

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**COMPARACIÓN DE SUERO FETAL BOVINO Y LISADO PLAQUETARIO
ALOGÉNICO EN EL CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES
EQUINAS**

Por

Sofía FERNÁNDEZ, Mauro RÍOS

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias.
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo experimental.

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dr. Uruguaysito Benavides

Segundo miembro (tutor)

Dra. Jacqueline Maisonnave

Tercer miembro

Dr. Pedro Martino

Cuarto miembro

Dr. Kevin Yaneselli

Quinto miembro

Dr. Javier Mirazo

Sexto miembro

Dr. Fernando Vila

Fecha

9 de diciembre de 2016

Autores

Br. Sofía Fernández

Br. Mauro Ríos

AGRADECIMIENTOS:

Dr. Medina (Veterinario del Frigorífico)

Dr. Oscar Ferreira

Dr. Pedro Martino

Dra. Valeria Campbell

Dr. Javier Mirazo

En especial:

Dr. Fernando Vila

Dra. Jacqueline Maisonnave

Dr. Kevin Yaneselli

A nuestras familias

LISTADO DE ABREVIATURAS:

AT	<i>Adipose tissue</i>
AT-MSC	<i>Adipose tissue- Mesenchymal stem cells</i>
CM	Celulas madres
CMA	Celulas madre adultas
CME	Celulas madre embrionarias
CMM	Celulas madre mesenquimales
CMM-TA	Células madre mesenquimales provenientes de tejido adiposo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraaceticacid</i>
EGF	Factor de crecimiento epitelial
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FGFb	<i>Fibroblast growth factor b</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IDO	<i>Indoleamine 2,3-dyoxigenase</i>
IL-1	Interleuquina 1
IL-10	Interleuquina 10
IRAP	<i>Interleukine Receptor Antagonist Protein</i>
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
LP	Lisado plaquetario
MC	Medio de crecimiento
MC-SFB	Medio de crecimiento con suero fetal bovino
MC- LP	Medio de crecimiento con lisado plaquetario
MEM	<i>Minimun essential media</i>
MHCI	Major histocompatibility complex I
MHCII	Major histocompatibility complex II
MO	Médula ósea
MSCs	<i>Mesenchymal stem cells</i>
NCPC	Nivel de capacidad proliferativa celular
PDGF	Platelet-derived growth factor
PL	<i>Platelet lysate</i>
PRF	<i>Platelet rich fibrine</i>
PRP	Plasma rico en plaquetas
SFB	Suero fetal bovino
TA	Tejido adiposo
TDP	Tiempo de duplicación poblacional
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
tPRP	Plasma rico en plaquetas enriquecido con trombina
UFC-F	Unidades formadoras de colonias- fibroblásticas
VEGF	Vascular endothelial growth factor

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTADO DE ABREVIATURAS	4
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	7
RESUMEN	8
SUMMARY	9
1.INTRODUCCIÓN	10
1.1 Terapias regenerativas	10
1.2. Células madre (CM):.....	11
1.3. Células madre adultas (CMA).....	11
1.4. Células madre mesenquimales:.....	12
1.5. Fuentes de extracción de CMM:	13
1.6. Beneficios de las CMM:	13
1.7. Criopreservación:.....	14
1.8. Suplemento del medio de cultivo de las CMM:	14
1.8.1. Suero fetal bovino (SFB):	14
1.8.2. Lisado Plaquetario (LP):	15
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo general.....	16
3.2. Objetivos particulares:	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1. Aislamiento de CMM-TA:.....	16
4.2. Preparación del LP:	16
4.3. Cultivo celular:	17
4.3.1. Aislamiento y expansión:	17
4.3.2. Medios de crecimiento (MC):	17
4.4. Criopreservación:.....	17
4.5. Adaptación al MC-LP:.....	18
4.6. Nivel de capacidad proliferativa celular (NCPC):	18
4.7. Caracterización de las CMM-TA equinas:	18
4.8. Unidades Formadoras de Colonias Fibroblásticas (UFC-F):	19
4.9. Análisis estadístico:	19
5.RESULTADOS	19
5.1.Aislamiento, expansión y criopreservación:.....	19
5.2.Caracterización de las CMM-TA:	20
5.2.1.UFC-F:.....	20
5.2.2.Triferenciación <i>in vitro</i> :.....	21
5.3.Proliferación de las CMM-TA:	24
6. DISCUSIÓN	27
7. CONCLUSIONES	29
8. PERSPECTIVAS	29

9. BIBLIOGRAFÍA	30
10. ANEXO	35

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS:

	Página
Figura 1: Imagen de células madre mesenquimales de medios de crecimiento con lisado plaquetario y medio de crecimiento con suero fetal bovino.....	20
Figura 2: Caracterización de UFC-F y diferentes vistas	21
Figura 3: Tridiferenciación: Inducción <i>in vitro</i> a tejido cartilaginoso	22
Figura 4: Tridiferenciación: Inducción <i>in vitro</i> a tejido óseo	23
Figura 5: Tridiferenciación: Inducción <i>in vitro</i> a tejido adiposo.....	24
Figura 6: Gráfica ilustrando los días en llegar al 80 % de confluencia discriminando por pasaje y por medio de crecimiento.....	25
Figura 7: Recuento celular discriminando por pasaje y por medio de crecimiento,	26
Figura 8: Recuento celular discriminado solamente por pasaje, sin tomar en cuenta el medio de cultivo utilizado.....	26
Figura 9: Días en llegar al 80 % de confluencia discriminando por pasaje y no por medio de crecimiento	27
Figura 10: Anexo 1: Hemograma equino 1.....	36
Figura 11: Anexo 1: Hemograma equino 2.....	37
Figura 12: Anexo 1: Hemograma equino 3.....	38
Figura 13: Anexo 1: Recuento plaquetario- pool plasma.....	39

RESUMEN

Las células madre mesenquimales (CMM) por sus propiedades terapéuticas se utilizan cada vez más en medicina regenerativa veterinaria. Tradicionalmente para la proliferación de las CMM equinas se suplementa con suero fetal bovino (SFB), que tiene varios inconvenientes, como el hecho de trasplantar proteínas xenogénicas y el riesgo de transmitir patógenos, afecta el bienestar animal durante la extracción de SFB, además de ser un producto comercial costoso. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la sustitución del SFB por lisado plaquetario (LP) equino en la proliferación de las CMM. El aislamiento y propagación de CMM se realizó a partir de tejido adiposo (TA) de cuatro equinos adultos saludables. La expansión de las CMM se realizó con 2 medios de crecimiento diferentes, suplementados con SFB o LP equino alogénico obtenido de tres donantes equinos adultos saludables. La proliferación *in vitro* fue evaluada mediante el conteo de células cosechadas y el tiempo de crecimiento en los pasajes 2 al 6. Las CMM-TA fueron caracterizadas mediante prueba de unidades formadoras de colonias fibroblásticas (UFC-F) y multidiferenciación *in vitro*. Se consiguió adaptar las CMM-TA propagadas inicialmente con un 10% SFB al nuevo suplemento con 20% LP, con 1×10^5 plaquetas/ μ l. El tiempo en llegar al 80% de confluencia de las CMM-TA con el suplemento LP fue de $5,21 \pm 0,83$ días, cosechando en ese momento $11,81 \pm 7,03$ cél/cm², sin observarse diferencias significativas con el suplemento estándar SFB. Las CMM-TA con LP alogénico tanto como con SFB presentaron la capacidad de formar colonias *in vitro* y de multidiferenciarse *in vitro* al linaje cartilaginoso y óseo. En conclusión, el LP alogénico puede ser utilizado como suplemento para propagar las CMM-TA equinas, sin afectar su capacidad proliferativa o de multidiferenciación *in vitro*.

SUMMARY

The use of mesenchymal stem cells (MSC) is increasing in veterinary regenerative medicine, given their therapeutic properties. Fetal Bovine Serum (FBS) is a common supplement to *in vitro* culture media, but its use carries several drawbacks such as transplant of xenogenic proteins and pathogens, ethical problems during the FBS extraction, the animal welfare is compromised and commercial FBS is quite expensive. Our objective was to evaluate the substitution of FBS by equine platelet lysate (PL) in MSC culture. MSC isolation was performed from adipose tissue (AT) of four healthy adult horses. MSC were expanded with 2 different culture media containing: FBS or PL obtained from 3 healthy adult horses. *In vitro* expansion was evaluated by harvesting and counting cells and monitoring the growth time between passages, from 2 to 6. AT-MSC were characterized by *in vitro* differentiation and colony-forming unit-fibroblastic (CFU-F) assay. AT-MSC initially cultured with 10% FBS were adapted to the new supplement with 20% PL, with 1×10^5 platelets/ μl . Time to reach 80% confluency for AT-MSC with PL supplement was 5.21 ± 0.83 days, harvesting in that moment 11.81 ± 7.03 cells/ cm^2 , observing no statistical significant differences, compared to the ones expanded with FBS supplement. Both AT-MSC, the ones cultured with FBS supplement and the ones with PL, formed fibroblastic colonies and were positive to chondrogenic and osteogenic differentiation. In conclusion, allogeneic PL can be used as a supplement for equine AT-MSC expansion, without affecting their *in vitro* proliferation and plasticity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Terapias regenerativas:

El caballo deportivo es un atleta de alto rendimiento. El ejercicio diario genera microtraumas repetidos, las exigencias de entrenamiento y competencia máximas y el desarrollo de fuerzas anormales, desencadenan lesiones traumáticas de tejidos blandos como duros, ya sean articulaciones, tendones, ligamentos y estructuras de sostén, que finalmente provocan una degeneración de la región afectada, pudiendo terminar muchas veces con la vida deportiva de ese animal (Benedetti, 2016).

Las terapias regenerativas, como dice su nombre, son procedimientos que tienen como objetivo “regenerar” el tejido dañado de una lesión y no solo “reparar” como apuntan los tratamientos convencionales como ser aplicación de frío, uso de antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos, uso de cáusticos, entre otros. El objetivo de esta terapia es llegar a alcanzar un nivel de curación fisiológica total y no una simple cicatrización (Vázquez et al., 2012).

Existen varias terapias regenerativas que actúan de manera diferente. Algunas actúan estimulando los propios mecanismos del cuerpo para su regeneración, como las células progenitoras o “células madre” (terapia celular) y las moléculas activas (factores de crecimiento). Otras, como las mallas biológicas o *scaffolds*, actúan reemplazando la matriz extracelular dañada permitiendo a la lesión curar por sí misma, así como también mejoran el mecanismo de acción de los antes mencionados. Por último, están los que actúan reemplazando completamente por tejidos/órganos creados *in vitro* como la ingeniería de tejidos. (Vázquez et al., 2012). Sin embargo las más estudiadas y utilizadas son las células madre (CM) y las terapias que incluyen moléculas activas. Dentro de estas últimas destacamos la fracción de plasma rico en plaquetas (PRP), sobrenadante de médula ósea esternal, suero autólogo condicionado (IRAP) y fibrina rica en plaquetas (PRF por sus siglas en inglés) (Vázquez et al., 2012). El PRP se obtiene por centrifugación de sangre periférica obtenida en tubos citratados. Se desconoce la concentración óptima terapéutica de plaquetas pero debe contener al menos 4 veces la concentración de plaquetas del plasma y por ende una mayor cantidad de factores de crecimiento, tiene gran uso en la reparación de tejidos blandos como tendones, ligamentos, articulaciones y heridas cutáneas. (Argüelles et al., 2006; Mondino et al. 2016). El sobrenadante de médula ósea esternal, posee una gran concentración de factores de crecimiento de la fracción acelular que se obtiene de la centrifugación de la médula. Schnabel et al. (2008) compararon *in vitro* diferentes terapias basadas en factores de crecimiento para reparar lesiones de ligamento suspensor, siendo el sobrenadante de médula ósea esternal la mejor opción. El suero autólogo condicionado (IRAP), es un concentrado de una proteína denominada IL-1ra o IRAP (*Interleukine Receptor Antagonist Protein*) que ejerce como antagonista de la IL-1, citoquina proinflamatoria que se libera en lesiones de las articulaciones que terminan dañando el cartílago articular, por eso es principalmente utilizada en casos de enfermedad degenerativa articular (Vázquez et al., 2012). Es decir, terapia regenerativa y células madre no son sinónimos exclusivos sino que existen dentro de la medicina regenerativa otras técnicas descritas, sin embargo son las CMM las que nos competen, por lo tanto las que ampliaremos a continuación.

Se han descrito tratamientos con CMM en diferentes patologías ortopédicas en el equino, arrojando buenos resultados. Estos se evidencian en la reparación de

fracturas óseas (Benedetti et al., 2016) y en la reparación de cartílago en osteoartrosis (Wilke et al., 2007); pero el campo más estudiado es en la aplicación en lesiones tendinosas (Smith et al., 2003; Watts et al., 2011), así como también en otras patologías como ser en la resolución post-quirúrgica de un defecto de paladar blando (Carstanjen et al., 2006). Actualmente se pueden encontrar varias investigaciones sobre lesiones tratadas con CMM y otras terapias regenerativas con resultados satisfactorios. Por ejemplo Romero, (2015) trabajó con lesiones tendinosas inducidas y tratadas con PRP y CMM donde todos los parámetros ecográficos, orientación de las fibras de colágeno y porcentaje del área de sección lesionada, mostraron una mejor evolución clínica en los animales tratados y también se demostró la mejoría de la regeneración del tejido en cortes histológicos.

1.2. Células madre (CM):

Las CM son células indiferenciadas, que tienen la capacidad de autorenovarse formando células idénticas a las originarias y bajo determinadas condiciones tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos de células del organismo. La nomenclatura correcta sería “células troncales” o “células progenitoras” (Strem et al., 2005).

Existen distintos tipos de células en el organismo pero todas provienen de una única célula huevo que resulta de la fecundación del óvulo por el espermatozoide. Esta célula dará origen al embrión y eventualmente al individuo adulto, en esta etapa la célula se denomina célula totipotente porque posee la potencialidad de generar un nuevo embrión y sus anexos. A partir de aquí, distintos grupos de células van adquiriendo especialización y perdiendo potencialidad de diferenciación, por ejemplo las pluripotentes ya no son capaces de generar anexos fetales (Hemberger et al., 2009; Boskovic et al., 2014).

Las CM se clasifican de dos maneras: a) según su potencialidad de diferenciación en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes y b) según el tejido de origen del que son extraídas: células madre embrionarias (CME), células madre adultas (CMA)(Benedetti, 2007; Vázquez et al., 2012; Whitworth & Banks, 2014).

Las células madre embrionarias provienen de una masa celular interna del blastocisto en fase embrionaria. Son pluripotentes, esto significa que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula del individuo adulto. Estas células dan origen al embrión propiamente dicho. Otra característica que tienen es que en condiciones de cultivo *in vitro* son capaces de proliferar indefinidamente sin diferenciarse, esta propiedad se llama autorenovación (Whitworth & Banks, 2014). Las CME se obtienen de fetos y embriones y si bien su potencial uso en enfermedades y lesiones es enorme, su investigación es reducida por razones éticas, religiosas y políticas (Benedetti, 2007). Sin embargo, a pesar de tener un gran potencial terapéutico, si no son controladas su aplicación tiene el riesgo de formar teratomas. Por esta razón hacer que las células se diferencien hacia el camino correcto y el conocimiento del origen de las células implantadas, es decir de los donantes y su estado de salud, es fundamental para lograr el efecto buscado (Whitworth & Banks, 2014).

1.3. Células madre adultas (CMA):

Estas células en contraposición de lo que sucede con las CME se encuentran en la mayoría de los tejidos y juegan un rol importante en el mantenimiento del tejido y reparación. Se clasifican a su vez en células madre mesenquimales (CMM) y células madre hematopoyéticas. Las CMM poseen un gran potencial terapéutico y por eso se han realizado grandes investigaciones científicas sobre ellas (Richardson et al., 2007; Wilke et al., 2007; Whitworth & Banks, 2014). Las células madre hematopoyéticas se obtienen de la médula ósea y de la sangre del cordón umbilical, son multipotentes y sólo van a diferenciarse en células de la misma línea es decir la hematopoyética (eritrocitos, línea blanca, plaquetas), (Benedetti, 2007; Vázquez et al., 2012).

1.4. Células madre mesenquimales:

Conocidas internacionalmente como *Mesenchymal Stem Cells* (MSCs), son un linaje celular no especializado, con moderado poder de autorenovación y moderada potencialidad de diferenciación (Dominici et al., 2006; Bourin et al., 2013). Son células multipotentes, adultas, con morfología fibroblastoide, con capacidad de autorenovarse y formar colonias celulares, con la propiedad de diferenciarse hacia diversos linajes celulares (Dominici et al., 2006; Vázquez et al., 2012).

La *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) presenta una definición con el propósito de universalizar el concepto, y describe que deben cumplir tres criterios mínimos que son: ser capaces de adherirse al plástico; en condiciones estándar de cultivo en un medio específico de inducción deben ser capaces de diferenciarse en osteoblastos, condroblastos y adipocitos; y por último, estas células deben expresar determinados antígenos de superficie de acuerdo a la especie de la que provengan (Dominici et al., 2006). Estos antígenos fueron descritos por Ranera et al., (2011) para las CMM equinas como: presencia de los marcadores CD29 y CD90 y ausencia de los marcadores CD44, CD45, CD73, CD105 y CD34.

Para demostrar su multipotencialidad *in vitro* se debe proporcionar a las CMM indiferenciadas un microambiente determinado que conduzca su diferenciación hacia diversos linajes, previamente descrito en diversos estudios (Pascucci et al., 2010; Ranera et al., 2011; Carvalho et al., 2013a; Alipour et al., 2015).

Actualmente existe gran interés por investigar la aplicación de nuevas terapias regenerativas en equinos mediante el uso de CMM (Smith & Webbon, 2005; Richardson et al., 2007; Whitworth & Banks, 2014;). La multipotencialidad es la característica en que se han centrado la mayoría de los estudios (Strem et al., 2005; Vidal et al., 2007; Ranera et al., 2012; Schwartz et al., 2012; Thanabalasundaram et al., 2012; Carvalho et al., 2013a). Las CMM son células que tienen la capacidad de diferenciarse en varias células diferentes, tales como osteoblastos (hueso), condrocitos (cartílago), adipocitos (grasa), miocitos (músculo) y tenocitos (tendones), convirtiéndose así en una terapia atractiva para el tratamiento de lesiones frecuentes en caballos deportivos como ser fracturas, osteocondrosis, tendinitis, desmitis y osteoartritis (Smith & Webbon, 2005; Richardson et al., 2007; Watts et al., 2011; Whitworth & Banks, 2014).

Dependiendo del tipo de tejido dañado la calidad de la reparación natural varía. Por ejemplo, la reparación normal de un tendón por sí sola es débil debido a la poca vascularización del tejido y al alto grado de reincidencia que posee esa lesión. El uso de CMM inyectadas intralesionales en lesiones tendinosas no provocaría una

recuperación más rápida sino que la ventaja es lograr un tendón con mejor calidad de cicatrización, más elástico y con menor riesgo de volver a lesionarse, (Benedetti, 2007). Otros estudios por ejemplo realizados en equinos con osteoartritis demostraron que el uso por sí solo de CMM no generaba cambios significativos ya que no se acoplan al cartílago dañado, pero sí parecerían tener un efecto condroprotector al retrasar la progresión del daño o destrucción del cartílago reduciendo la inflamación (Frisbie et al., 2009). Sin embargo, Grigolo et al., (2009) comprobaron que si a las CMM se le agrega un condroprotector como el ácido hialurónico, sí parecen implantarse al cartílago y contribuir a una mejor regeneración, a este concepto de combinar células y biomateriales con una matriz de soporte en un intento por regenerar el daño celular se le denomina: ingeniería tisular (Seo et al., 2013b; Whitworth & Banks, 2014).

1.5. Fuentes de extracción de CMM:

Se han registrado varios lugares de obtención de CMM: médula ósea (MO), tejido adiposo (TA), tejido de cordón umbilical (Barberini et al., 2014) y membrana amniótica (Koerner et al., 2006). Sin embargo, son las tres primeras las fuentes más estudiadas y sobretodo las primeras dos las mejores para cultivar, debido a que mostraron una más rápida diferenciación *in vitro*, además de una mayor cinética de crecimiento lo que las hace más aptas también para crear un banco de CMM (Barberini et al., 2014). En la bibliografía consultada se destacan ciertas ventajas de las CMM provenientes de TA frente a las de MO; Barberini et al., (2014), y Ranera et al., (2012) demostraron una mayor cinética de crecimiento de CMM provenientes de TA que las de MO. A su vez, el TA presenta otras ventajas frente a la MO como ser un tejido abundante y no imprescindible para el animal, además de ser más simple en cuanto a su método de obtención y la capacidad de cultivar un número mayor de células y de mayor calidad (Barberini et al., 2014).

1.6. Beneficios de las CMM:

El sistema inmune reacciona no sólo frente a una amenaza bacteriana, sino que también ofrece resistencia frente al trasplante de moléculas alogénicas o xenogénicas. Sin embargo, las CMM parecen escapar de una reacción aguda causada por el sistema inmune, esto se debe a la secreción de moléculas inmunosupresoras como el factor H (Tu et al., 2010), IL10 e indoleamina 2,3 dioxigenasa (IDO) (Barrachina et al., 2016), baja expresión de proteínas inmunogénicas como MHC I, MHC II, coestimuladores y por la expresión de ciertas proteínas reguladoras del complemento (CD55, CD59 y CD46), que son altamente resistentes a la citotoxicidad (Komoda et al., 2009). Por otra parte, las CMM son atraídas por factores quimiotácticos como las anafilotoxinas (C3a y C5a) al sitio de la lesión (Schraufstatter et al., 2009). Por esto, se atribuye las propiedades de inmunomodulación y fuerte regulación de la inflamación debido a la supresión activa que ejercen tanto en el sistema inmune innato como en el adquirido (Griffin et al., 2010). Además, se les atribuye la característica de ser inmunoevasivas (Ankrum et al., 2014), esto significa que pueden ser rechazadas, pero el rechazo es más lento y les confiere tiempo a las células para que puedan ejercer su acción terapéutica; o sea que evaden el sistema inmune. Estas propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y falta de inmunogenicidad han hecho que sean una opción ideal para terapias regenerativas alogénicas para tratar enfermedades inflamatorias, inmunomediadas y degenerativas. (Barrachina et al., 2016).

1.7. Criopreservación:

Las CMM pueden ser criopreservadas por tiempo indefinido conservando sus características terapéuticas. Ya se ha descrito células equinas conservadas en freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ o en nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Martinello et al., 2009; Mitchell et al., 2015), y gracias a esta tecnología se puede utilizar rápidamente las CMM ya aisladas y caracterizadas. El uso de CMM alogénicas para regenerar lesiones es un método atractivo para la medicina ya que se pueden cultivar y congelar para generar un banco de CMM y poder utilizarlas cuando se necesiten de forma inmediata sin necesidad de realizar un nuevo aislamiento y así acelerar los tiempos de la aplicación terapéutica favoreciendo su resultado (Martinello et al., 2009). Uno de los factores a los que se le atribuye el éxito o el fracaso del tratamiento con CMM es el momento de la aplicación, Vázquez et al. (2012) describe que dentro de las 3 semanas post lesión es el momento más indicado en lesiones tendinosas. Es por esto que la existencia de un banco de CMM es de sumo interés para lograr mejores resultados con esta técnica al disminuir los tiempos necesarios para la aplicación de las CMM al ya tenerlas aisladas y expandidas al momento de necesitarlas para un caso clínico. Mitchell et al., (2015) comprobaron que no hay diferencias significativas en la viabilidad, morfología y cantidad de CMM luego de ser congeladas por un corto período de tiempo (2 a 5 días), comparando protocolos conteniendo distintos porcentajes de Dimetilsulfóxido (DMSO), Suero Fetal Bovino (SFB) y Lisado Plaquetario (LP) alogénico.

1.8. Suplemento del medio de cultivo de las CMM:

1.8.1. Suero fetal bovino (SFB):

El SFB es comúnmente utilizado en el cultivo de CMM como elemento fundamental ya que provee hormonas, proteínas de transporte, minerales y oligoelementos, lípidos, factores detoxificantes y estabilizantes, tanto como nutrientes vitales y factores de crecimiento y adhesión, óptimos para el crecimiento celular (Van der Valk et al., 2004). La preferencia de utilizar SFB frente al suero de animales adultos es debido a su bajo contenido en gamma-globulinas, ya que un alto contenido de estos anticuerpos puede inhibir el crecimiento y proliferación celular (Rauch et al., 2011). A pesar de las ventajas del uso de SFB para el cultivo de CMM, esto también acarrea una serie de inconvenientes: razones éticas, científicas, de seguridad y de practicidad cuestionan su uso (Seo et al., 2013a). Éticas, referidas al bienestar animal, porque el suero es extraído de fetos vivos de vacas sacrificadas en frigoríficos, donde puede existir sufrimiento animal, sobretodo de los fetos si éstos se encuentran en estado de conciencia (Jochems et al., 2002; Van der Valk et al., 2004). Las razones científicas se basan en el desconocimiento de la composición completa del SFB y en su variabilidad entre las diferentes partidas comerciales, ya que varían de animal en animal; y su consiguiente dificultad en la repetibilidad de experimentos. Por último, las razones de seguridad se deben a que además de ser muy variable en su composición, el uso de SFB en una aplicación clínica en un equino, potencialmente puede trasladar patógenos bovinos como ser virus, bacterias y priones, así como también endotoxinas, hemoglobina y otros factores adversos (Van der Valk et al., 2004; Rauch et al., 2011; Seo et al., 2013a). Además, a todo esto se suma un factor económico y de practicidad respecto a la limitada disponibilidad del SFB en algunos lugares y el alto costo (Doucet et al., 2005). Es por estos motivos que se ha venido trabajando en la búsqueda de un sustituto para el

SFB en el cultivo *in vitro* de CMM, ya sea con preparados químicos (Schwartz et al., 2012) o con otros sustitutos naturales como el lisado plaquetario alogénico (LP), el suero alogénico o el plasma rico en plaquetas enriquecido con trombina (tPRP) (Van der Valk et al., 2004; Doucet et al., 2005; Bieback et al., 2009; Rauch et al., 2011; Seo et al., 2013a).

1.8.2. Lisado Plaquetario (LP):

Las plaquetas son conocidas por la liberación de múltiples factores de crecimiento mediante exocitosis en el sitio de la lesión y por poseer muchas funciones en la reparación de los tejidos (Rauch et al., 2011). Dentro de los factores de crecimiento liberados se incluyen: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF por sus siglas en inglés), factor de crecimiento epitelial (EGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGFb, por sus siglas en inglés), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, por sus siglas en inglés) y el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, por sus siglas en inglés) (Rendu y Brohard-Bohn, 2001; Doucet et al., 2005; Rauch et al., 2011).

Se demostró que el uso de un LP alogénico es un sustituto viable para el SFB en el cultivo de CMM equinas derivadas de médula ósea (Seo et al., 2013a; Russell et al., 2016). Los principales beneficios de la sustitución del SFB por el LP alogénico que se plantean por los investigadores son el gran aporte de factores de crecimiento que son provistos por el LP; el fácil acceso al LP ya que se pueden extraer grandes cantidades de sangre (20 mL/kg de sangre o 10 litros de sangre en un caballo de 500 kg PV) por mes de un equino adulto sano sin alterar su metabolismo y salud (Malikides et al., 2001), con su consiguiente disminución de costo (Doucet et al., 2005). Además, se previene la transmisión de proteínas xenogénicas inmunorreactivas, virus y bacterias de origen bovino en la aplicación de las CMM cultivadas en una aplicación clínica (Van del Valk et al., 2004; Doucet et al., 2005). Cardozo et al., (2006) describen que el cultivo de CMM provenientes de tejido adiposo equino cultivadas con suero autólogo se adhieren mejor a la placa que las cultivadas con SFB así como también un índice de viabilidad mayor. Asimismo, también se han realizado trabajos con CMM humanas y LP autólogo (Doucet et al., 2005) donde se concluyó que el LP aumentó el tamaño de las unidades formadoras de colonias fibroblásticas (UFC-F) e incrementó la tasa de proliferación celular comparado con el medio de crecimiento con SFB.

Por último, Rauch et al. (2011) describió que los factores de crecimiento del LP mantienen su estabilidad incluso luego de 5 meses congelado a -20°C . Esto es importante ya que para próximos cultivos de CMM u otro tipo de ensayos en el laboratorio, el LP es un insumo viable de larga duración congelado, sin la necesidad de contar con sangre equina fresca cada vez que se precise LP.

2. HIPÓTESIS

Es posible reemplazar el SFB por el LP como suplemento del medio de cultivo para la propagación *in vitro* de las CMM, conservando éstas sus características.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general:

Comparar la capacidad proliferativa y multipotencialidad *in vitro* de las CMM-TA equinas cultivadas en medio de crecimiento (MC) suplementado con SFB o LP.

3.2. Objetivos particulares:

1. Aislamiento, expansión y criopreservación de CMM-TA equinas.
2. Caracterizar las CMM-TA, suplementadas con SFB y LP, a través de: Unidades formadoras de colonias fibroblásticas (UFC-F) y tridiferenciación *in vitro*.
3. Evaluar la capacidad proliferativa de las CMM-TA cultivadas con MC-SFB y MC-LP.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Todas las maniobras quirúrgicas y de manipulación de animales fueron avalados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal, de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (CHEA, Nro. de expediente 111130-001375-14).

4.1. Aislamiento de CMM-TA:

Las muestras de TA fueron extraídas de 5 equinos adultos post-mortem en un frigorífico, tomando 2 muestras por individuo inmediatamente después del sacrificio, este protocolo fue basado en lo descrito por Benedetti, (2007); Del Bue et al., (2007) y Vidal et al., (2007). La extracción de muestras se realizó sobre la zona superior del glúteo en la base de la cola, tomando aproximadamente 15 y 20 gramos de tejido adiposo subcutáneo por muestra y siendo transportado hasta el laboratorio en tubos falcon de 50 mL con 20 mL de medio de transporte compuesto por *Minimum Essential Media* (MEM), SFB (Probiomont S. A., Uruguay) en un 20% y penicilina-streptomicina en un 2% (GIBCO, USA).

4.2. Preparación del LP:

El protocolo utilizado fue adaptado de lo descrito anteriormente por Seo et al., (2013a). El LP se preparó a partir de la sangre de 3 caballos adultos saludables que se les realizó análisis de hemograma completo confirmando su estado de salud (figuras 10, 11 y 12 en Anexo 1).

Se extrajo sangre en jeringas de 50 mL con 5 mL de citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$). Se realizó la primera centrifugación a 230 g por 10 minutos a 10°C (Thermo IEC CL30R) donde se separó el plasma y plaquetas de las células rojas. Se juntaron las porciones de plasma de las 3 muestras y se cuantificaron las plaquetas del *pool* formado (figura 13 en Anexos). Luego se congeló a -20°C por 24 hs y posteriormente se colocó a baño maría (Biriden HH-2) a 37°C por 20 minutos para liberar los factores de crecimiento plaquetario. Por último, se realizó una centrifugación a 1600 g por 30 minutos a 10°C para remover los fragmentos plaquetarios residuales. Al sobrenadante se le realizó un prefiltrado a través de un filtro de jeringa de 0,80 μm , y

luego se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,22 μm y se almacenó a -20°C siendo finalmente el LP utilizado durante el ensayo.

4.3. Cultivo celular:

4.3.1. Aislamiento y expansión:

Los protocolos de aislamiento y expansión fueron adaptados según lo descrito anteriormente por Ranera et al., (2011) y Vidal et al., (2007). Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, dentro del flujo laminar (cabina de flujo laminar clase II, A2 Thermo, EE.UU.) se extrajeron los trozos de tejido adiposo de los tubos falcon y se colocaron en placas de petri estériles, donde se lavaron 2 veces cada muestra con solución buffer fosfato (PBS por sus siglas en inglés) compuesta por una solución de NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na_2HPO_4 0,144 g/l, KH_2PO_4 0,24 g/l en agua bidestilada. Posteriormente, con dos hojas de bisturí se cortó cada muestra de tejido adiposo en trozos pequeños. Una vez trozadas las muestras, se colocaron volúmenes de 4 mL de cada una en tubos falcon, donde fueron sometidos a una digestión enzimática con 1 mg/mL de colagenasa tipo I (GIBCO, EE.UU.), a razón de 1 mL por cada mL de muestra, durante 20-40 minutos en baño maría a 37°C agitándose mediante agitador (vortex) cada 5 minutos hasta licuarse por completo la grasa de la muestra. Una vez logrado esto, a cada tubo se le agregó 5-8 mL de medio de crecimiento con suero fetal bovino (MC-SFB) para neutralizar la actividad de la colagenasa. Posteriormente fue centrifugada a 660 g durante 10 minutos y resuspendido el pellet (precipitado) en 2 mL de MC-SFB, para ser sembrado en placas de 6 hoyos (Cellstar), a razón de una muestra por hoyo, e incubado a 37°C con 5% de CO_2 en estufa húmeda (SANYO CO_2 incubator MCO-15AC). Cada 2 días se les cambió el medio de cultivo y fueron pasadas a una proporción de 1:3 cuando llegaron a un 80% de confluencia, usando 0,5 mM EDTA/tripsina al 0,05% (SAFC, Suiza) por 2-3 minutos en estufa húmeda a 37°C . Esto se continuó hasta expandirlas hasta el pasaje 6.

4.3.2. Medios de crecimiento (MC):

La determinación de la composición de los medios de crecimiento fue adaptado de lo descrito por Seo et al., (2013a). Los MC utilizados fueron: MC-SFB: Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) *low glucose* (Gibco, EE.UU), 10% SFB (Probiomont S. A., Uruguay) y 2% Penicilina-streptomicina. El medio de crecimiento con LP (MC-LP): DMEM, 20% LP, 2% penicilina-streptomicina y se le agregaron 2 UI/mL de heparina (Fármaco Uruguayo, Uruguay) para prevenir la gelificación del cultivo con MC-LP. La formulación del MC-LP fue determinada mediante un ensayo piloto donde se registró que la cinética de crecimiento de las CMM en MC con LP al 10% tenía una notoria inferioridad respecto a las cultivadas con MC-SFB. Por esta razón se decidió realizar un ensayo experimental con 2 muestras comparando el crecimiento de las CMM cultivadas con MC-SFB respecto a tres formulaciones de MC-LP con diferentes concentraciones de LP: 10%, 20%, 30% y 40% de LP, durante 7 días.

4.4. Criopreservación:

El protocolo utilizado para la criopreservación fue adaptado de Mitchell et al., (2015). Las CMM-TA fueron criopreservadas en los pasajes P_2 - P_9 mediante el siguiente protocolo: Se realizaron 2 lavados del cultivo con 1 volumen PBS y fueron

levantadas utilizando 0,5 mM EDTA/tripsina al 0,05% para luego pasarlas a un tubo falcon de 15 mL con 5 mL de MC-SFB. Luego se centrifugaron a 660 g por 5 minutos. Se descartó el medio y el pellet de CMM se resuspendió en 950 µl de SFB y se pasó a un tubo eppendorf previamente cargado con 50 µl de DMSO (Applichem, Alemania) y se almacenaron en freezer -80 °C (Thermo forma 88000 series, EE.UU.).

Para descongelar cada muestra utilizada, al momento de sembrar se retiró del freezer -80 °C, conteniendo en la mano el criotubo para transmitirle calor y agitándolo levemente hasta que no quedaron rastros de hielo dentro del criotubo. Una vez esto, se vertió todo el contenido del criotubo en un hoyo de una placa de 6 (Cellstar, Alemania) junto con 2 mL de MC-SFB y se homogeneizó la mezcla. A las 24 hs se lavó con solución PBS y se repuso el MC. Luego de esto, se continuó con el procedimiento de cultivo que se describe más adelante, correspondiente a cada muestra. Para el presente ensayo solamente se descongelaron muestras de P₂ y P₃.

4.5. Adaptación al MC-LP:

Previamente al uso de MC-LP se debió proceder a la adaptación de las células al nuevo medio de crecimiento. La adaptación se realizó luego de descongelar y sembrar las CMM en placa de 6 hoyos, incrementando el MC-LP y disminuyendo el MC-SFB progresivamente. El primer día se cultivaron con un 50% de MC-SFB y un 50% de MC-LP; a los 2 días se cambió a la proporción de 25% MC-SFB y un 75% de MC-LP, para finalmente a los 2 días más alcanzar el 100% de MC-LP. Luego de cultivarse por otros 2 días ya las CMM estaban adaptadas completamente al MC-LP.

4.6. Nivel de capacidad proliferativa celular (NCPC):

Esta prueba fue adaptada de lo descrito por Yaneselli, (2015). Se sembraron CMM-TA de ambos MC de cada individuo en placas de cultivo celular de 24 hoyos de 2 cm²/hoyo (Cellstar, Alemania) a una concentración de 2 x 10⁴ células viables/cm² desde el P₂ hasta el P₆. Cuando llegaron al 80-90% de confluencia, se tripsinizaron, cosecharon y contaron pasando a un nuevo pasaje. El recuento de células se realizó en cámara de Neubauer y se utilizó Trypan Blue 0,1% (Sigma, EE.UU.) para determinar la viabilidad de las células. Se registraron dos variables: el tiempo en que alcanzaron al 80-90% de confluencia y la cantidad de células cosechadas en ese momento. Todos los ensayos se hicieron por triplicado.

4.7. Caracterización de las CMM-TA equinas:

Fueron sembradas células del P₃ en una cantidad de 9,4 x10³/hoyo en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Se usaron muestras de 2 individuos, realizándose el ensayo por triplicado de cada muestra y para ambos medios de crecimiento. Después de 24 horas de siembra con medio de crecimiento tanto MC-LP y MC-SFB se comenzó la inducción de diferenciación *in vitro* con el medio de cultivo correspondiente, más agregados específicos que son los que inducen dicha diferenciación.

Diferenciación adipogénica: protocolo adaptado a lo descrito por Yaneselli, (2015), al medio de crecimiento se le adicionó 5 µM de isobutilmetilxantina (Sigma, EE.UU.), 60 µM de indometacina (Sigma, EE.UU.), 1 µM de dexametasona (Sigma, EE.UU.) y 5 µg/mL insulina (Caninsulin, Holanda). Las células se incubaron a 37°C con 5%

CO² durante 21 días y se les cambió el medio cada 3-4 días con el medio de inducción citado. Después se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente de 20°C. La presencia de gotas lipídicas se evidenció con una tinción de Oil Red O (Sigma, EE.UU.).

Diferenciación condrogénica: protocolo adaptado a lo descrito por Yaneselli, (2015), al medio de crecimiento se le adicionó 50 µM ácido ascórbico (Sigma, EE.UU.), 10 ng/mL TGF-β (Sigma, EE.UU.), 6.25 µg/mL insulina. Luego se incubaron a 37°C con 5% CO₂ durante 21 días, cambiando el medio cada 3-4 días. Por último, se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído durante 20 minutos a temperatura ambiente de 20°C. La presencia de matriz cartilaginosa se evidenció con una tinción de Alcian Blue (Sigma, EE.UU.).

Diferenciación osteogénica: Se siguió el protocolo descrito por Seo et al., (2013a). Al medio de crecimiento se le adicionó 10 nM de dexametasona (Sigma, EE.UU.), 10 mM de ácido β-glicerofosfórico (Sigma, EE.UU.) y 0,1 mM ácido ascórbico. Las células se mantuvieron por 21 días en el medio de diferenciación con cambio de medio cada 3-4 días. Después se fijaron con una solución al 4% de paraformaldehído durante 20 minutos. La presencia de matriz mineralizada se evidenció con una tinción de Alizarin Red (Sigma, EE.UU.).

4.8. Unidades Formadoras de Colonias Fibroblásticas (UFC-F):

Se evaluaron las UFC-F. Se sembraron CMM-TA de P₂ en una cantidad de 150 células/cm² y se cambió el medio cada 3-4 días durante 14 días. Posteriormente la capa celular se fijó en metanol frío a -20°C y se tiñó con Giemsa para observar la manifestación del crecimiento en colonias fibroblásticas. Se realizó el ensayo con muestras de 2 individuos cultivadas con MC-SFB al 5% y MC-SFB al 10%, así como también con MC-LP al 10% y MC-LP al 20%. Protocolo adaptado de Seo et al. (2013a).

4.9. Análisis estadístico:

Para estudiar directamente el comportamiento y características de las células de la especie equina, se utilizaron n=4 donantes. El número de animales está fundamentado en referencia a trabajos similares en modelos equinos (Pascucci et al., 2010; Carvalho et al., 2013a; Carvalho et al., 2013b; Seo et al., 2013a). Todas las variables fueron analizadas de modo descriptivo. La diferenciación de las CMM-TA en adipocito, condrocito y osteocito fue evaluada en forma categórica con 2 categorías (si/no). La significancia estadística se fijó en p<0,05 y tendencias 0,05<p<0,10.

5. RESULTADOS

5.1. Aislamiento, expansión y criopreservación:

Se logró el aislamiento y cultivo de CMM a partir de tejido adiposo extraído de 4 equinos adultos con medio de cultivo celular usando MC-SFB. Fueron células adherentes al plástico y con morfología fibroblástica.

Las CMM-TA fueron bien adaptadas al medio suplementado con lisado plaquetario (MC-LP) con un recuento plaquetario de $9,6 \times 10^7/\text{mL}$. Los resultados del ensayo experimental comparando diferentes concentraciones de LP en el MC mostraron una mayor confluencia al día 7 de cultivo en los dos medios con menor proporción de LP (MC-LP 20% y MC-LP 30%) frente al de mayor proporción (MC-LP 40%); sin verse diferencias en el porcentaje de confluencia entre los medios MC-LP 20% y el MC-LP 30%. Previamente se probó el ensayo con LP al 10% pero como el crecimiento celular fue excesivamente bajo, se decidió no continuar con esta formulación. En base a estas observaciones, se optó por emplear el MC-LP 20%, ya que así se logra una mayor eficiencia del LP, al utilizar un menor volumen de este insumo para la preparación del MC-LP. Al adaptar las CMM al MC-LP se observó un cambio en la morfología de éstas, hacia una forma más triangular y pequeña que las cultivadas con MC-SFB (figura 1).

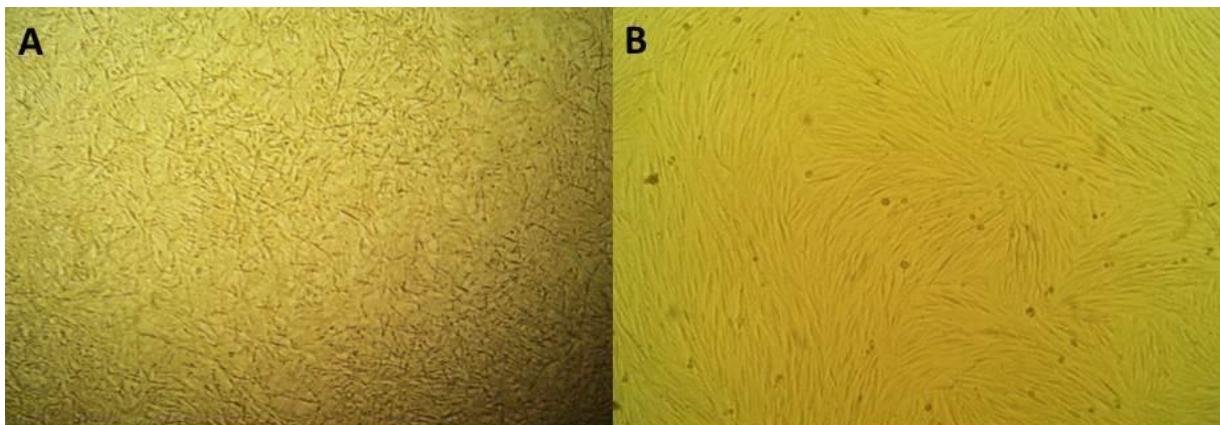


Figura 1: Morfología de las CMM-TA cultivadas con MC-LP (A) con un tamaño más pequeño y de forma tipo epitelial respecto a las cultivadas con MC-SFB (B) que son de tamaño más grande y de forma tipo fibroblástica. Imagen microscópica con un aumento (10x).

Fue posible criopreservar las CMM-TA por 6 meses. Fueron descongelados dos criotubos de P_2 y P_3 y proliferaron *in vitro* hasta el P_9 . Estas células fueron destinadas para realizar el ensayo de tridiferenciación *in vitro* y la prueba de UFC-F. Al finalizar el ensayo, quedó formado un banco de CMM-TA equinas compuesto por 2 criotubos de P_2 , 12 de P_3 , 3 de P_4 y 4 de P_5 .

5.2. Caracterización de las CMM-TA:

5.2.1. UFC-F:

Realizando la prueba de UFC-F se observó la capacidad de formar colonias fibroblásticas con ambos medios de crecimiento MC-SFB al 10% y 5% y MC-LP al 10% y 20%. Todas formaron colonias sin encontrarse diferencias en su comportamiento entre las distintas concentraciones de SFB y de LP (figura 2).

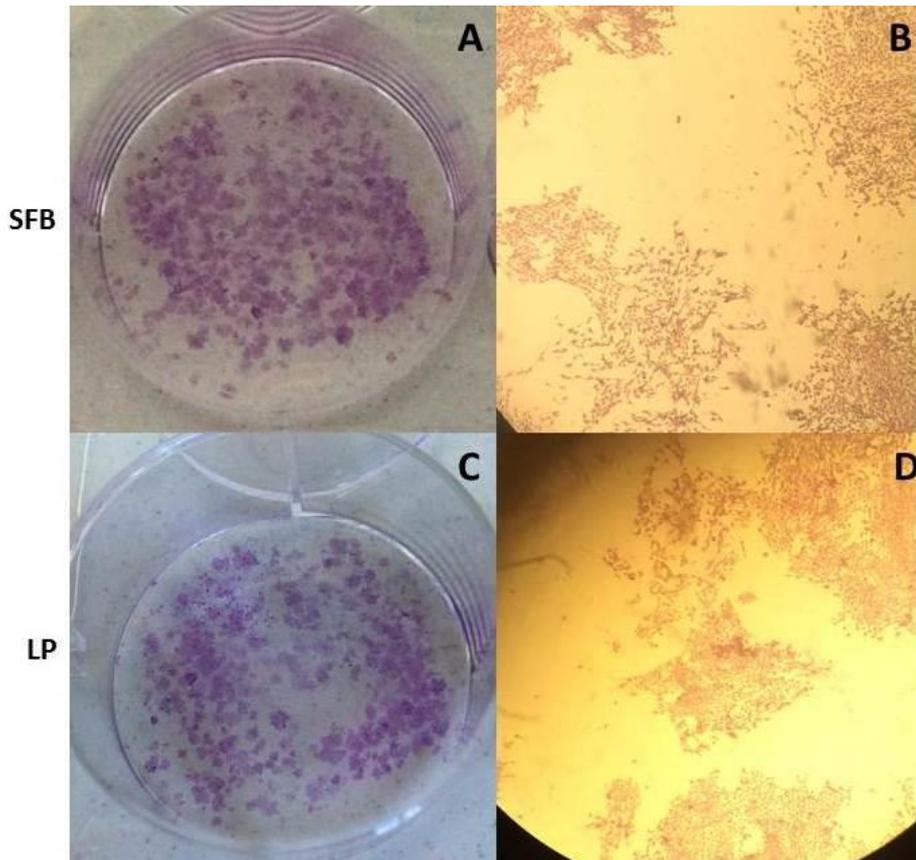


Figura 2: Ensayo de UFC-F con CMM-TA P₂ con MC-SFB al 5% (A y B): A: vista macroscópica de colonias fijadas y teñidas. B: vista microscópica (10x). CMM-TA P₂ con MC-LP al 10% (C y D): C: vista macroscópica de UFC-F fijadas y teñidas. D: vista microscópica (10x).

5.2.2. Tridiferenciación *in vitro*:

Se obtuvo la diferenciación *in vitro* en dos linajes, tanto en las CMM cultivadas con MC-SFB como con MC-LP, luego de 21 días de inducción. Condrogénico: Se observó un resultado positivo debido a que el cultivo inducido presentó afinidad por el colorante Alcian Blue, lo que nos indica síntesis de matriz cartilaginosa (figura 3, A y C). Osteogénico: Las CMM-TA inducidas con ambos suplementos fueron positivas a la tinción con Alizarin Red, demostrando matriz mineralizada con una fuerte afinidad por el colorante rojizo, acompañados de cambios morfológicos luego de la inducción (figura 4, A, B, E y F). Adipogénico: No se consiguió la diferenciación, luego de la inducción no se vieron vacuolas intracitoplasmáticas características al teñirse con Oil Red O en ninguno de los MC (figura 5). Los controles negativos no presentaron afinidad en ninguna de las tres inducciones: condrogénica (figura 3, B y D), osteogénica (figura 4, C, D, G y H) y adipogénica (figura 5, B y D).

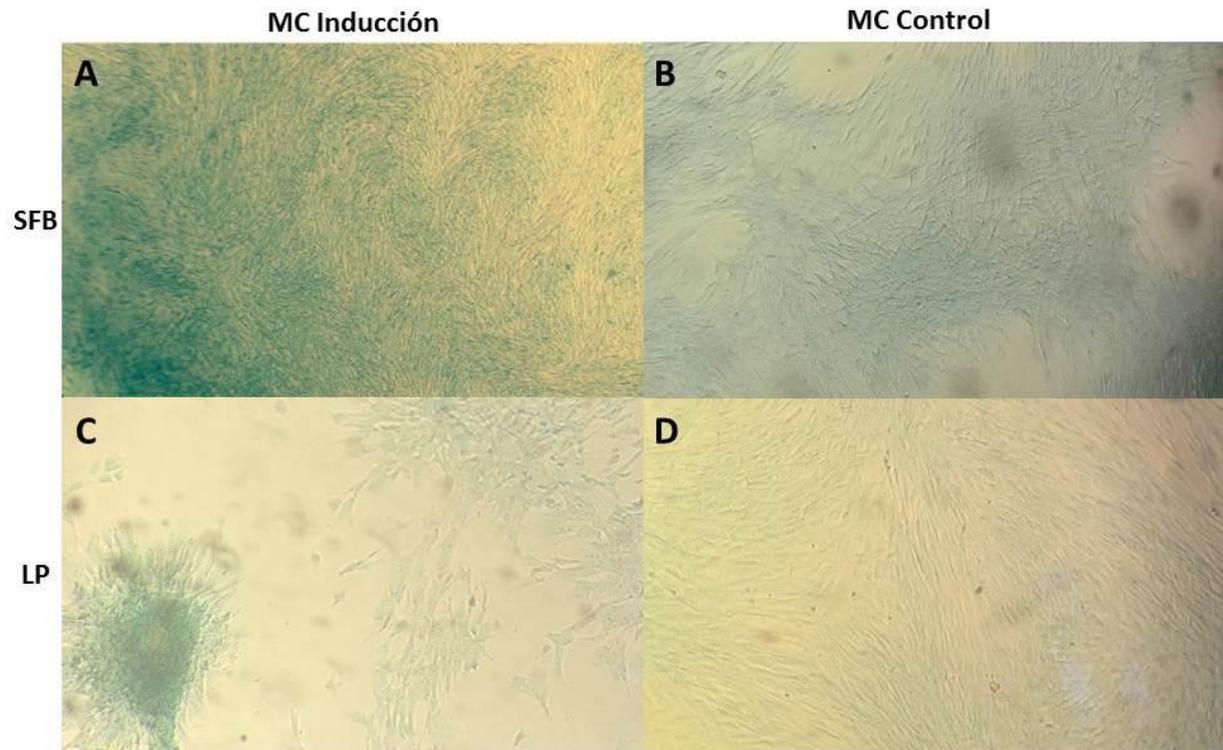


Figura 3: Inducción condrogénica, vistas microscópicas (10x). A, CMM con MC-SFB de inducción diferenciadas a tejido cartilaginoso; B, Control negativo de CMM con MC-SFB sin diferenciación a tejido cartilaginoso; C, CMM con MC-LP de inducción diferenciadas a tejido cartilaginoso; D, Control negativo con MC-LP sin inducción a tejido cartilaginoso.

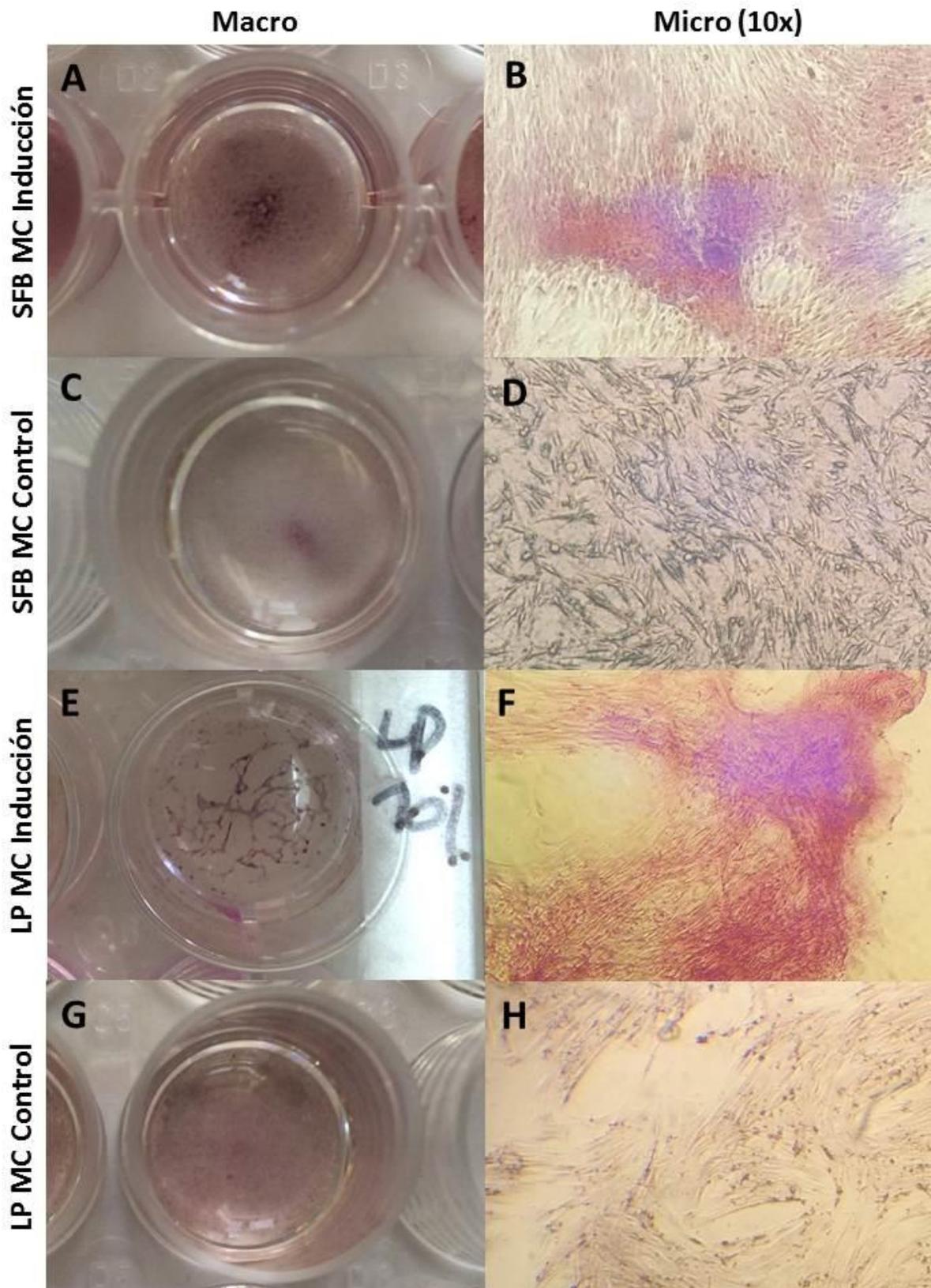


Figura 4: Inducción osteogénica. CMM con MC-SFB de inducción diferenciadas a linaje óseo, vista macroscópica (A) y vista microscópica (10x) (B); CMM con MC-SFB control indiferenciadas, vista macroscópica (C) y vista microscópica (10x) (D). CMM con MC-LP de inducción diferenciadas a linaje óseo, vista macroscópica (E) y vista microscópica (10x) (F); CMM con MC-SFB control indiferenciadas, vista macroscópica (G) y vista microscópica (10x) (H).

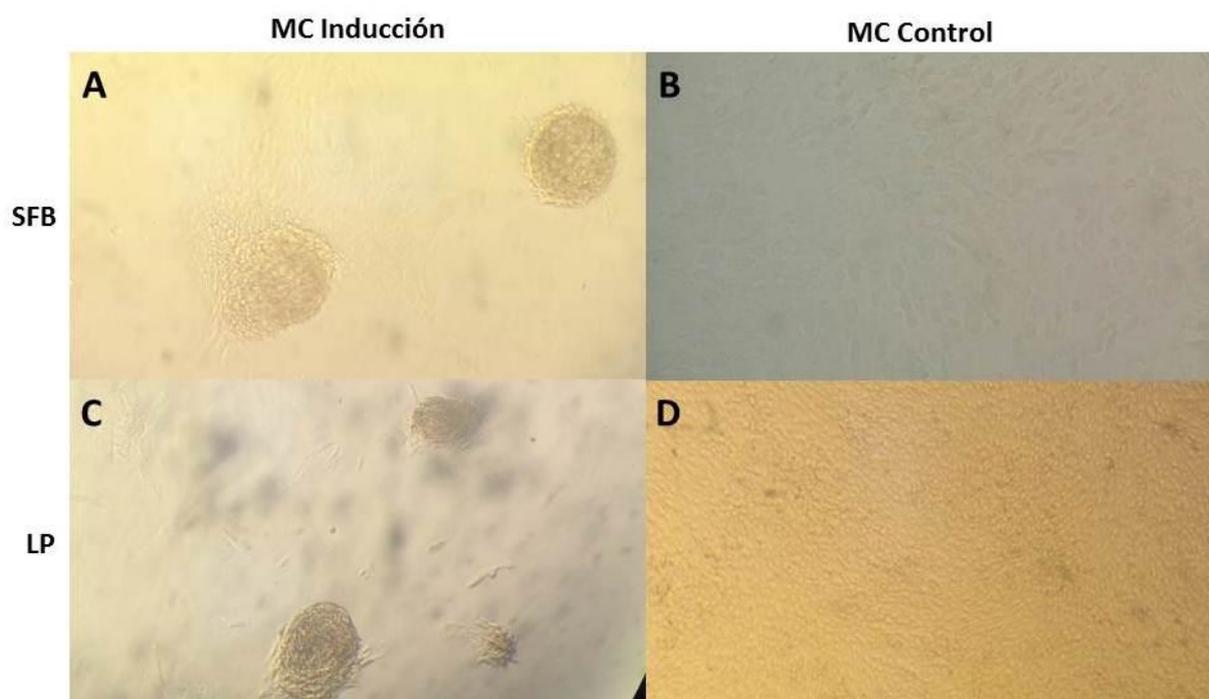


Figura 5: Inducción adipogénica, vistas microscópicas (10x). A, CMM con MC-SFB de inducción indiferenciadas; B, Control negativo de CMM con MC-SFB indiferenciadas; C, CMM con MC-LP de inducción indiferenciadas; D, Control negativo con MC-LP indiferenciadas.

5.3. Proliferación de las CMM-TA:

La cinética de crecimiento celular medida a través de la prueba de NCPC, cuando se evaluó el tiempo en llegar al 80% de confluencia, se observó que las CMM cultivadas con MC-SFB demoraron $5,05 \pm 0,89$ días y con MC-LP $5,21 \pm 0,84$ días, sin observar diferencias significativas ($p=0,18$). Tampoco se observó diferencias en la cantidad de células cosechadas obteniendo $12,52 \pm 5,56 \times 10^4$ células/cm² con MC-SFB y $11,81 \pm 7,0 \times 10^4$ células/cm² con MC-LP ($p=0,43$). Estas evaluaciones fueron hechas sin distinguir el pasaje. Sin embargo, al analizar los datos en base a los diferentes pasajes, se observa que el tiempo en alcanzar el 80% de confluencia de las células fue similar para la mayoría de los pasajes, pero en los P₂ y P₃ se vieron tendencias ($p=0,08$) indicando menor tiempo para llegar al 80% de confluencia para las células cultivadas con MC-LP (figura 6).

Los resultados del recuento celular por cada pasaje, demostraron que existió de manera significativa un mayor recuento para el MC-LP en el caso de los P₂ ($p=0,001$) y P₅ ($p=0,01$). Sin embargo, en el caso del P₃ se vio un mayor recuento con el MC-SFB ($p=0,029$) (figura 7).

Al evaluar el efecto pasaje sobre el recuento celular y sin discriminar por medio de cultivo, se observó que fue incrementando hasta llegar al recuento máximo en el P₄ para luego decrecer, siendo las diferencias significativas (ANOVA: $p=3,7 \times 10^{-15}$) (figura 8). Al discriminar por MC, se observó que se comporta de igual forma (MC-LP $p=1,4 \times 10^{-7}$ y MC-SFB $p=2,3 \times 10^{-10}$). Existen diferencias significativas en el tiempo en llegar al 80% de confluencia entre los distintos pasajes (sin tomar en cuenta el medio en que se cultivaron), siendo creciente desde el P₂ al P₄ para luego decrecer

(ANOVA: $p=5,28 \times 10^{-22}$) (figura 9). Si se separan las muestras por MC se observa que crece y decrece de forma similar (ANOVA: MC-LP $p=1,9 \times 10^{-10}$ y MC-SFB $p=8,6 \times 10^{-12}$).

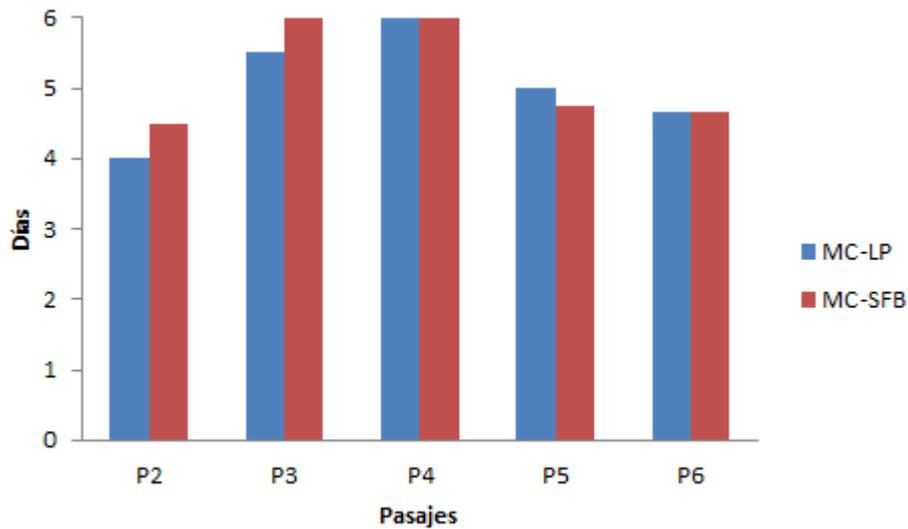


Figura 6: Días en llegar al 80 % de confluencia discriminando por pasaje y por medio. P₂ y P₃ presentaron tendencias ($0,05 < p < 0,10$).

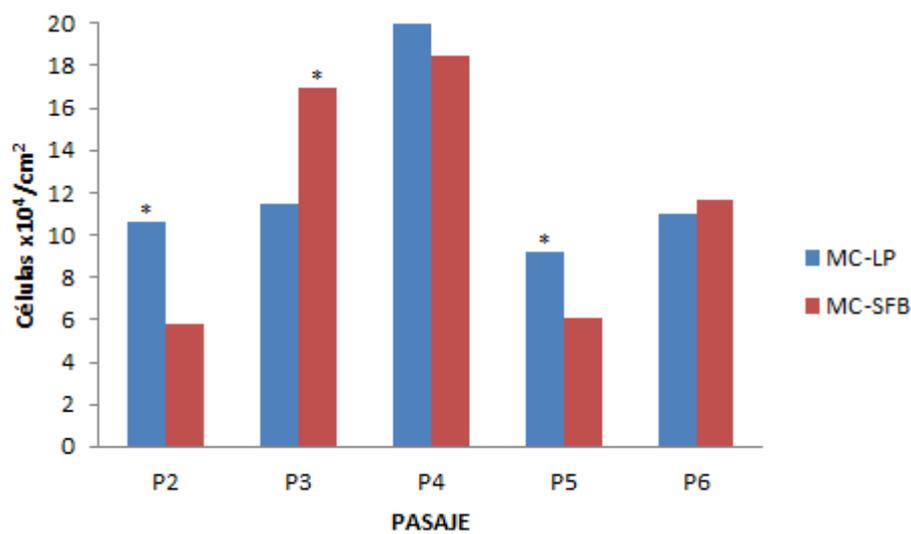


Figura 7: Recuento celular discriminando por pasaje y por medio de crecimiento. Diferencias significativas * $p < 0,05$.

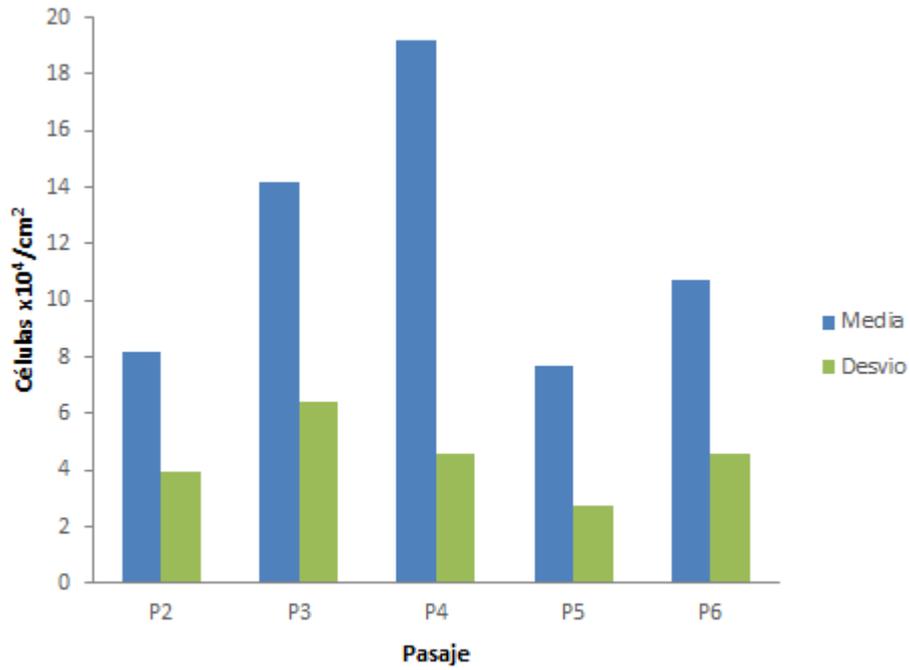


Figura 8: Recuento celular discriminado solamente por pasaje, sin tomar en cuenta el medio de cultivo utilizado. Existe un efecto pasaje (Test de ANOVA $p=3,7 \times 10^{-15}$)

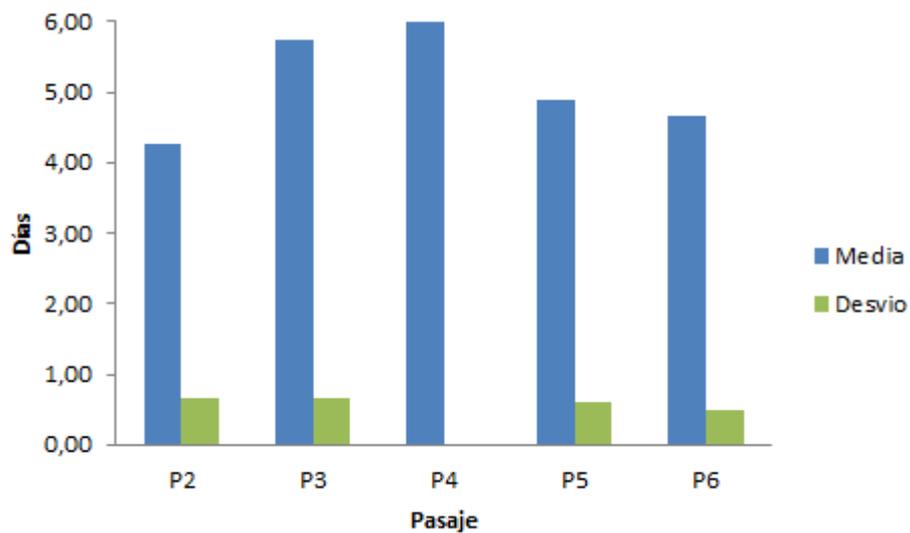


Figura 9: Días en llegar al 80 % de confluencia discriminando por pasaje y no por medio de crecimiento. Existe un efecto pasaje (ANOVA: $p=5,28 \times 10^{-22}$).

6. DISCUSIÓN

Las células con las que trabajamos presentaron adherencia al plástico, morfología fibroblástica, capacidad de formar colonias y multipotencialidad, cumpliendo con la mayoría de los criterios acordados por la *ISCT*. Las CMM se criopreservaron por un período de hasta seis meses, sin alterarse sus características fenotípicas ni cinética de crecimiento. Esto se comprobó al descongelar y utilizar muestras del P₃ para la tridiferenciación *in vitro* que contó con varios pasajes más, manteniendo su característica de autorenovación. Estos resultados concuerdan con los ensayos presentados por Mitchell et al., (2015) y Martinello et al., (2009), que comprobaron que la caracterización de las CMM criopreservadas es muy similar a las frescas.

La morfología celular (células más pequeñas y rectangulares) que se vio a medida que avanzamos en pasajes de las CMM con MC-LP, puede atribuirse a un cambio inducido por el medio, coincidiendo con otros autores que observaron el mismo cambio (Seo et al., 2013a). Por otro lado, Pascucci et al., (2010) informan de una alteración morfológica debido al uso repetido de tripsina para los levantamientos; en nuestro caso no podemos atribuirlo a los sucesivos pasajes celulares debido a que las CMM cultivadas con MC-SFB no presentaron cambios morfológicos y sufrieron los mismos pasajes con tripsina.

Se logró caracterizar las CMM mediante las UFC-F y la diferenciación osteogénica y condrogénica, siendo que la diferenciación a linaje adipogénico no se logró. El cumplimiento parcial de este objetivo pudo deberse al protocolo implementado de Yaneselli (2015) que fue adaptado para caninos y no equinos. Más allá de que en el colectivo científico esté aceptado ampliamente la tridiferenciación (adiposo, cartilaginoso y óseo) como criterio de referencia para denominar una célula estromal en CMM (Dominici et al., 2006) existen diversos trabajos científicos en equinos donde realizaron la diferenciación *in vitro* en dos linajes celulares (Schwarz et al., 2012; Carvalho et al., 2013b) o uno solo (Seo et al., 2013a) y son denominadas igualmente CMM.

En el presente trabajo se realizó un *pool* de LP de 3 caballos sanos, la ventaja de esto fue la eliminación del factor individual. Otros autores utilizan un *pool* de LP con la misma finalidad, como Seo et al., (2013a) que utilizan 4 caballos sanos, o Doucet et al. (2005) quienes utilizan 10 individuos. El recuento plaquetario del LP que se utilizó en este trabajo fue de $9,6 \times 10^7$ /mL, correspondiendo a la concentración basal de plaquetas. Esto discrepa con otros autores que utilizan mayor concentración de plaquetas 1×10^9 /mL, en CMM equinas (Seo et al., 2013a; Russell et al., 2016) y humanas (Doucet et al., 2005). Estos autores trabajaron en base a un LP para el medio de crecimiento que contenía un recuento plaquetario 10 veces mayor a la concentración basal que se obtiene del plasma. Ellos consiguieron un recuento tan alto, debido a que la preparación previa del LP fue mediante la obtención de plasma rico en plaquetas (PRP). Esta diferencia en la concentración de plaquetas nos llevó a utilizar un MC-LP al 20%, ya que al 10% la concentración de plaquetas que se manejaba era muy escasa, dando una cinética celular visiblemente inferior a las cultivadas con MC-SFB al 10 %. Asimismo, Doucet et al., (2005) describe que el MC-LP fue más eficiente que el MC-SFB ya que incrementaron las UFC-F, aumentaron las tasas de proliferación, y disminuyó el tiempo necesario en llegar a una misma confluencia comparado con el MC-SFB, además de sugerir que el MC-LP fue más eficaz para la diferenciación osteogénica. Los resultados obtenidos en nuestro

ensayo fueron igualmente positivos que los señalados por los autores mencionados, ya que no hubo diferencias significativas en la cinética de crecimiento y caracterización de las CMM cultivadas con ambos medios. Esto es aún más beneficioso para la medicina equina porque al evitarse la realización del PRP, la formulación del MC-LP se torna mucho más sencilla, práctica, económica y menos invasiva para el animal ya que se necesitan menores volúmenes de sangre. En varios trabajos se especifica la cuantificación e identificación de los factores de crecimiento contenidos en el LP utilizado (Doucet et al., 2005; Rauch et al., 2011), siendo esto parte fundamental en el camino hacia la estandarización del LP e identificación de los factores de crecimiento que realmente permiten la propagación de las CMM en cultivo (Seo et al., 2013a). En contraposición, Schwarz et al., (2012) manifiesta resultados desfavorables en cuanto a un MC con suero autólogo en equinos frente al MC-SFB, adjudicándole a este último diferencias significativas favorables en cuanto a la cinética de crecimiento de las CMM cultivadas. Sin embargo, cabe destacar que en el ensayo de Schwarz et al., (2012) en vez de utilizar LP utilizan suero equino, sin cuantificar los factores de crecimiento que son lo importante en dicho insumo para el cultivo de las CMM.

Ningún trabajo consultado anterior al nuestro, describe una adaptación desde el MC-SFB al MC-LP ya que en sus ensayos se inicia cultivando las CMM con el medio de crecimiento a evaluar desde el aislamiento. En nuestro caso, el aislamiento y cultivo hasta el P₂ de todas las muestras se hizo en MC-SFB, y luego fueron adaptadas al MC-LP. Esto supone un nuevo dato muy beneficioso a tener en cuenta, ya que se comprobó la capacidad de adaptación de las CMM de un medio al otro y abre la posibilidad de continuar cultivando las CMM con MC-LP, aún cuando hayan sido aisladas con MC-SFB, siendo un paso intermedio para la eliminación de éste en las formulaciones del MC para CMM. Al realizar el ensayo para definir la concentración de LP en el MC a utilizar, observamos que al 20 % y al 30% no presentaban diferencias visibles en la cinética de crecimiento entre ellos, correspondiéndose con los resultados de Russell et al., (2016). Además, el MC con LP al 40% mostró una clara inferioridad en su potencial de crecimiento celular coincidiendo con los resultados de este mismo trabajo. Estos autores proponen que el exceso de factores de crecimiento provenientes del LP tiene un efecto contraproducente en el crecimiento de las CMM.

Cuando evaluamos la proliferación celular, se observó que no hubo diferencias significativas en la cantidad de células cosechadas y el tiempo de crecimiento al evaluar el MC-LP y MC-SFB. Estos resultados coinciden con lo descrito por otros autores (Seo et al., 2013a y Russell et al., 2016). Cuando fueron evaluados los pasajes individualmente se observó una mayor proliferación hasta el pasaje 3-4, disminuyendo notoriamente en el pasaje 4-5, coincidiendo con Martinello et al., (2009). Otros de nuestros resultados del NCPC muestran que existieron tendencias en el P₂ y P₃ en el tiempo en que llegaron al 80% de confluencia a favor del MC-LP, no alcanzando a ser una diferencia significativa, debiéndose seguramente a que el "n" utilizado fue demasiado pequeño. Asimismo, al evaluar la cantidad de células cosechadas discriminando los distintos pasajes, se observaron diferencias significativas en los P₂ y P₅ a favor del MC-LP y en el P₃ a favor del MC-SFB. Estas diferencias en el crecimiento podrían deberse a los operadores, que también podría diluirse en el caso de aumentar el "n" del muestreo.

Existen otros métodos de evaluar la cinética celular además de la utilizada por nosotros (NCPC), a pesar de esto otros autores describen similares resultados a los nuestros. Principalmente es utilizado el Tiempo de Duplicación Poblacional (TDP) (Martinello et al., 2009; Ranera et al., 2012; Schwarz et al., 2012, Seo et al., 2013). De haber utilizado la misma prueba la comparación directa de resultados hubiera sido posible. La ventaja de evaluar la cinética de crecimiento a través del NCPC consiste en que es una aproximación mayor a la realidad terapéutica, ya que nos arroja un resultado directo del tiempo y de la cantidad de células que se cosechan en una expansión de CMM para la aplicación en la clínica equina. Este último método tiene un nivel de subjetividad mayor al TDP porque está asociada a la variable, determinación del tiempo en que llegan al 80% de confluencia. Además, esto pudo haber sido influenciado por el manejo de distintos operadores, aunque éstos hayan sido entrenados al mismo tiempo y bajo las mismas consignas.

Nuestra formulación de MC-LP implica un menor volumen de sangre equina a la utilizada por Seo et al., (2013a) o un menor número de animales a los que sangrar, aludiendo a los conceptos de *Reducir* y *Reemplazar*, que se vienen trabajando hace más de 50 años por la comunidad científica en pro de la disminución y mejor utilización de los recursos vivos para la experimentación. Russell et al., (1959) describieron por primera vez el concepto de las 3 Rs (*Refinar, Reducir y Reemplazar*), lo que hace referencia a minimizar el uso y la incidencia de procedimientos inhumanos, reducir el número de animales utilizados en los ensayos y reemplazar la mayor cantidad de experimentos *in vivo*, por procedimientos *in vitro* (Van del Valk et al., 2004; Rauch et al., 2011). Desde este punto de vista, la utilización de sangre equina para la obtención de LP para el cultivo de CMM es una muy buena opción para minimizar el uso de procedimientos inhumanos, como ser la obtención de SFB en animales vivos de frigorífico.

7. CONCLUSIONES

Se logró caracterizar las CMM cultivadas con ambos suplementos, presentando la capacidad de formar colonias fibroblásticas y de diferenciarse a los linajes condrogénico y osteogénico.

El LP es un buen sustituto para el SFB aceptando la hipótesis planteada, ya que se observó una cinética de crecimiento celular *in vitro* similar para ambos medios de crecimiento (MC-SFB y MC-LP).

Por primera vez se describió el uso de LP a concentración basal como suplemento del medio de crecimiento para CMM equinas y la adaptación al mismo.

8. PERSPECTIVAS

Este trabajo es un buen punto de partida para ampliar el estudio del efecto del LP sobre las CMM y corroborar su eficacia y desempeño terapéutico en la clínica equina.

9. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Alipour, F., Parham, A., Mehrjerdi, H. K., Dehghani, H. (2015). Equine adipose-derived mesenchymal stem cells: phenotype and growth characteristics, gene expression profile and differentiation potentials. *Cell Journal (Yakhteh)*, 2015, 16(4): 456-465.
- 2) Ankrum, J. A., Ong, J. F., Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, 32(3), 252-260.
- 3) Argüelles, D., Carmona, J. U., Pastor, J., Iborra, A., Viñals, L., Martínez, P., Bach, E., Prades, M., (2006). Evaluation of single and double centrifugation tube methods for concentrating equine platelets. *Research in Veterinary Science*, 81(2): 237-245.
- 4) Benedetti, L. (2007), Medicina regenerativa y células madres, <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3577/ARTICULOS-OTROS-TEMAS-ARCHIVO/Medicina-regenerativa-y-celulas-madres..html>, fecha de consulta: 21 de junio de 2016.
- 5) Benedetti, L., Fagundez, C., García, F., Figari, M. (2016) Utilización de células madre alogénicas derivadas de tejido adiposo equino como único tratamiento en cinco casos de fracturas articulares de huesos cortos. XXVII Conferencias Internacionales de Veterinaria Equina. AAVE. Buenos Aires, Argentina
- 6) Barberini, D. J., Freitas, N. P. P., Magnoni, M. S., Maia, L., Listoni, A. J., Heckler, M. C., Sudano, M. J., Golim, M. A., Landim-Alvarenga, F., Amorim, R. M. (2014). Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem cell research & therapy*, 5(1):25.
- 7) Barrachina, L., Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez, F. J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C. (2016). Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Veterinary immunology and immunopathology*, 171: 57-65.
- 8) Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., Klüter, H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem cells*, 27(9): 2331-2341.
- 9) Bošković, A., Eid, A., Pontabry, J., Ishiuchi, T., Spiegelhalter, C., Ram, E. V. R., Meshorer, E., Torres-Padilla, M. E. (2014). Higher chromatin mobility supports totipotency and precedes pluripotency in vivo. *Genes & development*, 28(10): 1042-1047.
- 10) Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Heinz, R., Rubin, J. P., Yoshimura, K., Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and

the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytherapy*, 15(6): 641-648.

- 11) Cardozo, A. J., Benedetti, L., Argibay, P. (2006) Aislamiento de células stem mesenquimales a partir de tejido adiposo equino. LI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata, Argentina.
- 12) Carstanjen, B., Desbois, C., Hekmati, M., & Behr, L. (2006). Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. *Canadian journal of veterinary research*, 70(2): 143.
- 13) Carvalho, A. M., Yamada, A. L. M., Golim, M. A., Álvarez, L. E. C., Jorge, L. L., Conceição, M. L., Deffune, E., Hussni, C. A., Alves, A. L. G. (2013a). Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 65(4): 939-945.
- 14) Carvalho, A. D. M., Yamada, A. L. M., Martins, J. R., Maia, L., Golim, M. A., Deffune, E., Deffune, E., Hussni, A. C., Alves, A. L. G. (2013b). Isolation and characterization of equine peripheral blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(9): 1151-1154.
- 15) Del Bue, M., Ricco, S., Conti, V., Merli, E., Ramoni, R., Grolli, S. (2007). Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Vet Res Commun*, 31(Suppl 1): 289-292.
- 16) Dominici, M. L. B. K., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 8(4), 315-317.
- 17) Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J. R., Begot, L., Holy, X., & Lataillade, J. J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell based therapy applications. *Journal of Cellular Physiology*, 205(2): 228-236.
- 18) Frisbie, D. D., Kisiday, J. D., Kawcak, C. E., Werpy, N. M., McIlwraith, C. W. (2009). Evaluation of adipose derived stromal vascular fraction or bone marrow- derived mesenchymal stem cells for treatment of osteoarthritis. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(12): 1675-1680.
- 19) Griffin, M. D., Ritter, T., Mahon, B. P. (2010). Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Human Gene Therapy*, 21(12): 1641-1655.
- 20) Grigolo, B., Lisignoli, G., Desando, G., Cavallo, C., Marconi, E., Tschon, M., Giaveresi, G., Fini, E., Giardino, R., Facchini, A. (2009). Osteoarthritis treated with mesenchymal stem cells on hyaluronan-based scaffold in rabbit. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 15(4): 647-658.

- 21) Hemberger, M., Dean, W., Reik, W. (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nature reviews Molecular cell biology*, 10(8): 526-537.
- 22) Jochems, C. E., Van der Valk, J. B., Stafleu, F. R., Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem?. *Alternative to Laboratory Animals*, 30(2): 219-227.
- 23) Koerner, J., Nesic, D., Romero, J. D., Brehm, W., Mainil Varlet, P., Grogan, S. P. (2006). Equine peripheral blood- derived progenitors in comparison to bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 24(6): 1613-1619.
- 24) Komoda, H., Okura, H., Lee, C. M., Sougawa, N., Iwayama, T., Hashikawa, T., Saga, A., Yamamoto-Kakuta, A., Ichinose, A., Murakami, S., Sawa, Y., Matsuyama, A. (2009). Reduction of N-glycolylneuraminic acid xenoantigen on human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies. *Tissue Engineering Part A*, 16(4): 1143-1155.
- 25) Malikides, N., Hodgson, J. L., Rose, R. J., Hodgson, D. R. (2001). Cardiovascular, haematological and biochemical responses after large volume blood collection in horses. *The Veterinary Journal*, 162(1): 44-55.
- 26) Martinello, T., Bronzini, I., Maccatrozzo, L., Iacopetti, I., Sampaolesi, M., Mascarello, F., Patrino, M. (2009). Cryopreservation does not affect the stem characteristics of multipotent cells isolated from equine peripheral blood. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16(4): 771-781.
- 27) Mitchell, A., Rivas, K. A., Smith, R., Watts, A. E. (2015). Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95% autologous serum and 5% DMSO does not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95% and DMSO at 10 or 5%. *Stem Cell Research & Therapy*, 6: 231.
- 28) Mondino, A., Yaneselli, K., Ferreira, O., Maisonnave, J. (2016). Aplicación exitosa de PRP y parches de fibrina en un caso clínico de un equino deportivo. *Veterinaria (Montevideo)*, 52(203): 10-17.
- 29) Pascucci, L., Mercati, F., Marini, C., Ceccarelli, P., Dall'Aglio, C., Pedini, V., Gargiulo, A. M. (2010). Ultrastructural morphology of equine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Histol Histopathol* 25(10): 1277-1285.
- 30) Ranera, B., Lyahyai, J., Romero, A., Vázquez, F. J., Remacha, A. R., Bernal, M. L., Zaragoza. P., Rodellar. C., Martín-Burriel, I. (2011). Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1): 147-154.
- 31) Ranera, B., Ordovás, L., Lyahyai, J., Bernal, M. L., Fernandes, F., Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez F.J., Osta, R., Cons, C., Varona, L., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., Rodellar, C. (2012). Comparative study of equine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells. *Equine Veterinary Journal*, 44(1): 33-42.

- 32) Rauch, C., Feifel, E., Amann, E. M., Peter Spötl, H., Schennach, H., Pfaller, W., Gstraunthaler, G. (2011). Alternatives to the use of fetal bovine serum: human platelet lysates as a serum substitute in cell culture media. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 28(4): 305-316.
- 33) Rendu, F., Brohard-Bohn, B. (2001). The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets*, 12(5): 261-273.
- 34) Richardson, L. E., Dudhia, J., Clegg, P. D., Smith, R. (2007). Stem cells in veterinary medicine—attempts at regenerating equine tendon after injury. *Trends in Biotechnology*, 25(9): 409-416.
- 35) Romero, A., (2015). Tratamiento de las tendinitis inducidas en caballos: estudio comparativo entre plasma rico en plaquetas (PRP) y células madre mesenquimales (MSCS). Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, España, 220 p.
- 36) Russell, W. M. S., Burch, R. L., Hume, C. W. (1959) The principles of humane experimental technique. Londres, Methuen y co. Ltd, 238 p.
- 37) Russell, K. A., Koch, T. G. (2016). Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture—too much of a good thing?. *Equine Veterinary Journal*, 48(2): 261-264.
- 38) Schnabel, L. V., Mohammed, H. O., Jacobson, M. S., Fortier, L. A. (2008). Effects of platelet rich plasma and acellular bone marrow on gene expression patterns and DNA content of equine suspensory ligament explant cultures. *Equine Veterinary Journal*, 40(3): 260-265.
- 39) Schwarz, C., Leicht, U., Rothe, C., Drosse, I., Luibl, V., Röcken, M., & Schieker, M. (2012). Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Research in Veterinary Science*, 93(1), 457-462.
- 40) Seo, J. P., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N. (2013a). Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for *in vitro* expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Research in Veterinary Science*, 95(2): 693-698.
- 41) Seo, J. P., Tanabe, T., Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., Sasaki, N. (2013b). Effects of bilayer gelatin/ β -tricalcium phosphate sponges loaded with mesenchymal stem cells, chondrocytes, bone morphogenetic protein-2, and platelet rich plasma on osteochondral defects of the talus in horses. *Research in veterinary science*, 95(3): 1210-1216.
- 42) Smith, R. K. W., Korda, M., Blunn, G. W., Goodship, A. E. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine veterinary journal*, 35(1): 99-102.
- 43) Smith, R. K. W., Webbon, P. M. (2005). Harnessing the stem cell for the treatment of tendon injuries: heralding a new dawn? *British Journal of Sports Medicine*, 39(9): 582-584.

- 44) Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M., Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Fraser, J. K., Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *The Keio Journal of Medicine*, 54(3): 132-141.
- 45) Schraufstatter, I. U., DiScipio, R. G., Zhao, M., Khaldoyanidi, S. K. (2009). C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *The Journal of Immunology*, 182(6): 3827-3836.
- 46) Thanabalasundaram, G., Arumalla, N., D Tailor, H., S Khan, W. (2012). Regulation of differentiation of mesenchymal stem cells into musculoskeletal cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 7(2): 95-102.
- 47) Tu, Z., Li, Q., Bu, H., Lin, F. (2010). Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells and Development*, 19(11): 1803-1809.
- 48) Van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., Hellebrekers, L., Hyllner, J., Jonker, F. H., Prieto, P., Thalen, M., Baumans, V. (2004). The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro*, 18(1): 1-12.
- 49) Vázquez, F. J., Romero, A., Rodellar, C. (2012). Medicina regenerativa: aplicación en la clínica equina. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 6(2): 38-47.
- 50) Vidal, M. A., Kilroy, G. E., Lopez, M. J., Johnson, J. R., Moore, R. M., Gimble, J. M. (2007). Characterization of Equine Adipose Tissue- Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow- Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Veterinary Surgery*, 36(7): 613-622.
- 51) Watts, A. E., Yeager, A. E., Kopyov, O. V., Nixon, A. J. (2011). Fetal derived embryonic-like stem cells improve healing in a large animal flexor tendonitis model. *Stem Cell Research & Therapy*, 2(1): 4.
- 52) Whitworth, D. J., Banks, T. A. (2014). Stem cell therapies for treating osteoarthritis: Prescient or premature?. *The Veterinary Journal*, 202(3): 416-424.
- 53) Wilke, M. M., Nydam, D. V., Nixon, A. J. (2007). Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research*, 25(7): 913-925.
- 54) Yaneselli, K. M. (2015). Caracterización de las Células Madre Mesenquimales Caninas derivadas de tejido adiposo/CMM-TA) extraídas de dos sitios anatómicos diferentes. Tesis de Maestría en Salud Animal, FVet, Uruguay, 71p.

10. ANEXO

10.1 Anexo 1:

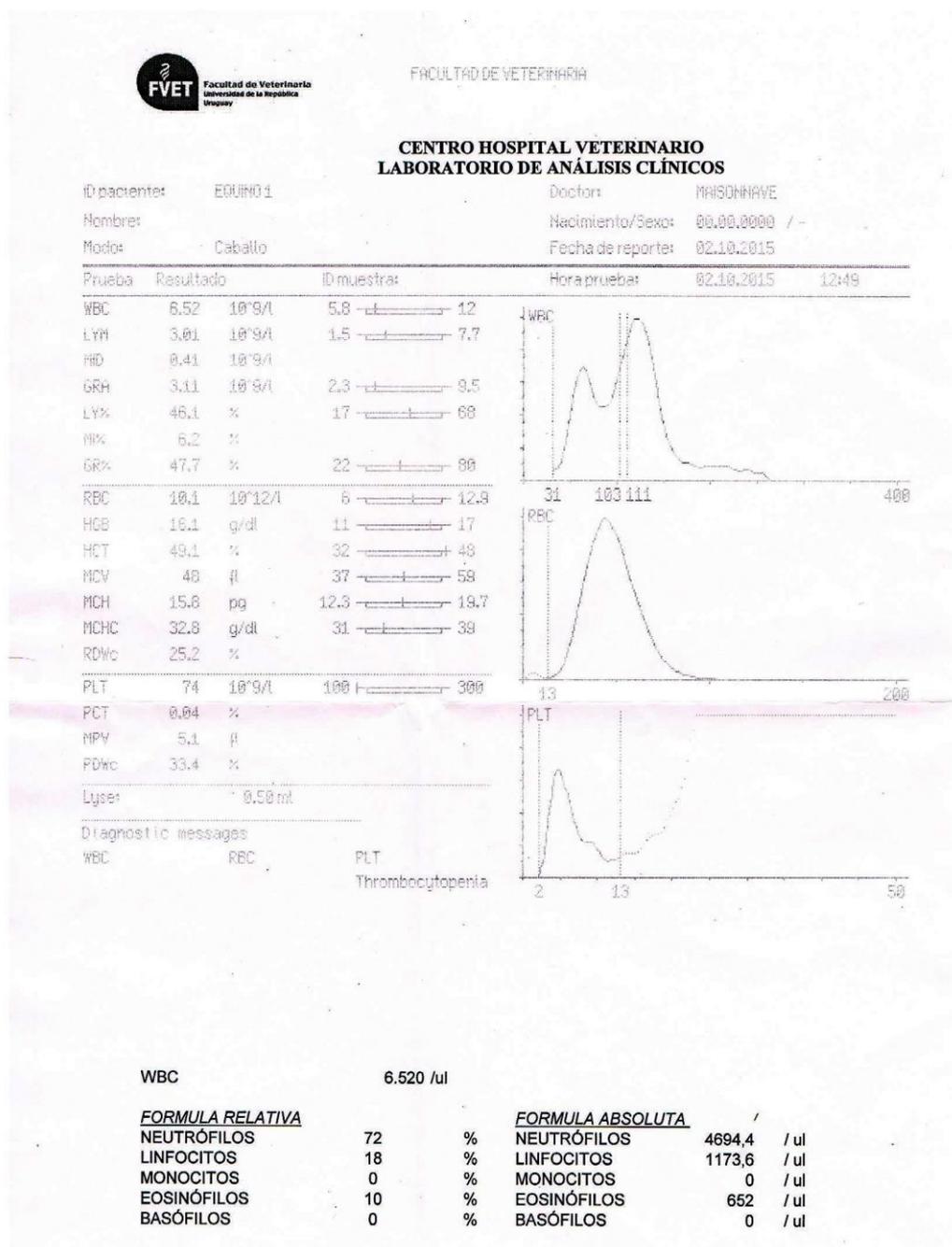


Figura 10: Hemograma equino 1.



**CENTRO HOSPITAL VETERINARIO
LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS**

ID paciente: EQUINO 2 Nombre: Pertenencia: PAINSONHAVE
 Nombre: Nacimiento/Sexo: 00.00.0000 / -
 Modo: Caballo Fecha de reporte: 02.10.2015

Prueba	Resultado	ID muestra:	Referencia	Hora prueba:	02.10.2015 12:55		
WBC	9.64 $10^9/l$	5.8	1.2 - 12				
LYM	4.14 $10^9/l$	1.5	1.5 - 7.7				
MD	0.22 $10^9/l$						
GRA	5.28 $10^9/l$	2.3	2.3 - 9.5				
LY%	43.0 %	17	17 - 68				
MP%	2.3 %						
GR%	54.6 %	22	22 - 80				
RBC	7.44 $10^{12}/l$	6	6 - 12.9				
HGB	11.5 g/dl	11	11 - 17				
HCT	32.9 %	32	32 - 48				
HCV	44 fl	37	37 - 59				
MCH	15.5 pg	12.3	12.3 - 19.7				
MCHC	34.9 g/dl	31	31 - 39				
RDWc	24.3 %						
PLT	76 $10^9/l$	100	100 - 300				
PCT	0.04 %						
MPV	4.9 fl						
PDWc	35.0 %						
Lycee	0.50 ml						

Diagnostic messages
 WBC RBC PLT
 Thrombocytopenia

WBC 9.640 /ul

FORMULA RELATIVA

NEUTRÓFILOS	54	%
LINFOCITOS	44	%
MONOCITOS	0	%
EOSINÓFILOS	2	%
BASÓFILOS	0	%

FORMULA ABSOLUTA

NEUTRÓFILOS	5205,6	/ul
LINFOCITOS	4241,6	/ul
MONOCITOS	0	/ul
EOSINÓFILOS	192,8	/ul
BASÓFILOS	0	/ul

Figura 11: Hemograma equino 2.

**CENTRO HOSPITAL VETERINARIO
LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS**

ID paciente: EQUINO 3 Doctor: MAISONAVVE
Nombre: Nacimiento/Sexo: 00.00.0000 / -
Modo: Caballo Fecha de reporte: 02.10.2015

Prueba	Resultado	ID muestra:	Horá prueba:	02.10.2015	10:01		
WBC	9.71 $10^9/l$	5.8	12				
LYF	4.50 $10^9/l$	1.5	7.7				
MD	0.80 $10^9/l$						
GRH	4.41 $10^9/l$	2.3	9.5				
LY%	46.3 %	17	68				
MP%	8.2 %						
GR%	45.5 %	22	80				
RBC	8.13 $10^{12}/l$	6	12.9				
HGB	13.2 g/dl	11	17				
HCT	39.8 %	32	48				
MCV	49 fl	37	58				
MCH	16.2 pg	12.3	19.7				
MCHC	33.0 g/dl	31	38				
RDWc	24.4 %						
PLT	97 $10^9/l$	100	300				
PCT	0.05 %						
MPV	5.6 fl						
PDWc	36.0 %						
Lyse:	0.50 ml						

Diagnostic messages

WBC RBC PLT
Thrombocytopenia

WBC 9.710 /ul

FORMULA RELATIVA

NEUTRÓFILOS	52	%
LINFOCITOS	41	%
MONOCITOS	0	%
EOSINÓFILOS	7	%
BASÓFILOS	0	%

FORMULA ABSOLUTA

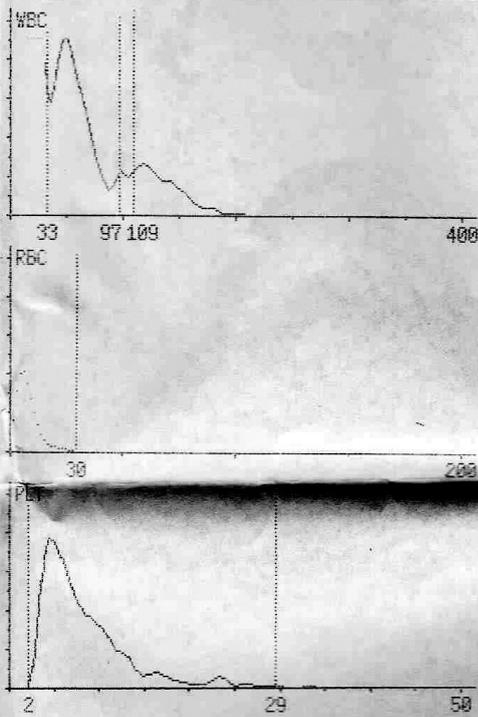
NEUTRÓFILOS	5049,2	/ul
LINFOCITOS	3981,1	/ul
MONOCITOS	0	/ul
EOSINÓFILOS	679,7	/ul
BASÓFILOS	0	/ul

Figura 12: Hemograma equino 3.

FACULTAD DE VETERINARIA

ID paciente: EQUINO 1 Doctor: MAISONNAVE
 Nombre: PLASMA Nacimiento/Sexo: 00.00.0000 / -
 Modo: Caballo Fecha de reporte: 02.10.2015

Prueba	Resultado	ID muestra:	Hora prueba:
WBC	1.01 10 ⁹ /l	5.8 ----- 12	02.10.2015 13:05
LYM	0.75 10 ⁹ /l	1.5 ----- 7.7	
MID	0.01 10 ⁹ /l		
GRA	0.25 10 ⁹ /l	2.3 ----- 9.5	
LY%	73.9 %	17 ----- 68	
MI%	1.5 %		
GR%	24.7 %	22 ----- 60	
RBC	0.01 10 ¹² /l	6 ----- 12.9	
HGB	0.1 g/dl	11 ----- 17	
HCT	0.03 %	32 ----- 48	
MCV	61 fl	37 ----- 59	
MCH	---	12.3 ----- 19.7	
MCHC	---	31 ----- 39	
RDWc	%		
PLT	96 10 ⁹ /l	100 ----- 300	
PCT	0.07 %		
MPV	7.0 fl		
PDWc	37.4 %		



Lyse: 0.50 ml

Diagnostic messages

WBC	RBC	PLT
Leukopenia	Anemia	
Granulocytopenia	Macrocytosis	
Lymphopenia		

Figura 13: Recuento plaquetario pool de plasma equino.

Estadística:

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas:	Días al 80-90% confl entre MC	
	MC-LP	MC-SFB
Media	5,05	5,21
Varianza	0,80	0,70
Observaciones	57	57
Coeficiente de correlación de Pearson	0,48	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	56	
Estadístico t	-1,35	
P(T<=t) dos colas	0,18	
Valor crítico de t (dos colas)	2,00	

No existen diferencias significativas entre los Días al 80-90% confluencia entre los medios.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	Recuento NCPD entre MC	
	MC-LP	MC-SFB
Media	12,52	11,81
Varianza	30,90	49,43
Observaciones	57	57
Coeficiente de correlación de Pearson	0,45	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	56	
Estadístico t	0,80	
P(T<=t) dos colas	0,43	
Valor crítico de t (dos colas)	2,00	

No existen diferencias significativas entre los Recuentos Finales de Células entre los medios

Análisis de varianza de un factor: **RECUESTO CELULAR por Pasajes sin discriminar MC**

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
P2	24	197	8,21	15,49
P3	24	341,25	14,22	41,23
P4	24	461,1	19,21	21,13
P5	24	183,6	7,65	7,50
P6	21	225,75	10,75	21,23

ANÁLISIS DE VARIANZA

FV	SC	GI	MC	Fc	Prob	Ft
SCE	2198,44	4	549,61	25,78	3,73E-15	2,45
SCD	2387,82	112	21,32			
SCT	4586,26	116				

Existen diferencias significativas entre los pasajes.

Análisis de varianza de un factor: **Recuento celular por Pasaje del MC-LP**

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
P2	12	127,25	10,60	16,56
P3	12	137,25	11,44	30,88
P4	12	239,75	19,98	12,90
P5	12	110,6	9,22	7,59
P6	9	99	11	13,19

ANÁLISIS DE VARIANZA

FV	SC	GI	MC	Fc	Prob	Ft
SCE	877,51	4	219,38	13,38	1,45E-07	2,55

SCD	852,78	52	16,40
SCT	1730,29	56	

Existen diferencias significativas entre los pasajes de las CMM cultivadas con MC-LP.

Análisis de varianza de un factor:

Recuento Celular por Pasaje del MC-SFB

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
P2	12	69,75	5,81	3,31
P3	12	204	17	38,45
P4	12	221,35	18,44	29,99
P5	12	73	6,08	2,74
P6	12	126,75	10,56	28,92

ANÁLISIS DE VARIANZA

FV	SC	GI	MC	Fc	Prob	Ft
SCE	1692,34	4	423,08	20,45	2,28E-10	2,54
SCD	1137,63	55	20,68			
SCT	2829,98	59				

Existen diferencias significativas entre los pasajes de las CMM cultivadas con MC-SFB

Análisis de varianza de un factor: **Tiempo en alcanzar el 80% de confluencia, sin discriminar MC.**

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
--------	--------	------	----------	----------

P2	24	102	4,25	0,46
P3	24	138	5,75	0,46
P4	24	144	6	0
P5	24	117	4,88	0,38
P6	24	114	4,75	0,19

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	SC	GL	PC	Fc	Prob.	Ft
SCE	51	4	12,75	42,97	5,28E-22	2,45
SCD	34,12	115	0,30			
SCT	85,12	119				

Existen diferencias significativas en el tiempo en llegar al 80% de confluencia entre los distintos pasajes (sin tomar en cuenta el medio en que se cultivaron).

Análisis de varianza de un factor: **Tiempo en alcanzar el 80% de confluencia para MC-LP.**

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
P2	12	48	4	0
P3	12	66	5,5	0,82
P4	12	72	6	0
P5	12	60	5	0,55
P6	9	42	4,67	0,25

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	SC	GL	PC	Fc	Prob.	Ft
---------------------------	----	----	----	----	-------	----

Entre grupos	27,84	4	6,96	21,29	1,91E-10	2,55
Dentro de los grupos	17	52	0,33			
Total	44,84	56				

Existen diferencias significativas en el tiempo en llegar al 80% de confluencia entre los distintos pasajes de las CMM cultivadas con MC-LP

Análisis de varianza de un factor: **Tiempo en alcanzar el 80% de confluencia para MC-SFB.**

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
P2	12	54	4,5	0,82
P3	12	72	6	0
P4	12	72	6	0
P5	12	57	4,75	0,20
P6	9	42	4,67	0,25

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	SC	GL	PC	Fc	Prob.	Ft
Entre grupos	26,22	4	6,56	25,73	8,62E-12	2,55
Dentro de los grupos	13,25	52	0,25			
Total	39,47	56				

Pasaje 2:

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

Recuento NCPC

MC-LP

MC-SFB

Media	10,60	5,81
Varianza	16,56	3,31
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	0,25	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	4,12	
P(T<=t) dos colas	0,0017	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20	

Existen diferencias significativas a favor del MC-LP

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	Días al 80-90% confl.	
	MC-LP	MC-SFB
Media	4	4,5
Varianza	0	0,82
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	#DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-1,91	
P(T<=t) dos colas	0,082	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20098516	

Existe una tendencia a favor del MC-LP

Pasaje 3:

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	Recuento NCPC	
	MC-LP	MC-SFB
Media	11,44	17

Varianza	30,88	38,45
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	0,15	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-2,52	
P(T<=t) dos colas	0,029	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20	

Existen diferencias significativas a favor del MC-SFB

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	Días al 80-90% confl.	
	MC-LP	MC-SFB
Media	5,5	6
Varianza	0,82	0
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	#DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	-1,91	
P(T<=t) dos colas	0,082	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20	
Existe una tendencia a favor del MC-LP		

Pasaje 4:

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	Recuento NCPC	
	MC-LP	MC-SFB
Media	19,98	18,45

Varianza	12,90	29,99
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,091	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	0,78	
P(T<=t) dos colas	0,45	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20	

No existen diferencias significativas entre los MC

	Días al 80-90% confl.	
	MC-LP	MC-SFB
Media	6	6
Varianza	0	0
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	#DIV/0!	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	#DIV/0!	
P(T<=t) dos colas	#DIV/0!	
Valor crítico de t (dos colas)	#DIV/0!	

No existen diferencias entre los MC.

Pasaje 5:

	Recuento NCPC	
	MC-LP	MC-SFB
Media	9,22	6,08

Varianza	7,59	2,74
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,49	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	2,82	
P(T<=t) dos colas	0,017	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20	

Existe una diferencia significativa a favor de MC-LP.

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	Días al 80-90% confl.	
	MC-LP	MC-SFB
Media	5	4,75
Varianza	0,55	0,20
Observaciones	12	12
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,82	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	11	
Estadístico t	0,76	
P(T<=t) dos colas	0,46	
Valor crítico de t (dos colas)	2,20	

No existen diferencias significativas entre los MC.

Pasaje 6:

Prueba t para medias de dos muestras emparejadas	Recuento NCPC	
	MC-LP	MC-SFB
Media	11	11,69

Varianza	13,19	33,98
Observaciones	9	9
Coeficiente de correlación de Pearson	0,38	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	-0,37	
P(T<=t) dos colas	0,72	
Valor crítico de t (dos colas)	2,31	

No existen diferencias significativas entre los MC.

	Días al 80-90% confl.	
	MC-LP	MC-SFB
Media	4,67	4,67
Varianza	0,25	0,25
Observaciones	9	9
Coeficiente de correlación de Pearson	-0,5	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	8	
Estadístico t	0	
P(T<=t) dos colas	1	
Valor crítico de t (dos colas)	2,30	

No existen diferencias significativas entre los MC.