogénica, quedando por determinar si los fibroblastos promueven una mayor proliferación de las CMM en un sistema como el empleado en este trabajo.

Cuando las CMM fueron co-cultivadas con condrocitos, al igual que en los co-cultivos con fibroblastos observamos una agregación celular la cual fue mayor que en el sistema previamente descrito, pero además se pudo evidenciar mediante la técnicas histoquímicas la presencia de componentes de matriz cartilaginosa como lo son los GAGs ácidos carboxilados y GAGs sulfatados (Figura 11; 12; 13 y 14). Aun cuando no se cuantificó la cantidad de estos componentes podemos sugerir según la intensidad de la reacción con los colorantes empleados que cuando el co-cultivo fue mantenido en medio



condrogénico (Figura 13 y 14), se produjo mayor cantidad de componentes que cuando el co-cultivo fue mantenido con medio nutritivo (Figura 11 y 12).

Varios estudios han puesto en manifiesto que diversos factores de crecimiento inician vías de señales intracelulares a través de las células y de la unión a receptores de superficie celular, que promueven a las células a proliferar, diferenciarse y sintetizar las proteínas de MEC las cuales han demostrado ser esenciales para la fabricación del cartílago “*in vitro*” (Wang y col., 2009). Además se ha demostrado que estos factores de crecimiento presentan efectos reguladores sobre los condrocitos y la condrogénesis de las células madre mesenquimales como la proteína morfogenética ósea (BMP) - 2, miembro de la superfamilia de TGF- $\beta$ . IGF, FGF y PDGF que se sabe, que apoyan las actividades condrogénicas en lugar de promover la condrogénesis. Es probable que algunos de estos factores o todos ellos, sean producidos por los condrocitos en cultivo y estén actuando sobre las CMM con las cuales fueron co-cultivados y promuevan así la diferenciación condrogénica, que se ha observado en esta investigación. Se ha demostrado que la presencia de un tipo celular específico induce a las células adyacentes para que se diferencien de un determinado modo, es decir, un tipo celular puede inducir la diferenciación de otro (Geneser, 2003).

Las células con efecto inductor se denominan organizadoras (que en nuestro sistema corresponden a los condrocitos) de las células inducidas (CMM) que se denominan competentes por su capacidad de reaccionar al estímulo de las células organizadoras (Geneser, 2003).

Por otra parte, se sabe de la influencia de la dexametasona, insulina y ácido ascórbico, componentes del medio condrogénico empleados en este trabajo, de manera

individual ó en combinación, tienen un efecto en la inducción condrogénica (Wang y col., 2009; Hwang y col., 2011) y fue evidenciado cuando se empleó el medio condrogénico dado que se produjo una inducción de las CMM hacia el linaje condrogénico. Hwang y col. (2011) evaluaron los efectos que ejercen las condiciones de cultivo condrogénicas en las CMM, a través de la relación entre los factores condicionados producidos por los condrocitos y la proliferación. Estos autores demostraron que con el uso de medios condicionados y sistemas de co-cultivo, se pueden estimular las CMM hacia el linaje condrogénico. Sugieren que los medios condicionados están compuestos por factores morfogénicos de los condrocitos que inducen la condrogénesis de las CMM del tejido adiposo para la ingeniería de tejidos. Estos resultados apoyan lo encontrado en esta investigación ya que como se mencionó previamente cuando, se co-cultivaron las CMM con condrocitos se observó una mayor proporción de componentes de MEC característicos del tejido cartilaginoso quedando por evaluar si en este sistema se están produciendo otros componentes de la MEC cartilaginosa como PG y colágeno tipo II para lo cual, se podría realizar una evaluación inmunocitoquímica. Además sería interesante evaluar los diferentes medios después del co-cultivo y caracterizar los componentes que están produciendo los fibroblastos y los condrocitos que inducen a las células hacia un linaje condrogénico.

## 7. CONCLUSIONES

- En el establecimiento del cultivo de las CMM del epidídimo del tejido adiposo de es evidente una heterogeneidad en los cultivos primarios. La cual disminuye al realizar los subcultivos la mayoría de las células de morfología fusiforme típica de este tipo celular.
- En el establecimiento del cultivo de los condrocitos se mantuvo el fenotipo característico de este tipo celular hasta el 2 pasaje, no obstante después del 3 pasaje se observó células de morfología fusiforme sugiriendo un proceso de desdiferenciación.
- En general el uso del sistema de co-cultivo empleado en el presente trabajo permitió la diferenciación de las CMM hacia un linaje condrogénico, ya que se demostró mediante técnicas histológicas la presencia de componentes de MEC característicos del tejido cartilaginoso como lo son GAGs ácidos carboxilados y GAGs sulfatados.
- En el proceso de inducción hacia el linaje condrogénico de las CMM del tejido adiposo es importante la presencia de los condrocitos ya que en los co-cultivos de estas células con fibroblastos mantenidos en medio nutritivo no se demostró la presencia de componentes característicos de la MEC del cartílago.
- Se sugiere una sinergia entre los factores producidos por los condrocitos y los factores solubles suministrados en el medio condrogénico, en la inducción de las CMM hacia el linaje condrogénico, ya que cualitativamente se evidencia una mayor cantidad de componentes de la MEC característicos del tejido cartilaginoso.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Alaminos, M., Garzón, I., Sánchez, M., Moreu, G., González, M., Fernández, A., Campos, A. 2007a. Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* **1**: 350-359.

Alaminos, M., Sánchez, M., Muñoz, J., García, J., Crespo, P., González, M., Campos, A. 2007b. Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe x-ray microanalysis. *J. Cell. Physiol.* **211(3)**: 692-698.

Araos., C. 2009. Cultivo de células madre mesenquimales del cordón umbilical humano. Potencialidad ósteo-condrogénica “*in vitro*”. Trabajo Especial de Grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Beltrán, O., Quintero, L., Chaparro, O. 2005. Plasticidad y transdiferenciación en células “Stem” adultas- Revisión. *Medica.* **13(1)**: 10-16.

Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Gehron, P. 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potential applications. *Stem Cells.* **19**:180-192.

Bigdeli, N., Karlson, C., Strehl, R., Concaro, S., Hyllner, J., Lindahl, A. 2009. Coculture of human embryonic stem cells and human articular chondrocytes results in significantly altered phenotype and improved chondrogenesis differentiation. *Stem Cells.* **27**: 1812-1821.

Bohrnsen, F., Lindner, U., Meier, M., Gadallah, A., Schlenke, P., Lehnert, H., Rohwedel, J. y colaboradores. 2009. Murine mesenchymal progenitor cells from different tissues differentiated via mesenchymal microspheres into the mesodermal. *Bio. Med. Central.* **10(92):**1-15.

Bosnakovski, D., Mizuno, M., Kin, G., Takagi, S., Okumare, M., Fujinaga, T. 2006. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells (MSC<sub>S</sub>) in different hydrogels: Influence of collagen type II extracellular matrix on MSC chondrogenesis. *Biotechnol. Bioeng.* **93(6):**1152-63.

Calderón, D. 2007. Establecimiento de las células mesenquimales del cordón umbilical humano y estudio de su potencialidad de diferenciación “*in vitro*”. Tesis de Licenciatura. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela.

Chen, F., Tuan, R. 2008. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis Res. Ther.* **10(5):**1-12.

Dellmann, H., Carithers, J. 2007. Citología e Histología. Ed. Intermédica, Primera Edición, Buenos Aires, Argentina.

Dickhut, A., Dexheimer, V., Martin, K., Lauinger, R., Heisel, C., Richter, W. 2010. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells by local transforming growth factor-beta delivery in a biphasic resorbable carrier. *Tissue Eng.* **16(2):**453- 464.

Dominici, M., Le, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R. y colaboradores. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**: 315–317.

Estrada, C., Paz, A. López, L. 2006. Ingeniería de tejido óseo: Consideraciones básicas. *Revista EIA*. **5**:93-100.

Falke, G., Atala, A. 2000. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch. Argent. Pediatr*. **98(2)**:103-115.

Figueroa, E., Montesinos, J., Mayani, H., 2006. Células troncales mesenquimales: Historia, biología y aplicación clínica. *Rev. Invest. Clin*. **58(5)**: 498- 511.

Freshney, I. 2000. Culture of animal cells: A manual of basic technique. Four Edition. Wiley-Liss. Toronto, Canada.

Gartner, L., Hiatt, J. 1997. Libro de histología texto atlas. Primera edición. México. **P.P:** 114-120.

Geneser, F. (2003). Histología.3<sup>era</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos aires, Argentina.

Gomillanon, C., Burg, K. 2006. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*. **27**:6052-6063.

Guillen, S., Miradet, L., Sopena, J., Fernández, F., Segura, G. Corpa, A. 2005. Rediferenciación de condrocitos en plasma rico en factores de crecimiento plaquetario para condroplastia articular. *Patología del Aparato Locomotor*. **3(1)**:13-23.

Hellingman, C., Koevoet, W., Kops, N., Farrell, E., Jahr, H., Liu, W., Beatenburg, J. y colaboradores. 2010. Fibroblast growth factor receptors “*in vitro*” and “*in vivo*” chondrogenesis: Relation tissue engineering using adult mesenchymal stem cells to embryonic development. *Tissue Eng*. **16**: 545-555.

Hickey, D., Frenkel, S., Di Cesare, P. 2003. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am.J.Orthop*. **32**:70-76.

Hildner, F., Concara, S., Peterbauer, A., Wolbank, S., Danzer, M., Lindahl, A., Gatenholm, P. y colaboradores. 2009. Human adipose-derived stem cells contribute to chondrogenesis in coculture with human articular chondrocytes. *Tissue Eng*. 2009. **15**: 3961-3969.

Huang, H., Gao, Q., Tao, B., Jiang, S. 2008. Long-term culture of keratinocyte like cells derived from mouse embryonic stem cells. *In vitro cell. Dev. Biol*. **44**: 193-203.

Hwang, N., Im, S., Wu, P., Bichara, D., Zhao, X., Randolph, M., Langer, R. y colaboradores. 2011. Chondrogenic priming adipose-mesenchymal stem cells for cartilage tissue regeneration. *Pharm. Res*. **28**: 1395-1405.

- Jiang, J., Nicoll, S., Lu, H. 2005. Co-culture of osteoblasts and chondrocytes modulates cellular differentiation “*in vitro*”. *Biochem. Biophysl. Res. Commun.* **338**:762-770.
- Kinard, F., Sergent-Engelen, T., Trouet, A., Remacle, C., Sheneider, Y. 1997. Compartmentalized coculture of porcine arterial endothelial and smooth muscle cells on a microporous membrane. *In vitro Cell. Dev. Biol.* **33**:92-103.
- Kisiday, J., Kopesky, P., Evans, C., Grodzinsky, A., McIlwraith, W., Frisbie, D. 2008. Evaluation of adult equine bone marrow-and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures. *J. Orthop. Res.* **26**:322-331.
- Korbling, M., Estrov, Z. 2003. Tissue regeneration may be possible with adult stem cells. *Engl. J. Med.* **349**:570-580.
- Lim, J., Bodmar, A. 2002. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layer which support the growth of human embryonic stem cells. *Proteomics.* **2**:1187-1203.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P., Ziporsky, L. y col. 2005. Biología celular y molecular. 5<sup>ta</sup> Edición. Editorial Médica Panamericana. Caracas, Venezuela.
- López, N. E., Martínez, C. M., Konigsberg, M. 2005. La senescencia replicativa como una respuesta al estrés celular. *Revista de Educación Bioquímica.* **24**: 47-53.
- Lynch, R., Mellor, S.I. 1985. Métodos de Laboratorio. Segunda Edición. Editorial Interamericana. México, México.



Márquez, L., Merentes, E. 2008. Caracterización “*in vitro*” de las células de cartílago humano. *MIBE*. **5**: 23-28

Márquez, M. 2009. Cultivo de células de cartílago nasal humano: Establecimiento y caracterización. Trabajo de Ascenso a la categoría de profesora asistente Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Mathews, C. K., Van Holde, K. E., Ahern, K. G. 2003. Bioquímica. Tercera Edición. Editorial Pearson Addison-Wesley. Madrid, España.

Masoumeh, F., Vahideh, H. 2010. Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue. Cells*. **42**:211-216.

Merentes, E. 2009. Fuentes de obtención de las células madre mesenquimales: Potencialidad de diferenciación “*in vitro*””. Trabajo de Ascenso a Profesor Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Miguell, J., Erices, A., Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* **226**:507-520.

Mitchell, K., Weiss, M., Mitchell, B., Martin, P., Davis, D., Morales, L., Helwig, B., y colaboradores. 2003. Wharton is jelly mesenchymal cells form neurons and glia. *Stem Cells*. **21**:50-60.

Najmuddin, J. G., Kyriacos, A. 2009. Effects of co-cultures of meniscus cells and articular chondrocytes on PLLA scaffolds. *Biotech. Bioeng.* **103(4)**:808-816.

Paniagua, R., Nistal, M, Pilar, M., Uria, M., Anadón, R., Fraile, B., Sáez, Crespo. 2002. Citología e histología vegetal y animal. Tercera Edición. Editorial Interamericana. Madrid, España.

Pellettieri, J., Sánchez, A. 2007. Cells turnover and adult tissue homeostasis: from human to planarias. *Annu. Rev. Genet.* **41**:83-105.

Pineda, K., Merentes, E., Starosta, R., (2004). Caracterización morfológica y bioquímica de condrocitos “*in vitro*”. *Rev. INHRR.* **35(1)**:6-11.

Pittenger, M., Vanguri, D., Simonetti, R., Young, R. 1999. Adult mesenchymal stem cells: Potencial for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy, J. *Musculoskel. Neuron Interact.* **2**:309-320.

Prophet, E. B., Millis, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H. 1995. Métodos histoquímicos del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de America, Washington D.C., E. U. A.

Rodríguez, AM., Elabd, C., Delteil, F., Astier, J., Vernochet, C., Saint-Mare, P. (2004). Adipocyte differentiation of multipotent cells established from human adipose tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **315 (2)**: 255-263.

Rodríguez O., M. 2005. Establecimiento del cultivo de células del estroma de tejido adiposo de rata y su potencialidad ósteo-condrogénica “*in vitro*”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Rodríguez O., M. 2009. Estudio comparativo del potencial de diferenciación hacia el linaje epitelial de las células mesenquimales provenientes de tejido adiposo de ratón y humano. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Roura, S., Bayés-Genís, A., Farré, J., Cairó, J., Gòdia, F., Cinca, J. 2005. Las células madre mesenquimales adultas humanas procedentes de donantes de distinta edad mantienen sus propiedades metabólicas, proliferativas y de transdiferenciación. *Invg. Cv.* **8**: 57-67

Ross, M., Pawlina, W. 2007. Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. Editorial Medica Panamericana, Quinta Edición, Buenos Aires, Argentina.

Schroepel, J., Crist, J., Anderson, H., Wang. 2011. Molecular regulation of articular chondrocyte function and its significance in osteoarthritis. *Histol. Histolp.* **26**:377-394.

Surribas, J., Lawzewitsch, I. 1984. Lecciones de histología veterinaria 2. Editorial Hemisferio Sur, Primera Edición, Buenos Aires, Argentina.

Wang, X., Raukwitz, L., Nogh, U., Tuan, R. 2009. Strategies in Regenerative Medicine: Pags.367-393 en: M, Satin (ed.), Cartilage development, physiology, pathologies and regeneration. Bethesda, U.S.A.

Zhang, H., Li, L., Leng, P., Wang, Y., Lu, C. 2009. Uninduced adipose-derived stem cells repair the defect of full-thickness hyaline cartilage. *Chinese. J. Traumatol.* **12(2)**: 92-97.

Zuk, P., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cells.* **13**: 4279-95.

### **Consultas en línea:**

Carbona, E., Hurtado, A., Parada, M. [En línea]. 2006. <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/ova/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=451>. [Consultada: 15 de enero del 2012].

Consuelo, A., Lázaro, O., Pérez, D., Porfirio, H., Ballester, J. [En línea]. 2010. [http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol26\\_4\\_10/hih02410.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/hih/vol26_4_10/hih02410.htm). [Consultada: 15 de enero del 2012].

Flores, F., Paniagua, J. Las células madre embrionarias totipotentes. [En línea]. 2006. <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no49-6/RFM049000603.pdf>. [Consultada: 30 de octubre del 2010].

Kock, L., Corrinus, C., Donkelaar, V., Ito, K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. [En línea]. 2011. <http://www.mate.tue.nl/mate/pdfs/12966.pdf> [Consultada: 18 de enero del 2012].

Montalvo, C. tejido cartilaginoso. [En línea]. 2010. [http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/Doc/2010TEJIDO\\_CARTILAGINOSO.pdf](http://www.facmed.unam.mx/deptos/biocetis/Doc/2010TEJIDO_CARTILAGINOSO.pdf). [Consultada: 18 de enero del 2012].

Pecorino, L. Células Madres para Terapias Celulares. [En línea]. 2001. <http://www.actionbioscience.org/esp/biotecnologia/pecorino2.html>. [Consultada: 27 de septiembre del 2010].

Perin, E. Células Madres. [En línea].2008. [http://www.texasheart.org/ Research /Stem CellCenter\\_Esp/Informacion\\_basica.cfm](http://www.texasheart.org/Research/StemCellCenter_Esp/Informacion_basica.cfm). [Consultada: 27 de septiembre del 2010].

Portal, L. Actualizaciones en cirugía ortopédica y traumatología. [En línea].2009. [http://books.google.co.ve/books?id=I4NTkR5xs7sC&pg=PA5&dq=Ácido+ascorbico+efecto+sobre+las+celulas+en+cultivo&hl=es&ei=smUcTvvkMsjZgAfdydD1CQ&sa=X&oi=book\\_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false](http://books.google.co.ve/books?id=I4NTkR5xs7sC&pg=PA5&dq=Ácido+ascorbico+efecto+sobre+las+celulas+en+cultivo&hl=es&ei=smUcTvvkMsjZgAfdydD1CQ&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=1&ved=0CCgQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false) [Consultada: 12 de junio del 2011].

Sanchis, J. Tejido cartilaginoso. [En línea].2009. [http://www.felipeisidro.com/curso\\_direccion\\_programas\\_fitness/anatomía\\_y\\_fisiologia/4\\_cartilaginoso.pdf](http://www.felipeisidro.com/curso_direccion_programas_fitness/anatomía_y_fisiologia/4_cartilaginoso.pdf). [Consultada: 11 de enero del 2012].

Zamudio, T. Regulación jurisdiccional de las biotecnologías.3.2.Células madre embrionarias y de adultos.[en línea]. 2008. <http://www.biotech.bioteca.org/clase2-17.htm>. [Consultada: 29 de septiembre del 2010].