

**EFFECTO DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS SOBRE LA CONDROGÉNESIS  
INDUCIDA A PARTIR DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES.**

Haidy Jazmín Moreno Rodríguez

**Autora**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar al título de**

**Bacterióloga**



**Pontificia Universidad Javeriana  
Facultad de Ciencias  
Carrera de Bacteriología  
Bogotá D.C  
Diciembre de 2012**

### **NOTA DE ADVERTENCIA**

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por los alumnos en sus tesis de grado. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica, y por qué las tesis no contengan ataques o polémicas puramente personales, antes bien, se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

**Artículo 23 de la resolución número 13 de Julio de 1946.**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero quisiera agradecer a Dios por ser el director principal de mi vida y por darme día a día bendiciones y oportunidades maravillosas de seguir creciendo como persona y profesional.

A mi abuelito por sus oraciones, bendiciones y enseñanzas a lo largo de mi vida. Por ser uno de mis pilares, ejemplo a seguir y el ángel que me cuida e ilumina.

A mis padres y hermano por su apoyo y colaboración durante el desarrollo de mi carrera y por su acompañamiento durante este largo proceso de aprendizaje.

Especialmente a la Doctora Viviana Rodríguez por su entrega, colaboración, enseñanzas, confianza y comprensión a través del desarrollo del presente trabajo. Al Doctor Rafael Pérez por su colaboración en la realización del proyecto.

Igualmente al grupo de Inmunobiología y Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, a la Unidad de Citometría de Flujo del Hospital Universitario San Ignacio. A los pacientes de Ortopedia del Hospital Universitario San Ignacio en el proceso de obtención de las muestras de Médula Ósea respectivamente.

A mis amigos que de una y otra manera me colaboraron de forma moral o práctica con la consecución y realización del proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

	PAG
<b>1. Introducción</b>	9
<b>2. Justificación</b>	10
<b>3. Marco teórico</b>	11
3.1 Papel Células Estromales Mesenquimales en la regeneración Condrogénica	11
3.1.1 Que son las Células Estromales Mesenquimales.	11
3.1.2 Criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular.	11
3.2 Uso del plasma rico en plaquetas en la regeneración tisular.	12
3.2.1 Plasma rico en plaquetas	14
3.2.2 Lisado plaquetario.	16
3.2.3 Efecto del plasma rico en plaquetas en la regeneración tisular	16
<b>4. Objetivos</b>	17
4.1 General	17
4.2 Específicos	17
<b>5. Metodología</b>	18
5.1 Estandarización de la obtención del plasma rico en plaquetas y lisado plaquetario a partir de sangre total.	18
5.2 Aislamiento y cultivo de Células Estromales Mesenquimales de Medula Ósea	18
5.3 Caracterización <i>in vitro</i> de Células Estromales Mesenquimales de Medula Ósea Según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular	20
5.4 Evaluación de las características morfológicas de las CEM	20
5.5 Diferenciación osteogénica, adipogénica y osteogénica de las Celulas Estromales Mesenquimales.	21
5.5.1 Diferenciación Osteogénica	21
5.5.2 Diferenciación Adipogénica	21
5.5.3 Diferenciación Condrogénica	21
5.6 Evaluación de la proliferación de Celulas Estromales Mesenquimales expuestas a plasma rico en plaquetas mediante la incorporación de Carboxifluoresceina Diacetato Succinil Ester (CFSE).	22
5.7 Evaluación de la viabilidad celular de CEM humanas expuestas a PRP y LP mediante el uso de la tinción supravital LIVE/DEAD AQUA. (L34957 invitrogen)	22
5.8 Evaluación de la diferenciación condrogénica de CEM expuestas a PRP y LP Mediante el uso de medios selectivos para su diferenciación	23
5.9 Análisis estadísticos	23
<b>6. Resultados</b>	
6.1 Estandarización de la obtención del plasma rico en plaquetas a partir de sangre total humana	24

6.2 Aislamiento y caracterización Células Estromales Mesenquimales (CEM) de medula ósea humana (inmunofenotipo y diferenciación trilineaje).	25
6.2.1 Evaluación morfológica de células estromales mesenquimales	25
6.2.2 Inmunofenotipo de células estromales mesenquimales	26
6.2.3 Diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica de células estromales mesenquimales	27
6.3 Evaluación de la proliferación de CEM expuestos a PRP, LP, SFB por medio de la incorporación de Carboxifluoresceina Diacetato Succinil Ester (CFSE) y evaluación por citometría de flujo.	29
6.4 Evaluación de la viabilidad celular de CEM humanas expuestas a PRP, LP y SFB. Mediante el uso de la Tinción supravital LIVE/DEAD AQUA. (L34957 invitrogen).	38
6.5 Evaluación de la diferenciación condrogénica de CEM expuestas a PRP y LP mediante el uso de medios selectivos para su diferenciación.	42
<b>7. Discusión</b>	<b>44</b>
<b>8. Conclusiones</b>	<b>46</b>
<b>9. Bibliografía</b>	<b>47</b>
<b>10. Anexos</b>	<b>50</b>

## TABLA DE ABREVIATURAS

CEM	Células Estromales Mesenquimales
MO	Médula ósea
SITC	Sociedad Internacional de Terapia Celular
MCE	Matriz Extracelular Celular
PRP	Plasma Rico En Plaquetas
TGF – $\beta$ 1	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>1</i>
AMP	Adenosinmonofosfato
ADP	Adenosín difosfato
PPAR – $\gamma$	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
PDGF	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
VEFG	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
SFB	Suero Fetal Bovino
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
LP	Lisado Plaquetario
CFSE	Carboxifluoresceina Diacetato Succinil Ester
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
HA/TPC	<i>Hydroxyapatite/Tricalcium Phosphat</i>
$\beta$ -GP	$\beta$ -Glicerol fosfato
Col2a	Colágeno de tipo II, Alfa 1
ST	Sangre Total
IP	Índice Proliferación

## RESUMEN

**Introducción.** Las Células Estromales Mesenquimales (CEM) son células con capacidad de regeneración. No es claro el efecto de co-adyuvantes utilizados en tratamientos de regeneración como el plasma rico en plaquetas sobre las CEM. **Objetivo** Evaluar el efecto del plasma rico en plaquetas en la inducción de la diferenciación condrogénica a partir de Células Estromales Mesenquimales. **Metodología.** Se recolectaron muestras de MO humana de donantes voluntarios sometidos a cirugía de remplazo total o parcial de cadera (previa aceptación del consentimiento informado), que asisten al departamento de Ortopedia del Hospital San Ignacio. Para realizar la caracterización según los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC): morfología, inmunofenotipo y diferenciación. Posteriormente se cultivaron CEM de medula ósea, suplementado con 10% Plasma rico en plaquetas, lisado plaquetario y suero fetal bovino durante 7 y 15 días para evaluar la proliferación, viabilidad y diferenciación condrogénica. **Resultados.** Se recolectaron 4 muestras de MO humana a partir de las cuales se establecieron cultivos de CEM con morfología fibroblastoide, presencia de antígenos mesenquimales CD105 y CD73, en ausencia de antígenos hematopoyéticos CD45 y CD34. Según los protocolos establecidos, las tinciones para evaluar la diferenciación adipogénica (sudan negro B), condrogénica (safranina O) y osteogénica (Von kossa) fueron positivas con respecto a las CEM control no diferenciadas. A partir de las CEM aisladas y caracterizadas se evaluó la proliferación, diferenciación y viabilidad celular en un sistema de cultivo celular CEM suplementada con PRP 10%, SFB 10% y LP 10%. EL PRP tuvo un efecto significativo en el índice de proliferación celular de las CEM en comparación con el SFB con un  $**p < 0.0001$  observándose a los 7 y 15 días de cultivo, sin embargo aunque no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular en las tres condiciones experimentales, se vio un ligero aumento en el porcentaje de viabilidad celular en las CEM cultivadas con PRP, con respecto a la capacidad condrogénica, se observó depósitos de glucosaminoglicanos cuando se adicionó PRP durante 14 días, de manera similar al patrón de oro. **Conclusión.** EL PRP ejerce un efecto significativo en la proliferación y viabilidad de las CEM e induce diferenciación condrogénica en comparación con el patrón de oro previamente estandarizado con medio de diferenciación, observándose producción de matriz extracelular y depósitos de glucosaminoglicanos por la tinción de safranina O.

# EFECTO PLASMA RICO EN PLAQUETAS SOBRE LA CONDRÓGENESIS INDUCIDA A PARTIR DE CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES.

## 1. INTRODUCCION

Las Células Estromales Mesenquimales (CEM) son una alternativa muy útil en aplicaciones clínicas para ciertas enfermedades en terapia regenerativa y terapia génica [1]. *Körbling et al*, describieron que las CEM tienen la capacidad de regenerar tejidos deteriorados o lesionados como hueso, cartílago, tejido hepático o miocardio [2]. Una de las principales aplicaciones clínicas de las CEM consiste en la reparación de hueso demostrado *in vivo* en modelos animales con defectos craneo-faciales mediante la administración directa de CEM con matrices como hidroxiapatito/fosfato tricálcico (HA/TPC), mostrando resultados satisfactorios [3].

En la regeneración de cartílago, se han postulado diferentes estrategias para lograr diferenciar *in situ* las CEM en cartílago; éstos procedimientos combinan, las CEM con matrices biológicas activas y factores de crecimiento que inducen a la formación de condrocitos logrando importantes avances[1]. En el tejido del miocardio se han descrito diferentes efectos de las CEM sobre el tejido cardíaco como la diferenciación *in situ* de éstas células en cardiomiocitos, liberación de factores solubles paracrinos que promuevan la proliferación de células residentes de tejido y/o la fusión de las CEM con células cardíacas [2].

Sin embargo los resultados con CEM son muy heterogéneos, es posible que con la ayuda de coadyuvantes como el plasma rico en plaquetas (PRP); un concentrado de plaquetas, que ha surgido recientemente como una herramienta biológicamente potencial para tratar trastornos de cicatrización de tejidos, regeneración ósea y regeneración del tejido cartilaginoso sea una alternativa nueva para futuros tratamientos [2].

Al parecer el potencial regenerador del PRP se basa en la liberación de factores de crecimiento que se produce con la activación y ruptura de las plaquetas, favoreciendo la proliferación y diferenciación de las CEM; ejerciendo un efecto significativamente positivo sobre la formación de tejido óseo y tejido cartilaginoso [4].



## 2. JUSTIFICACION

Las defectos osteocondrales , son aquellas lesiones que comprometen el cartílago articular y el hueso subcondral, evolucionando generalmente a osteoartrosis [5]. Este tipo de lesiones se produce principalmente en pacientes adultos mayores de 30 años, (68% de la población latinoamericana) .En un estudio realizado por *karin et al* encontraron una prevalencia global de lesiones del cartílago (condral u osteocondral ), del 61% y del 19% de la población infantil [6].

Las lesiones condrales han sido históricamente un problema de muy difícil solución. William Hunter afirmaba en 1743 que “desde Hipócrates hasta nuestros días, se acepta universalmente que el cartílago ulcerado es un asunto problemático y que una vez destruido no se repara...”. Desde entonces, numerosos estudios han confirmado que el cartílago tiene una capacidad limitada para su autorreparación directa, excepto para la formación de un tejido fibroso o fibrocartílago, que tiene deficientes características biomecánicas debido a su composición [7].

Múltiples esfuerzos se llevan realizando para encontrar un tratamiento eficaz, que evite la afectación generalizada de la articulación de las lesiones osteocondrales. Medidas convencionales se han propuesto por ejemplo (el reposo, cambios de estilo de vida, rehabilitación o tratamientos médicos farmacológicos); el objetivo de éstas es prevenir la expansión de la lesiones e intentar regenerar el cartílago para evitar en un futuro la evolución a osteoartritis [8].

Sin embargo, gran parte de estos tratamientos requieren una intervención quirúrgica, como el desbridamiento artroscópico; un tratamiento dirigido a eliminar síntomas mecánicos que interfieren en la función articular, produciendo un alivio de los síntomas a corto plazo, pero no resuelve la causa que origina la lesión. Otro tratamiento muy utilizados es la realización de perforaciones en las áreas locales donde hay desaparición del cartílago y exposición del hueso subcondral, implantando células pluripotentes con el fin de promover la formación de un fibrocartílago de reparación; tejido que carece de algunos componentes del cartílago, lo que lo hace mas susceptible a la ruptura, evitando así que este tratamiento se mantenga a largo plazo [9, 10].

Uno de los tratamiento Gold Estándar es la implantación de condrocitos autólogos , pero debido a que este requiere dos intervenciones quirúrgicas y a su capacidad limitada de reparación , se obliga a buscar y utilizar otros tratamientos cuyo potencial de diferenciación celular permita, teóricamente, su transformación en condrocitos y por tanto la neo formación de cartílago [11].

Por lo tanto buscar otras alternativas terapéuticas eficaces como las CEM con la estimulación de un co-adyuvante como el PRP, que estimula su diferenciación celular a células especializadas como condrocitos y la formación de un nuevo cartílago.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1. Papel de las CEM en la regeneración condrogénica.

Las CEM se han aislado de la médula ósea, sangre cordón umbilical y tejido adiposo. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos, generado un gran interés debido a su uso potencial en medicina regenerativa. Por ejemplo en el caso del tejido cartilaginoso, el cual no posee irrigación sanguínea, nerviosa, ni linfática, hace que tenga una baja capacidad de autorreparación, haciéndolo muy susceptible a lesiones osteocondrales y enfermedades degenerativas como la osteoartritis [12].

Muchos tratamientos para reparar estas lesiones osteocondrales en pacientes con enfermedades degenerativas, han sido muy estudiadas, ya que estos, proporcionan un manejo paliativo al paciente (alivio de los síntomas) a corto plazo, sin resolver la causa de la lesión. Uno de los tratamientos más utilizados clínicamente, es la implantación de condrocitos autólogos; Sin embargo, las limitaciones en la expansión y debido a la baja actividad proliferativa de estas células, han llevado a la investigación de las CEM por su capacidad de autorenovación, proliferación y diferenciación trilineaje, con el objetivo de generar condrocitos que sintetizan, reúnen y organizan la matriz extracelular (MEC) [13].

##### 3.1.1. Células Estromales Mesenquimales.

Las CEM son células multipotentes con capacidad de autorenovación, generar diversos tejidos y diferenciarse hacia diversos linajes como condrocitos, osteocitos y adipocitos. *Alexander Friedenstein*, fue el primero en describirlas en medula ósea (MO) con capacidad de adherencia al plástico y crecimiento *in vitro* [14]. Se estima que las CEM representan el 0.001% o 1:34,000 de las células mononucleadas en medula ósea adulta [15].

Las CEM han logrado ser aisladas de diferentes tejidos como medula ósea, musculo, líquido sinovial, dermis, tejido adiposo y sangre de cordón umbilical. [16, 17]. La Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC) ha propuesto a la comunidad científica tres criterios para la identificación de Células Estromales Mesenquimales: primero, las CEM deben ser adherentes al plástico en cultivos *in vitro* con morfología fibroblastoide; segundo, expresar antígenos de superficie como CD105, CD73 y CD90, en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34; y tercero, las CEM deben diferenciarse a osteoblastos, adipoblastos y condroblastos bajo condiciones de cultivos *in vitro* [18].

El primer criterio establecido por la SITC es demostrar la adherencia selectiva de estas células a las superficies plásticas en cultivos *in vitro*, que puede estar influenciado por la carga iónica, el pH y la temperatura [19].

Con respecto a su caracterización inmunofenotípica, es relevante la expresión de marcadores de superficie como CD105, CD73, CD90 y en ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45 y CD34. La molécula CD105 es una proteína transmembranal también llamada endoglobina, que

está conformada por un homo dímero de 180 kDa con enlaces disulfuro. Se ha encontrado en células endoteliales activadas, macrófagos, fibroblastos, y células de músculo liso. También hace parte del complejo receptor del (TGF)- $\beta$ , una citoquina implicada en la proliferación, diferenciación y migración celular [20]. También la molécula CD73 5'-nucleotidasa (5'-NT), una proteína de 70 KDa, unida a una molécula glicosil-fosfatidilinositol (GPI) en la membrana de las células; su función principal es la conversión de ATP y GTP para ser utilizado como fuente de energía [21].

Finalmente otra de las características que define SITC es su capacidad de diferenciación trilineal a adipocitos, condrocitos y osteocitos bajo condiciones de cultivo *in vitro*. La diferenciación osteogénica se caracteriza por la formación de depósitos de calcio y aumento en la expresión de la fosfatasa alcalina que es inducida por factores como la dexametasona,  $\beta$ -Glicerol fosfato ( $\beta$ -GP), ácido ascórbico y suero fetal bovino. La dexametasona regula la fosforilación de un residuo de serina de la proteína Runt 2 (Runx2), un gen regulador de la diferenciación osteogénica temprana que actúa sinérgicamente con TGF- $\beta$ , regulando la expresión de la interleucina 11 (IL-11) que reduce la adipogénesis, mientras promueve la diferenciación osteogénica y condrogénica [22] estimula la proliferación de las CEMs y permite la diferenciación hacia el linaje osteogénico. El  $\beta$  - glicerol fosfato ( $\beta$ -GP) , un fosfato orgánico, también da un soporte a la osteogénesis mediante el control de la mineralización y la actividad de los osteoblastos. Los fosfatos libres pueden inducir la expresión de mRNA y proteínas osteogénicas tales como la osteopontina. El ácido ascórbico desempeña un papel en el incremento de la actividad de la fosfatasa alcalina y promueve la producción de osteocalcina; particularmente, funciona como un cofactor en la hidroxilación de los residuos de prolina y lisina en el colágeno, e incrementa la síntesis de proteínas no colágenas de la matriz extracelular ósea [23].

En cuanto a la diferenciación adipogénica, esta es inducida en cultivos *in vitro*, por la exposición a la dexametasona que es un factor estimulante, que actúa a nivel celular sobre el factor de transcripción C/EBP $\delta$  que induce la expresión de C/EBP $\alpha$  y PPAR- $\gamma$ , los cuales permanecen elevados durante el proceso de diferenciación promoviendo la expresión de marcadores de diferenciación [24], también la isobutamildexametasona es un inductor de adenosin monofosfato cíclico (cAMP) el cual inicia la adipogénesis mediante la activación temprana de C/EBP (Proteína de unión a un elemento de respuesta a cAMP) que participa en la inducción de la expresión del factor de transcripción C/EBP $\beta$  necesario para el proceso de diferenciación, y la insulina promueve la adipogénesis por supresión de la actividad inhibitoria del factor de transcripción *Protein box forkhead O1* (FoxO1) [25] .

Las CEM también pueden ser inducidas a linaje condrogénico mediante la exposición de factores exógenos o por medios de cultivo que contienen TGF- $\beta$ 1 es un potente inductor de la condrogénesis, involucrado en la activación de varias vías de señalización como MEK/ERK que regulan la proliferación y diferenciación de las CEMs ; estas proteínas quinasas de señalización intracelular, están involucradas en el control de muchos procesos celulares fundamentales, que incluyen la diferenciación celular, y desempeña un papel importante en la transcripción de genes,

que codifica para Col2a, agregán, Sox9 y Ihh marcadores importantes de la matriz extracelular del cartílago[26].

### **3.2 El uso de las plaquetas en la regeneración tisular:**

El Plasma rico en plaquetas (PRP) ha surgido recientemente como una herramienta biológicamente potencial para tratar trastornos de cicatrización de tejidos, regeneración ósea y regeneración del tejido cartilaginoso [27]. Al parecer el potencial regenerador del PRP se basa en la liberación de factores de crecimiento que se produce con la activación y ruptura de las plaquetas, proporcionando una ventaja significativa, en las aplicaciones de ingeniería de tejidos por ser un tratamiento de naturaleza autóloga.

#### **3.2.1 Antecedentes experimentales**

##### ***3.2.1.1 Estudio del plasma rico en plaquetas.***

Inicialmente, los concentrados de plaquetas eran utilizados en medicina transfusional para el tratamiento y prevención de hemorragias, asociadas a patologías como trombocitopenia grave, aplasia medular, leucemias agudas o en una significativa pérdida durante cirugías de larga duración [28]. Se considera que un concentrado de plaquetas, contiene alrededor de  $0,5 \times 10^{11}$  Plaquetas/unidad, obtenido de un donante [29].

Se han identificado que las plaquetas liberan sustancias que promueven la reparación de tejidos, éste hecho significa que su uso podría tener un efecto positivo en situaciones clínicas que requieran una rápida cicatrización de tejidos [30]. Su administración como, coagulo de fibrina, proporciona un soporte adhesivo que favorece la curación y regeneración de tejidos [31]. En la actualidad, el uso de geles de fibrina a partir del plasma humano se han utilizado ampliamente en procedimientos de cirugías cardiovasculares, ortopédicas y maxilofaciales[32].

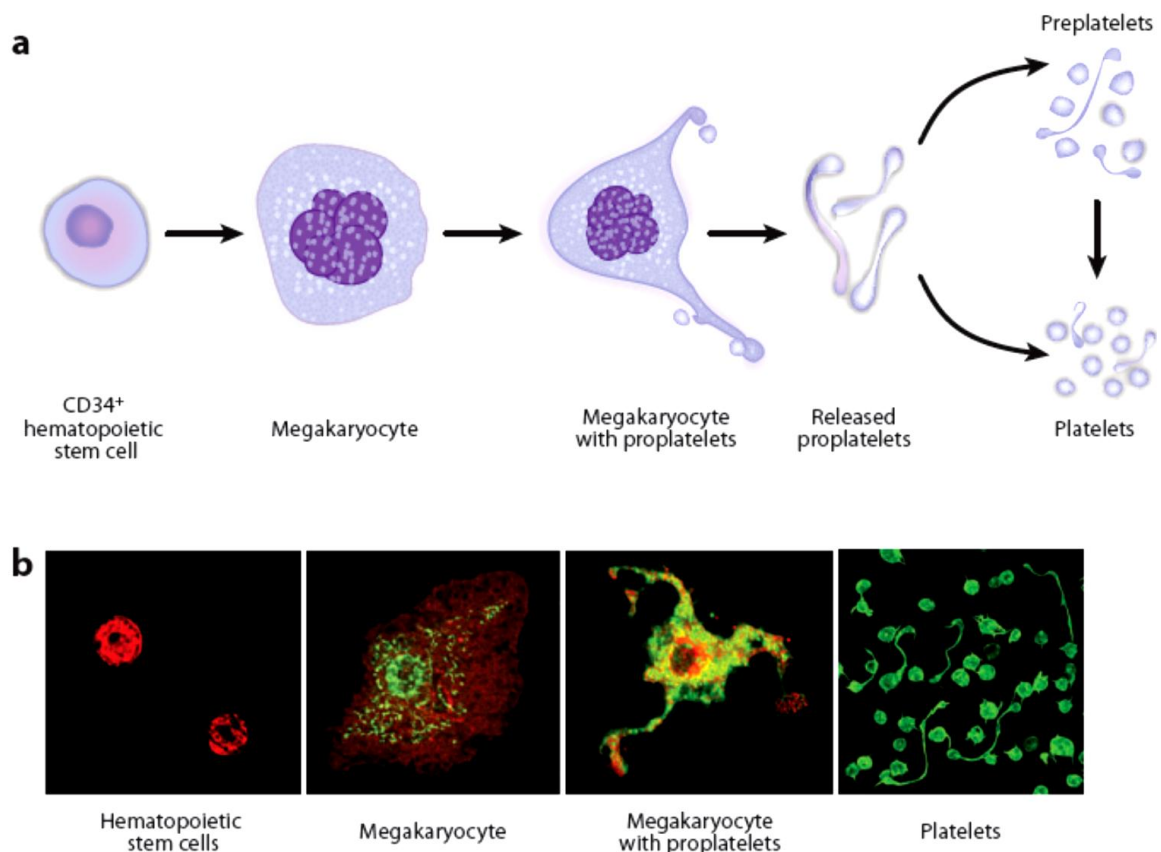
Diversos estudios sobre el uso del PRP en la reparación de fracturas en cirugías ortopédicas y maxilofaciales; han demostrado que la adición del PRP a los injertos óseos mejoran la densidad y la regeneración del tejido óseo, atribuido a los factores de crecimiento liberados por la activación plaquetaria, estimulando una mayor osteogénesis y aumentando la formación del tejido óseo [33].

Otros autores, han sugerido además que el PRP mejora la cicatrización de las heridas en los replazos totales de rodilla y puede mejorar la cicatrización en los desgarros del manguito rotador tratados quirúrgicamente [34, 35].

### 3.2.1 Plasma rico en plaquetas.

#### 3.2.1.1 Las plaquetas

Las plaquetas o trombocitos son fragmentos citoplasmáticos pequeños irregulares, anucleados de tamaños entre 2 a 3µm, en forma discoide derivadas de los megacariocitos multinucleados ubicados en la medula ósea (**FIGURA 1**), circulan en la sangre de 7 a 10 días en concentraciones de 150 a 450 x10<sup>3</sup> µL [36]. Fueron descubiertas por primera vez por Max Schultze, un anatomista alemán quien las describió como “esferulas” de un tamaño mas pequeños que los eritrocitos, que en ocasiones se agrupaban.



**FIGURA 1.** Trombopoyesis (formación de las plaquetas) (a) intermedios celulares en la trombopoyesis. (b) Microfotografías de las células involucradas en la trombopoyesis (células madre hematopoyéticas, megacariocitos, megacariocitos con proplaquetas, plaquetas). Tomado de: [37].

Las plaquetas juegan un papel en la hemostasia y son una fuente natural de diversos factores de crecimiento, Aunque estas células son anucleadas no poseen ADN nuclear, pero se ha descubierto que posee pequeñas cantidades mRNA derivados de los megacariocitos, ellas también contienen retículo endoplasmático rugoso y polirribosomas por lo que se le atribuye la capacidad de la biosíntesis de proteína[36, 38], ellas están constituidas por una bicapa lipídica con glicoproteínas

que funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas (ADP, TXA<sub>2</sub>, trombina), proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina laminina, trombospondina, vitronectina, factor de von Willebrand) y ligandos fibrosos como el colágeno, también poseen enzimas, integrinas y fosfolípidos [39]. Ellas en su interior poseen organelos como microtubulos y vesículas de secreción como son los  $\alpha$ -gránulos, gránulos densos y lisosomas [40]. Los gránulos alfa son los más abundantes en las plaquetas, se estima que contienen entre 40 – 80 gránulos -  $\alpha$  por plaquetas, que varían de tamaño de 200 a 500 nm y que constituyen entre el 10 – 15% del volumen de las plaquetas, contienen factores de crecimiento como PDGF-A, PDGF-AB, IGF-I, EGF, VEGF, TGF- $\beta$ 1 y proteínas como factor de Von Willebrand y trombina. Sus gránulos densos se caracterizan por su alto contenido en calcio y fósforo orgánico, ATP, ADP [39]. Gracias a que las plaquetas son una fuente de diversos factores de crecimiento, han sido muy estudiadas y utilizadas como co-adyuvantes en la medicina regenerativa.

El PRP, definido como el plasma enriquecido con niveles altos de plaquetas en relación a la sangre completa. Está compuesto por una fracción de suero, leucocitos plaquetas y una alta concentración de factores de crecimiento, lo cual ha hecho que el PRP sea una alternativa nueva para tratamientos de regeneración tisular como ligamentos, cartílago y tejidos musculoesqueléticos. Muchos de estos tejidos tienen una limitada capacidad de autorenovación, atribuido a su poca irrigación sanguínea, y a su limitada restauración de la matriz extracelular; debido a que el PRP contiene altas concentraciones de factores de crecimiento como: factor de crecimiento de origen plaquetario (PDGF), el factor de crecimiento de transformación-beta (TGF-beta), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), estudios previos han sugerido que estos factores estimulan la neovascularización y aumentan el suministro de sangre y nutrientes necesarios para promover la regeneración tisular [36].

El PRP es obtenido a partir de sangre total, a través de un proceso que utiliza el principio de la separación celular por centrifugación diferencial, que separa los componentes de la sangre, distribuidos en la parte inferior los glóbulos rojos, que se mantendrán como la capa de células empaquetadas, seguido de la capa de glóbulos blancos se encuentran en la parte superior de la capa de los eritrocitos y las plaquetas que son las de mayor concentración en el plasma se ubican justo por encima de la capa leucocitaria, [41].

Muchos de estos sistemas varían en la eficiencia para obtener un concentrado de plaquetas; en la repetitividad del procedimiento, recuento de leucocitos final y activación plaquetaria [36], además se han estudiado variables que no dependen del sistema de separación celular, si no del donante y puede existir una variabilidad en el número de plaquetas, leucocitos, eritrocitos que se le ha atribuido en parte aun sin número de factores: inflamación (leucocitosis o leucopenia), lipemia (que aumenta concentración plaquetas en número y esta influenciada en la dieta), hematocrito (género) [42], por esto un buen control de calidad en los procedimientos para la obtención del PRP como el recuento inicial de plaquetas, cuadro hemático del donante de sangre nos ayudaran a obtener un buen concentrado de plaquetas.

### **3.2.2 Lisado plaquetario**

Las plaquetas son conocidas por liberar una alta concentración de factores de crecimiento cuando son activadas, promoviendo la angiogénesis, migración celular, proliferación y diferenciación celular, efectuando una rápida y eficaz cicatrización de los tejidos; se ha demostrado que al inducir la lisis de las plaquetas se obtiene una mayor concentración de factores de crecimiento que cuando se induce su activación *in vitro* [43].

El lisado plaquetario se obtiene a partir de la ruptura de la membrana celular de las plaquetas por ciclos alternados de congelación y descongelación con el propósito de obtener la mayor cantidad de factores de crecimiento, seguido de una centrifugación rápida para eliminar los fragmentos de las plaquetas, obteniendo así un plasma con una concentración alta de factores de crecimiento.

### **3.3 Relación entre el PRP y CEM en la regeneración tisular.**

Las CEM son células pluripotentes que se diferencian hacia diversos linajes como condrocitos, osteocitos, adipocitos [44], además de sus propiedades biológicas como autorenovación, plasticidad y regeneración tisular [45], estas células se pueden aislar de tejido adiposo, medula ósea y sangre de cordón umbilical. Debido a su fácil aislamiento, cultivo y manipulación, han hecho de ellas una posible terapia útil en medicina regenerativa y en patologías como la osteoartritis y defectos osteocondrales [45].

Muchas de estas enfermedades degenerativas tienen un sin número de desventajas en cuanto a su tratamiento, debido a que el tejido afectado, presenta una limitada autorreparación; como por ejemplo, el cartílago que es un tejido que no posee irrigación sanguínea, nerviosa, ni linfática, conformado por condrocitos y que esta presente en la superficie de muchas articulaciones del cuerpo humano. Han hecho que sus tratamientos estén limitados al manejo del dolor, pero no a la regeneración completa del tejido, siendo la única opción el remplazo parcial o total de muchas articulaciones.

Debido a esto, se han estudiado algunos tratamientos para estimular su reparación; ya que los condrocitos son las células responsables de la producción, organización y mantenimiento de la matriz extracelular del cartílago articular [46], inducir la condrogénesis en el trasplante de CEM en el espacio articular es un tratamiento esperanzador para pacientes con degeneración de cartílago articular. Muchos estudios han descrito la importancia de mantener un microambiente óptimo para las CEM, para inducir la condrogénesis *in vitro*, esto implican varios factores de crecimiento como el TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante beta) que son liberados con la activación plaquetaria [20].

*Li, J et al* describieron la función (TGF- $\beta$ ) en algunas vías de señalización como MEK/ERK que regulan la proliferación y diferenciación de las CEM, se describió que estas proteínas quinasas, están involucrados en el control de muchos procesos celulares fundamentales que incluyen la proliferación celular, la supervivencia y diferenciación celular. [26, 47]

Iwai et al, en un estudio desarrollado con porcinos evaluaron la regeneración de cartílago usando Células Estromales Mesenquimales sobre discos osteocondrales con desgaste de tejido cartilaginoso trasplantados con o sin factores de crecimiento y concluyeron que las células mesenquimales, al ser estimuladas con diferentes factores de crecimiento, generaban una mayor condrogénesis y un aumento en la regeneración de cartílago en los discos osteocondrales, evidenciándose los condrocitos por cortes histológicos [48]. El éxito de los tratamientos de regeneración de tejidos puede mejorar con la adición de complementos (factores de crecimiento) que aumentan la proliferación y diferenciación de las células progenitoras (Células Estromales Mesenquimales); el regenerativo potencial del PRP probablemente se basa en la liberación de factores de crecimiento que se produce con la activación y la ruptura de las plaquetas.

Basándose en esta teoría, se han desarrollado diferentes estudios con el PRP para evaluar su efecto sobre la regeneración de cartílago; *Sun, Y et al*, evaluaron el efecto del plasma rico en plaquetas sobre los defectos del cartílago articular en un modelo de conejo; se observó que en las condiciones donde se adicionó el PRP a los defectos osteocondrales, se desarrolló una mayor formación, de tejido cartilaginoso, con acumulación de matriz extracelular y colágeno tipo II; sin embargo, cuando el plasma rico en plaquetas (PRP) no se utilizó, el tejido regenerado se volvió hacia fibrocartílago con poca formación de la matriz extracelular cartilaginosa detectado por examen histológico [49, 50].

El primer caso reportado de un trasplante autólogo de CEM en una rodilla humana adulta se publica en Estados Unidos, en un paciente de 36 años que se le diagnostica degeneración y adelgazamiento en la superficie condral femoral medial y meniscos de su rodilla derecha; donde el paciente se sometió durante casi 6 meses al tratamiento, reportando mejoría en su dolor y aumento del volumen del cartílago del menisco observado por resonancia magnética, después de tres meses de la intervención, el paciente aún sigue en estudio ya que no se sabe con claridad si el aumento de volumen fue por fibrocartílago o cartílago, ya que el paciente no se le efectuó ningún otro estudio complementario [51].

Con base en los estudios presentados anteriormente, con el presente trabajo se quiere evaluar el efecto del PRP sobre la condrogénesis a partir de las Células Estromales Mesenquimales humanas, como un modelo para entender el papel que ejerce el PRP y poder de esta manera generar una alternativa de tratamiento futuros en la regeneración de cartílago.



## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del plasma rico en plaquetas en la inducción de la diferenciación condrogénica a partir de Células Estromales Mesenquimales.

### 4.2 Objetivos Específicos

- 4.2.1. Estandarizar protocolo para la obtención del plasma rico en plaquetas a partir de sangre total humana.
- 4.2.2. Aislar y caracterizar Células Estromales Mesenquimales (CEM) de medula ósea humana (inmunofenotipo y diferenciación trilineal)
- 4.2.3. Evaluar la proliferación de CEM expuestas a plasma rico en plaquetas y Lisado plaquetario por medio de la incorporación de Carboxifluoresceína Diacetato Succinil Ester (CFSE) y evaluación por citometría de flujo.
- 4.2.4. Evaluar la viabilidad celular de Células Estromales Mesenquimales humanas expuestas a PRP, LP, SFB y mediante el uso de la *Tinción supravital LIVE/DEAD AQUA. (L34957 invitrogen)*.
- 4.2.5. Evaluar la diferenciación condrogénica a partir de CEM expuestos a PRP, LP mediante el uso de medios selectivos para su diferenciación. (STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit Ref. A1007101)

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Estandarización protocolo para la obtención del PRP y LP a partir de sangre total humana.**

Para establecer una concentración óptima de plaquetas (PRP), se realizó una extracción de sangre por venpunción, con un volumen promedio de 8 ml en citrato de sodio 3.8 % (Tubos vacutainer. BD Bioscienc<sup>®</sup>) a partir de donantes voluntarios entre (18 – 30 años), que aceptaron previamente el consentimiento informado **ANEXO 1**. Después de obtenida la muestra, se realizó un recuento inicial de plaquetas y se centrifugó a 1200 rpm durante 8 minutos a temperatura ambiente, se separó el plasma en eppendorf de plástico estériles, para luego realizar una segunda centrifugación a 3600g por 15 minutos , descartando el sobrenadante para la obtención del pellet con un volumen final de 350 µl de PRP . Posteriormente se realizo un recuento plaquetario que debía estar entre 3 a 5 veces por encima de su análisis basal en sangre total.

#### **5.1.1 Lisado plaquetario**

Después de la obtención del PRP, se realizaron ciclos de congelación (-20°) – descongelación (37° baño serológico), 3 veces, posteriormente para remover los fragmentos de plaquetas se centrifugó a 4000g durante 15 minutos a 4°C y luego se obtuvo el sobrenadante, realizando un recuento final.

### **5.2. Aislamiento y cultivo de CSM de MO**

Las CEM son obtenidas de medula ósea de pacientes sometidos a cirugía de remplazo total o parcial de cadera que asisten al departamento de Ortopedia del Hospital San Ignacio, con previa aceptación del consentimiento informado **ANEXO 2**. Los criterios de inclusión de los donantes voluntarios son pacientes que no presenten enfermedades neoplásicas asociadas con el sistema hematopoyético, tratados con terapia biológica inmunomoduladora, con edades entre los 18 a 80 años.

Las muestras obtenidas de rimado y/o médula, se recolectó en un tubo estéril con EDTA 0.25% durante el proceso quirúrgico y transportadas al laboratorio de Hematología de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana. Las muestras de medula ósea recolectadas fueron procesadas en esterilidad mediante la maceración y filtrado en una gasa estéril para luego realizar la separación de células mononucleares (CMNs) por gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Histopaque d=1.077g/cm<sup>3</sup>, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), luego se determinó la viabilidad celular mediante el uso del colorante de exclusión de azul de tripano 0.05%. Las CEM obtenidas, se cultivaron en cajas de 75cm<sup>2</sup> con medio RPMI1640 + Glutamax (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% ,1% de aminoácidos no esenciales ,1% de piruvato de sodio (S8636, Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), 0.5% de penicilina-estreptomina y 0.1% de ciprofloxacina, y se incubaron a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

Después de 72 horas de incubación, se retiraron las células no adherentes con morfología fibroblastoide , realizando cambio de medio cada tercer día, cuando las células alcancen el 80% de confluencia aproximadamente ,se realizaron pases celulares por medio de la tripsinización

(Tripsina 0.25% y EDTA 1 mM ), la tripsinización fue desarrollada retirando el medio de cultivo, lavando las células con PBS1X + Antibiótico , luego se le adiciono la solución de tripsina preparada y filtrada adecuadamente durante 5 minutos a 37°C; transcurrido ese tiempo se procedió a inactivar la tripsina adicionando medio IMDM en igual volumen, adicionado de solución de tripsina y EDTA. Posteriormente se centrifugó las células desprendidas 900g durante 10 minutos a temperatura ambiente, luego se realizaron recuentos en cámara de Neubauer y viabilidad celular con azul tripan al 0.05%.

### **5.3 Caracterización *in vitro* de CEM de MO según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular.**

La caracterización *in vitro* de CEM se realizó según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society Cellular Therapy, SITC*) [18], inicialmente por su adherencia al plástico y morfología fibroblastoide *in vitro* con el microscopio invertido Olympus (objetivo 10X), seguido por la evaluación de expresión de antígenos como CD105, CD73, en ausencia de expresión de marcadores hematopoyéticos como CD34 y CD45 por citometría de flujo. La determinación del inmunofenotipo se realizó utilizando anticuerpos monoclonales, **Tabla 1**.

**TABLA 1:** Anticuerpos y Fluorocromos utilizados en la caracterización *in vitro* de las CEM.

<b>ANTICUERPO</b>	<b>CLONA</b>	<b>FLUOROCROMO</b>	<b>N° Catalogo</b>
<b>Anti-CD34 (Miltenyi Biotec)</b>	AC136	Alofocianina (APC)	555824
<b>Anti- CD45 (Becton Dickinson)</b>	2D1	Proteína Clorofila Peridina. (PerCP)	347464
<b>Anti- CD105 (Invitrogen)</b>	SN6	Ficoeritrina (PE)	0606
<b>Anti-73 (BD Biosciences)</b>	AD2	Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	561254

### **5.4 Evaluación de las características morfológicas.**

La morfología fibroblastoide inicial se evaluó mediante microscopía invertida. Con la técnica de citología *Cytospin* (Shandon Cytospin 3) se realizaron los análisis de las características morfológicas de las Células Estromales Mesenquimales, por medio de la tinción de Wright.

## **5.5 Diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de Células Estromales Mesenquimales.**

### **5.5.1 Diferenciación Osteogénica:**

La diferenciación osteogénica fue inducida cultivando 10.000 Células Estromales Mesenquimales aisladas de medula ósea en un pozo de 2 cm<sup>2</sup> con un volumen de 1 ml de medio de cultivo STEMPRO® Osteogenesis Differentiation Kit Ref. A1007201 (InvitroGen, 2008) **ANEXO 3**, se realizaron cambios de medio cada 4 días hasta completar 21 días en diferenciación celular, luego se realizó una evaluación de la diferenciación mediante el reconocimiento de depósitos de calcio por medio de la tinción de Von kossa. La tinción de Von Kossa contiene nitrato de plata 1%, tiosulfato sódico 5%, y nuclear fast red 0,1%; para el procedimiento las células se incubaron con nitrato de plata al 1% durante 20 minutos en luz ultravioleta seguido de un lavado con agua destilada, luego se realizó una incubación con tiosulfato sódico 5% durante 5 minutos y un lavado con agua destilada, y finalmente una incubación con nuclear fast red 0,1% durante 5 minutos y un lavado con agua destilada, después de este procedimiento se observaron las células en el microscopio invertido identificando los depósitos de calcio de color amarillo.

### **5.5.2 Diferenciación Adipogénica:**

La adipogénesis fue inducida cultivando 2.000 células en un pozo de 2 cm<sup>2</sup> con un volumen de 1 ml de medio de cultivo STEMPRO® Adipogenesis Differentiation Kit Ref. A1007001 (InvitroGen, 2008) **ANEXO 4**, se realizaron cambios de medio cada 4 días hasta completar 14 días en diferenciación, la diferenciación fue evaluada mediante la coloración de las vacuolas lipídicas con sudan negro que contenía sudan negro 0,5% y rojo neutro 1%. Para el procedimiento las células fueron fijadas con formalina por 30 minutos, luego se realizaron lavados con agua destilada y un lavado con propilenglicol al 100% durante 3 minutos, seguido de una incubación con sudan negro durante 5 minutos, después se realizó un lavado con propilenglicol al 85% por 2 minutos y con agua destilada, luego se realizó una incubación con rojo neutro 1% durante 2 minutos y un lavado con agua destilada, después de este procedimiento se observaron las células en el microscopio invertido identificando las vacuolas lipídicas teñidas de azul dentro de las células.

### **5.5.3 Diferenciación Condrogénica:**

La diferenciación condrogénica fue inducida cultivando 10.000 células en un pozo de 2 cm<sup>2</sup> con un volumen de 1ml medio de cultivo, STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit Ref. A1007101, (InvitroGen, 2008) **ANEXO 5**, se realizaron cambios de medio cada 3 días hasta completar 14 días en diferenciación celular, luego se realizó una evaluación de la diferenciación mediante el reconocimiento de proteoglicanos por medio de la tinción de Safranina O al 1%. Para el procedimiento las células se fijaron con formalina al 10% durante 5 minutos seguido de tres lavados con PBS1X, se incubaron con safranina O al 1%, diferenciación celular, luego se realizó una evaluación de la diferenciación mediante la tinción de Safranina "O" un colorante catiónico que se une a los grupos carboxilo y sulfato de los glucosaminoglicanos, los cuales son estructuras

terminales de los proteoglicanos como el agregano un componente esencial del cartílago. Para el procedimiento de la tinción de Safranina "O" las CEM se fijaron con formalina al 10% durante 5 minutos seguido de tres lavados con *Phosphate Buffered Saline* (PBS1X), se incubaron con safranina "O" al 1% durante 3 minutos y finalmente se realizó tres lavados con PBS1X, se retiró el exceso. Después de este procedimiento se observaron las células al microscopio invertido identificando los proteoglicanos de color rojo intenso.

### **5.6 Evaluación de la proliferación de CEM expuestas a plasma rico en plaquetas mediante la incorporación de Carboxifluoresceina Diacetato Succinil Ester (CFSE).**

Las CEM aisladas y caracterizadas fueron marcadas previamente con 2 uM de Carboxifluoresceina Diacetato Succinil Ester (CFSE) (C34554, Invitrogen) durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, luego de 3 lavados con 10 ml de PBS 1x con 5% de SFB a 1800 rpm durante 5 minutos, posteriormente se colocaron en placas de 24 pozos por triplicado a una concentración de  $1 \times 10^4$ /ml CEM (entre segundo y quinto pase después de su aislamiento). Después de 24 horas de adheridas las células, con medio base RPMI 1640 (Gibco®), 1% de aminoácidos no esenciales (M111140 -MEM NEAA 100X, Gibco®), 1% de piruvato de sodio (S8636, Sigma-Aldrich®). Se adiciono los suplementos SFB 10%, PRP 10%, LP 10% a 37°C en 5% de CO2 durante 7 y 15 días.

Las células CEM fueron cultivadas en tres condiciones experimentales:

- **Condición SFB 10 %:** CEM + Suero fetal bovino (SFB) Hyclone
- **Condición PRP 10%:** CEM + Plasma rico en plaquetas (Donantes voluntarios Laboratorio Hematología PUJ).
- **Condición LP 10%:** CEM + Lisado plaquetario.

Luego del tiempo de incubación las CEM fueron retiradas de cada pozo por pipeteo repetitivo y llevadas hacer analizadas, para evaluar la disminución media de fluorescencia por citometría de flujo en FACS Aria II. Los datos son adquiridos y analizados por Flow Jo (BD Bioscience (BD)) versión 7.6.5, con la herramienta proliferación analizando los índices de proliferación, y el número de divisiones celulares por generación.

### **5.7 Evaluación de la viabilidad celular de CEM humanas expuestas a PRP, LP, SFB mediante el uso de la Tinción supravital LIVE/DEAD AQUA. (L34957 invitrogen)**

Las CEM aisladas y caracterizadas fueron sembradas en una placa de 24 pozos por triplicado a una concentración de  $1 \times 10^4$ /ml (entre segundo y quinto pase después de su aislamiento). Después de 24 horas de adhesión, con medio base RPMI 1640 (Gibco®), 1% de aminoácidos no esenciales (M111140 -MEM NEAA 100X, Gibco®), 1% de piruvato de sodio (S8636, Sigma-Aldrich®). Se adicionó los suplementos SFB 10%, PRP 10%, LP 10% a 37°C en 5% de CO2 durante 7 y 15 días. Luego del tiempo de incubación las CEM fueron retiradas de cada pozo por pipeteo repetitivo y marcadas con LIVE/DEAD AQUA. (L34957 invitrogen) durante 20 min a temperatura ambiente en oscuridad,

luego de 1 lavado con 2 ml de Buffer de Citometría (Azida de sodio 0,02%, PBS 1X, SFB 1%) fueron llevadas a ser analizadas para evaluar la viabilidad celular por citometría de flujo en FACS Aria II. Los datos fueron adquiridos y analizados por Flow Jo.

### ***5.8 Evaluación de la diferenciación condrogénica de CEM expuestas a PRP y LP mediante el uso de medios selectivos para su diferenciación.***

La diferenciación condrogénica fue inducida cultivando 10.000 CEM (entre segundo y quinto pase después de su aislamiento) en un pozo de 2 cm<sup>2</sup> con un volumen de 1ml medio de base, STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit Ref. A10069-01, (InvitroGen, 2008) **ANEXO 5**, después de 24 horas de adheridas las células se le adiciono el suplemento en varias condiciones de cultivo.

Las células CEM fueron cultivadas en tres condiciones experimentales:

- **Condición Suplemento condrogénesis:** CEM 1x10<sup>4</sup>/ml + Medio base de condrogénesis + suplemento condrogénesis .STEMPRO® Condrogénesis Differentiation Kit Ref. A10064-01, (InvitroGen, 2008)
- **Condición PRP 10%:** CEM +Medio base de condrogénesis (STEMPRO®) + suplemento Plasma rico en plaquetas 10%(Donantes voluntarios Laboratorio Hematología PUJ.
- **Condición LP 10%:** CEM + +Medio base de condrogénesis (STEMPRO®) + suplemento Lisado plaquetario 10%.

El medio de cultivo fue cambiado cada 3-4 días hasta completar (14 días). Para comprobar la diferenciación de las Células Estromales Mesenquimales en condroblastos se realizara coloración de Safranina O. las células se fijaran durante 5 minutos con formalina, luego las células se lavan 3 veces con PBS 1X y se adiciona Safranina O 0.1% durante 3 minutos; por último se realiza un lavado con PBS 1X y se observan las células teñidas de rojo en el microscopio invertido.

### ***5.9 Análisis Estadísticos***

Para evaluar la normalidad de los datos, todas las variables cuantitativas fueron analizadas con el test de Shapiro Wilk. Según su distribución, se aplicaron pruebas para evaluar las diferencias entre variables con distribución normal (ANOVA de una vía) ó distribución no paramétrica (test Kruskal Wallis). Se consideró diferencias estadísticas con un valor de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

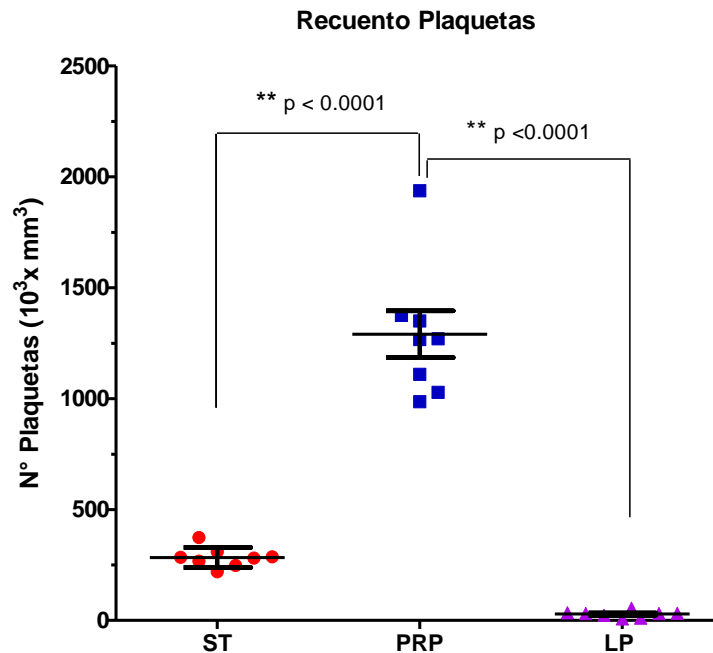
### 6.1 Protocolo obtención plasma rico en plaquetas a partir de sangre total humana.

El proceso se realizó a partir de 8 donantes voluntarios del laboratorio de hematología PUJ, entre las edades de 18 – 30 años, Genero (4 mujeres y 4 hombres), con un recuento inicial promedio ( $290 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) plaquetas, los datos se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Características de Muestras Recolectadas de Sangre total y Recuentos obtenidos en cada condición.**

MUESTRAS	EDAD DEL DONANTE EN AÑOS.	SEXO	RECuento PLAQUETAS ST ( $10^3/\text{mm}^3$ )	RECuento PLAQUETAS PRP ( $10^3/\text{mm}^3$ )	RECuento DE PLAQUETAS LP ( $10^3/\text{mm}^3$ )
1	23	F	281	1110	8
2	20	F	248	1375	11
3	24	F	310	1350	32
4	23	F	374	1937	56
5	24	M	287	1267	33
6	24	M	219	986	24
7	23	M	267	1270	32
8	23	M	285	1029	35

Posteriormente se implemento el protocolo para la obtención del PRP, establecido en materiales y métodos pagina (20). En la FIGURA 2 se muestran los recuentos obtenidos para cada condición.



**FIGURA 2. Recuento plaquetas.** Se presenta una grafica representativa de dispersión de puntos para cada una de las muestras obtenidas. Con una diferencia estadísticamente significativa cuando se compara el recuento plaquetarios de ST con PRP. \*\*p<0.0001 y PRP con LP, \*\*p<0.0001.

## 6.2 Aislamiento y caracterización Células Estromales Mesenquimales (CEM) de medula ósea humana (inmunofenotipo y diferenciación trilineaje).

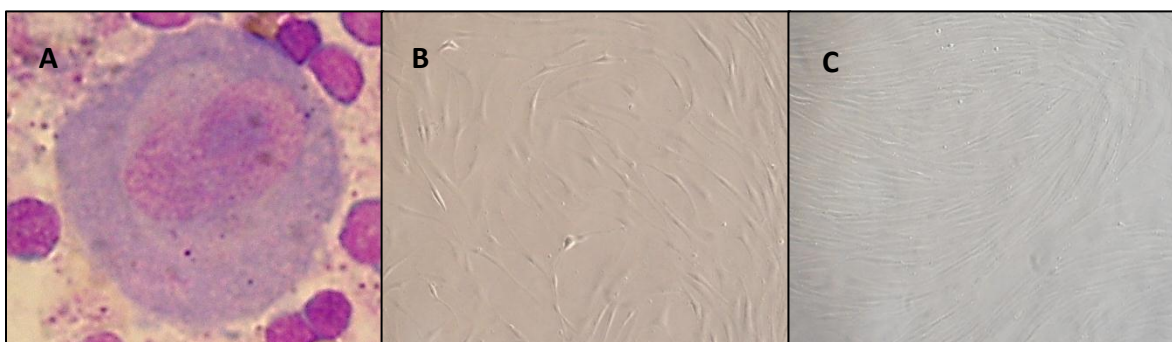
Las Células Estromales Mesenquimales (CEM) se aislaron de pacientes sometidos a cirugía de remplazo total o parcial de cadera que asisten al departamento de Ortopedia del Hospital San Ignacio, con previa aceptación del consentimiento informado, entre los 36 y 77 años de edad, con un volumen de muestra de recolección promedio de 39 ml, que incluyo MO y rimado acetabular. Las características de las muestras obtenidas de medula ósea se presentan en Tabla 3.

**TABLA 3. Características de Muestras Recolectadas de Medula ósea.**

MÉDULA	EDAD DE PACIENTE (AÑOS)	SEXO	VOLUMEN DE MUESTRA (ml)	RECuento DE CELULAS MONONUCLEARES
67	77	F	40	$14,550 \times 10^3 / \text{mm}^3$
68	38	M	50	$43,200 \times 10^3 / \text{mm}^3$
70	36	F	25	$45,575 \times 10^3 / \text{mm}^3$
71	51	F	40	$86,250 \times 10^3 / \text{mm}^3$

### 6.2.1 Evaluación de las características morfológicas.

Para la caracterización de las CEM de acuerdo con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SITC) [52] y con base a los resultados obtenidos en este proyecto, se realizó la caracterización de las CEM de acuerdo a sus características morfológicas: células con morfología fibroblastoide que se caracterizan por tener citoplasma de forma irregular con grandes prolongaciones citoplasmáticas observadas por microscopio invertido Olympus. También se encontró que por la técnica citológica *Cytopspin* las CEM poseen un núcleo redondo excéntrico, con cromatina parcialmente condensada, el citoplasma es ligeramente basófilo y agranular (FIGURA 3A) adherencia al plástico y morfología fibroblastoide (FIGURA 3B, 3C).

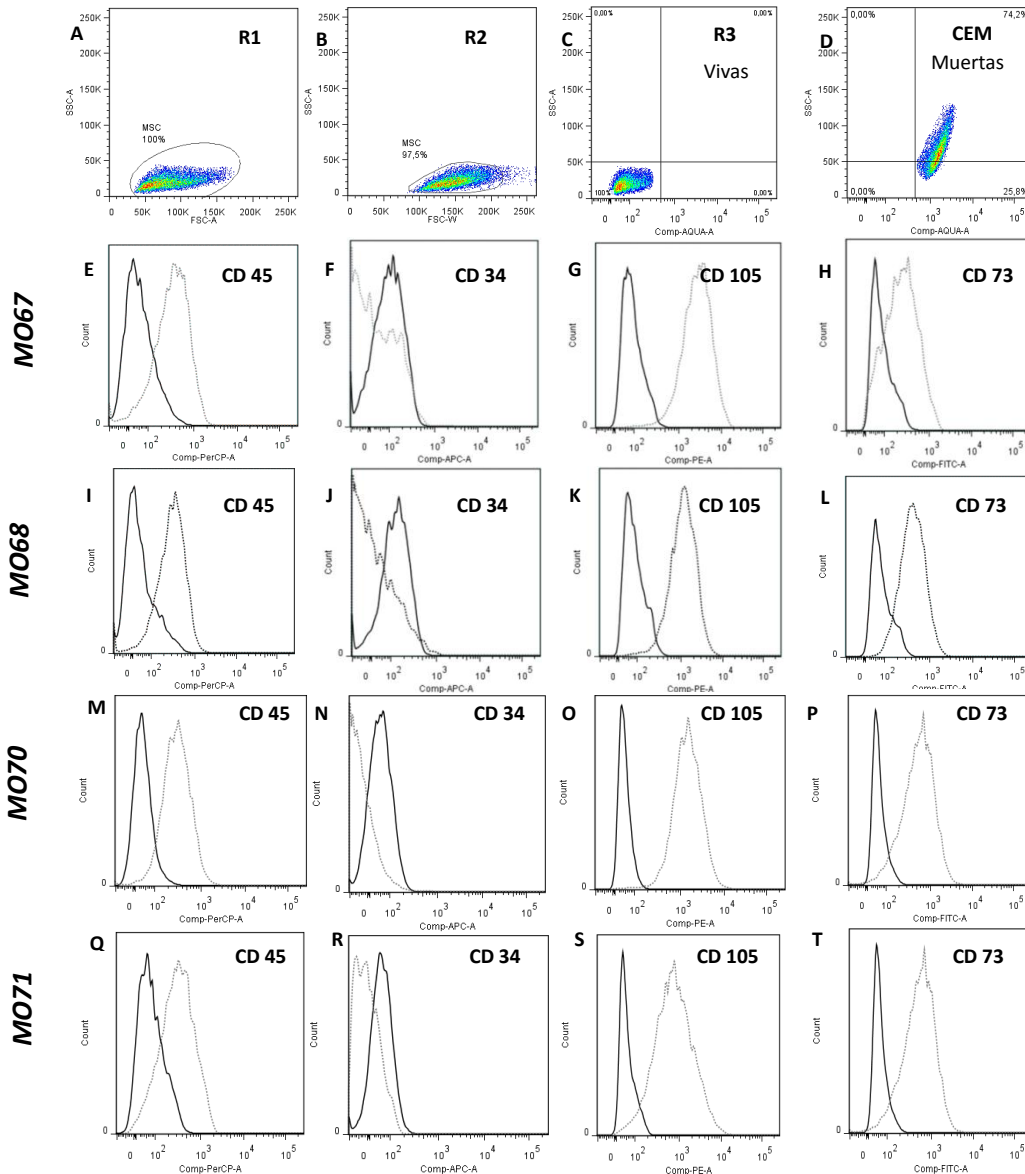


**FIGURA 3. Aislamiento y Caracterización de CEM de MO.** Se realizó la caracterización de las CEM según los criterios de la SITC. (2A) CEM en tercer pase de cultivo (Cythospin, coloración con Wright-Objetivo 100x). (2B) CEM en tercer pase de cultivo con morfología fibroblastoide (30% confluencia) (Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus) y (2C) CEM en tercer pase de cultivo (95% confluencia) (Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus).



## 6.2.2 Inmunofenotipo de CEM

Además de la caracterización morfológica de las CEM, se estableció el inmunofenotipo de los cultivos establecidos. En la FIGURA 3 se presentan los histogramas obtenidos a partir de los análisis por Flow Jo para cada uno de los antígenos evaluados en las CEM. Se observa la expresión positiva para los antígenos CD105, CD73 en ausencia de los antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45, según los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular SITC (FIGURA 4: Inmunofenotipo de CEM de MO).



**FIGURA 4. Inmunofenotipo CEM de MO.** (A) R1: Dot plot relacionado con tamaño y complejidad de CEM. (B) R2: Dot plot de CEM eliminación de dobletes. (D) Control de CEM muertas por AQUA. (C) R3: Control de CEM vivas por AQUA. La expresión de antígeno fue evaluada en la región R3 que corresponde a células vivas por AQUA con un tamaño y complejidad homogénea.

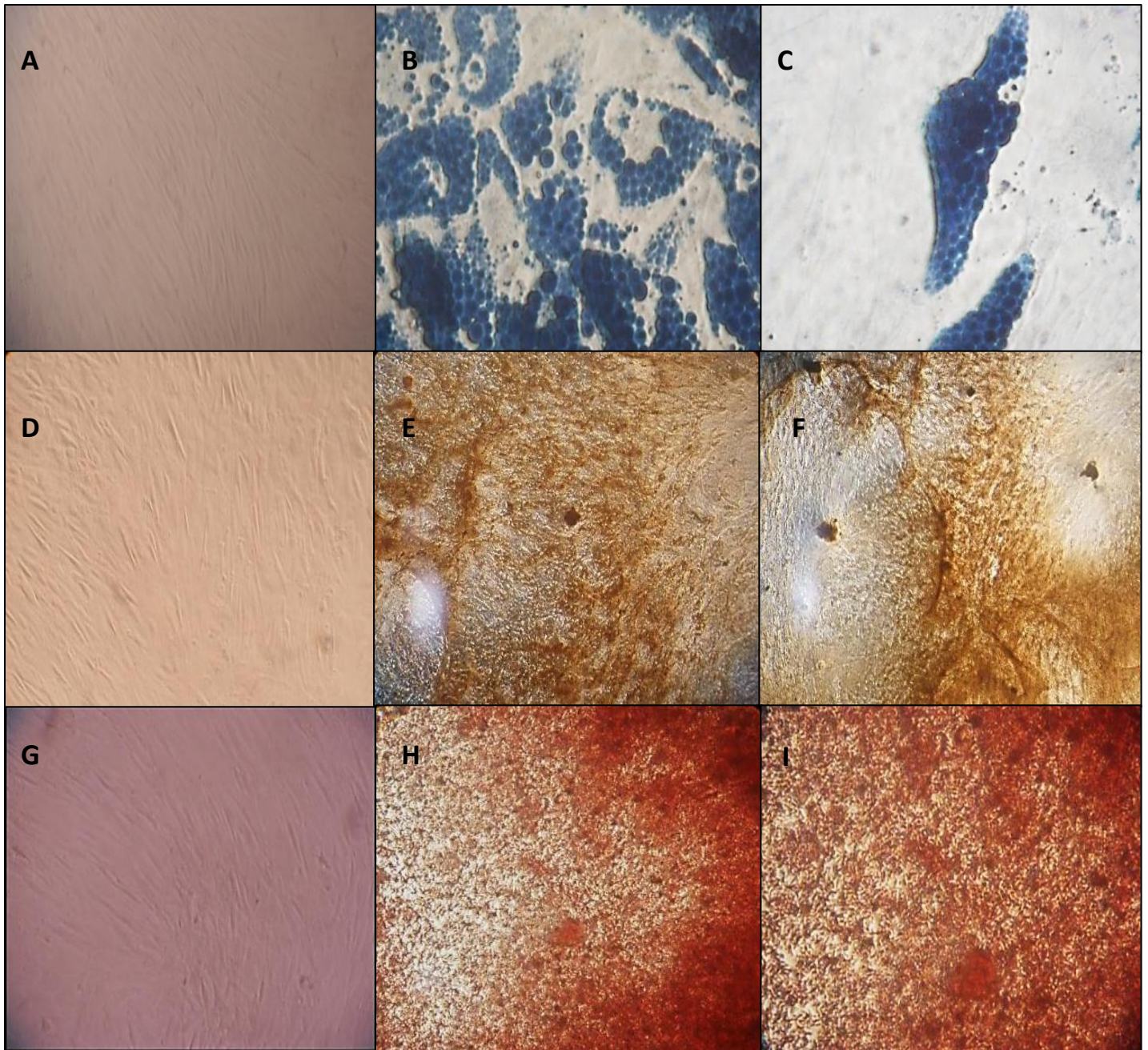
La línea punteada corresponde al antígeno evaluado y la línea continua corresponde al control de autofluorescencia. (E-H) Inmunofenotipo de la MO67, (I-L) Inmunofenotipo de MO68, (M-P) Inmunofenotipo de MO68, (M-P) Inmunofenotipo de la MO70, (Q-T) Inmunofenotipo de la MO71.

Se determinó la intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada proteína en tercer pase de cultivo. Se observaron diferencias estadísticamente significativa entre los antígenos hematopoyéticos (ANOVA una vía  $p < 0.0018$ ). Para confirmar estos datos se realizó una comparación del antígeno CD34 con el antígeno CD73 mostrando diferencias estadísticamente significativas (Test Independiente  $p < 0.0265$ ).

### **6.2.3 Diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica de CEM**

La capacidad biológica de las CEM de diferenciarse en células de linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico fue confirmado mediante las coloraciones sudan negro B, Tinción Von Kossa, Safranina O. La FIGURA 5B-C nos muestra las CEM diferenciadas a Adipoblastos, después de 14 días post- estimulación se evidencia la presencia de vacuolas teñidas de color azul que rodean el núcleo de las CEM, lo que nos indica positivas para la coloración Sudan negro B, un colorante soluble, tiene preferencia por los lípidos de varios tejidos. Las células CEM fueron inducidas a diferenciación osteogénica por 21 días; durante este tiempo, las células en presencia de los factores de diferenciación mostraron cambios morfológicos, presentando una forma celular estrellada con prolongaciones y de menor tamaño [53]. Se observaron pequeños nódulos de calcio a nivel extracelular, indicando el inicio de la calcificación de la matriz FIGURA 5E-F, siendo positivo para la tinción de von kossa.

La diferenciación condrogénica fue inducida por 14 días; las CEM presentaron cambios morfológicos pasando de fibroblastoide a una formación de nódulos condrogénicos, el cual es un acumulo de CEM, que gracias al estímulo de muchos factores permite su diferenciación a condroblastos células redondas, las cuales producen su propia matriz extracelular. Estas se pudieron evidenciar por medio de la tinción Safranina "O", diferenciación celular, luego se realizó una evaluación de la diferenciación mediante la tinción de Safranina "O" un colorante catiónico que se une a los grupos carboxilo y sulfato de los glucosaminoglicanos, los cuales son estructuras terminales de los proteoglicanos como el agregano un componente esencial del cartílago, estas se tiñeron de color rojo color rojo indicando la producción de matriz extracelular (FIGURA 5H-I). Por el contrario las células que fueron cultivadas con medio IMDM + SFB10% (control) no mostró formación de nódulos calcificados, vacuolas lipídicas, detección de proteoglicanos (FIGURA 5A-D).

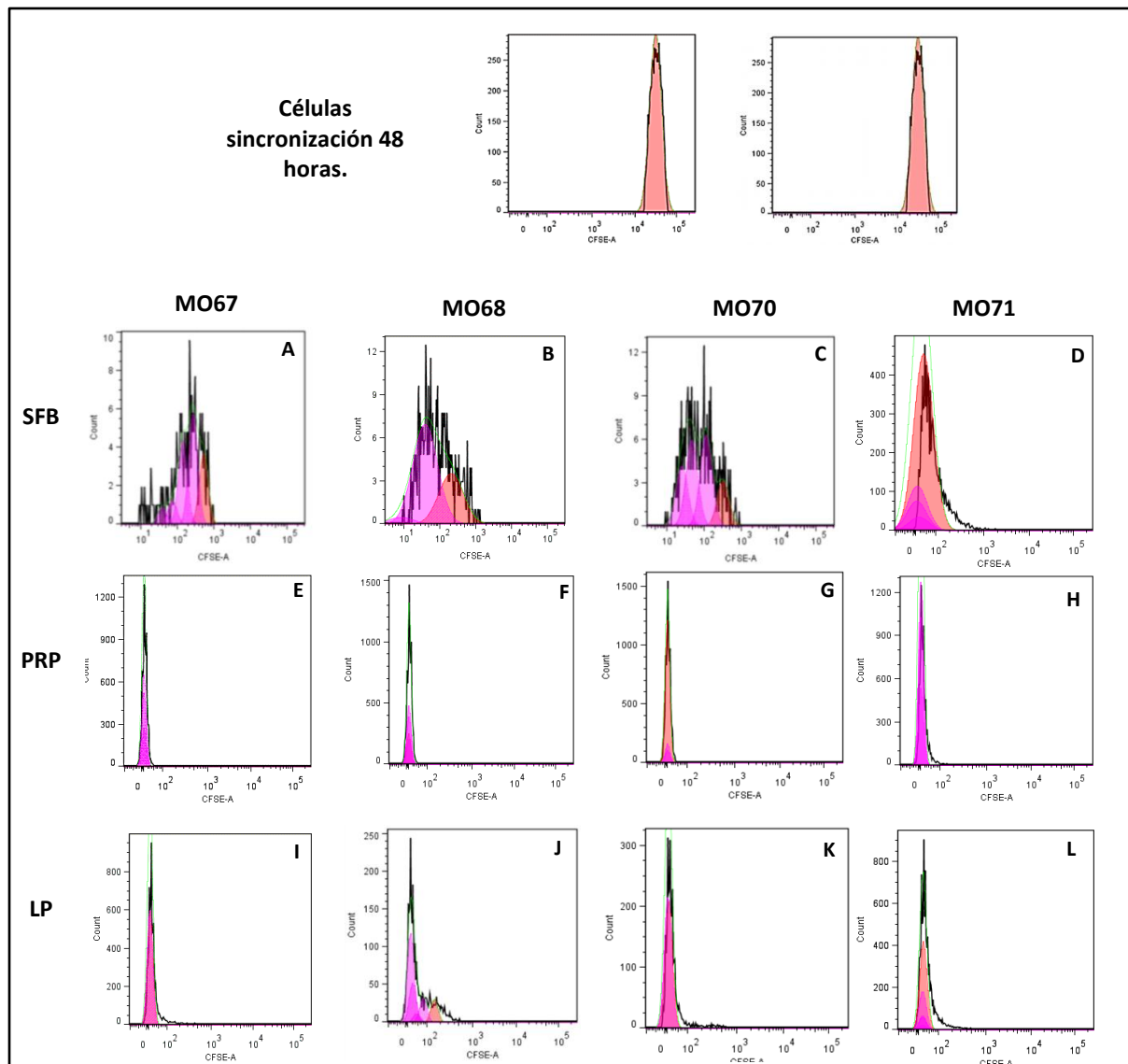


**FIGURA 5. Diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica.** Las CEM en segundo pase se sembraron en placas de 24 pozos, la inducción se inició mediante el cultivo de células en los medios de inducción osteogénica, adipogénica y condrogénica; la progresión de la diferenciación se confirmó mediante tinción histoquímica. Los marcadores para adipogénesis (Vacuolas lipídicas intracelulares), osteogénesis (Depósitos de calcio), y condrogénesis (Matriz extracelular), fueron revelados en los días 21 y 14 por Von Kossa, Sudan Negro y Safranina "O", respectivamente. (A) Diferenciación de MO67.

**6.3 Evaluación de la proliferación de CEM expuestos a PRP, LP, SFB por medio de la incorporación de Carboxifluoresceina Diacetato Succinil Ester (CFSE) y evaluación por citometría de flujo.**

Después de 7 días y 15 días de cultivo celular, se observó una mayor disminución en la intensidad de fluorescencia (IF) de CFSE en la población de CEM en cultivo celular en la condición “CEM +PRP 10%” y la condición “CEM +LP10%”, mientras que en la condición “CEM+SFB 10%” presentaron una disminución de la intensidad de fluorescencia (IF) de CFSE menor en comparación con el grupo PRP 10% y LP 10%.

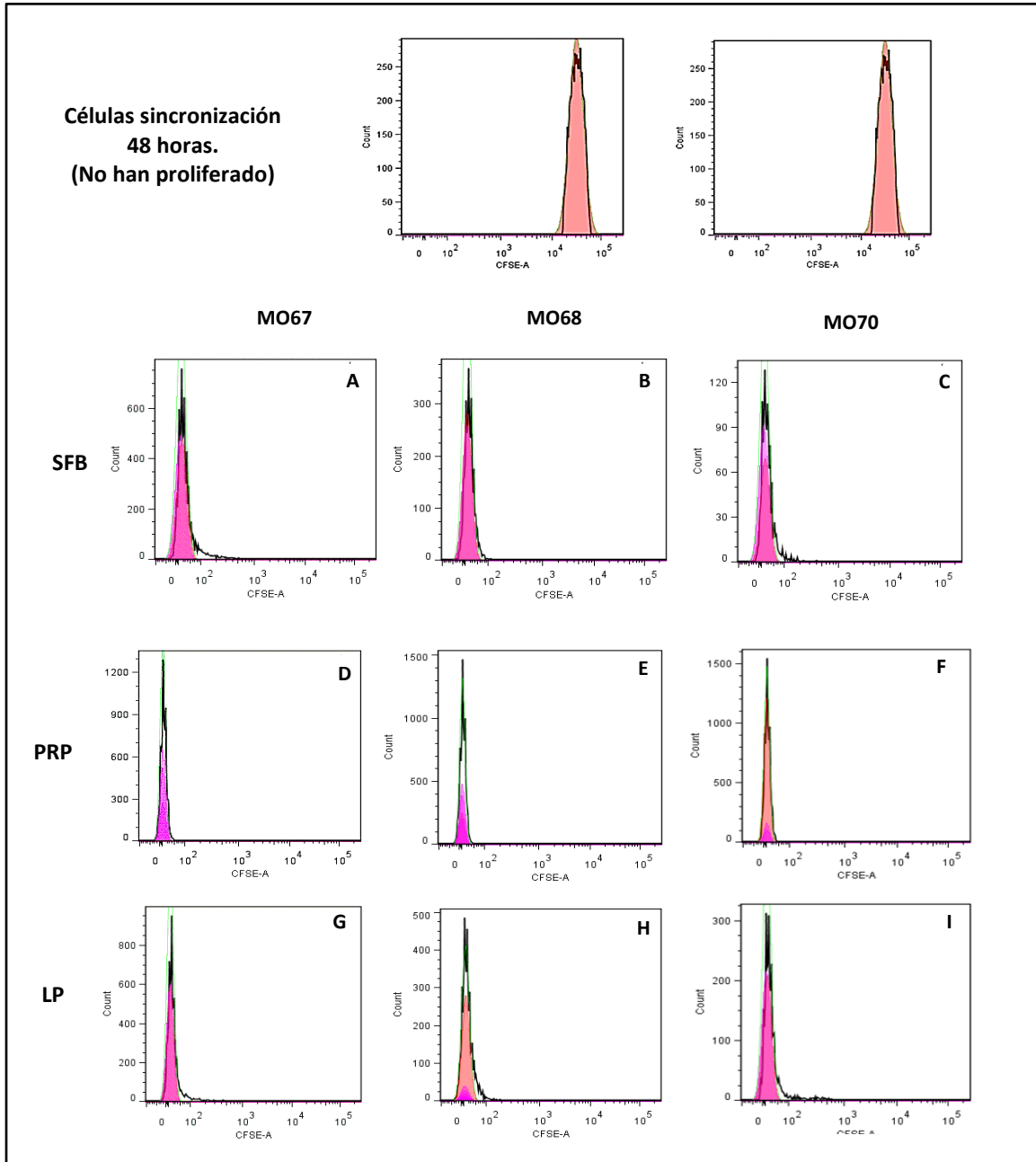
Los histogramas se presentan en la FIGURA 6 .Las Figuras A y L muestran 5 eventos proliferativos para los 7 días.



**FIGURA 6. Efecto del PRP, LP y SFB sobre la proliferación de las CEM a los 7 días. Las CEM cultivadas en diferentes condiciones durante 7 días marcadas con CFSE. (A-D) CEM + SFB 10%, (E-H) CEM + PRP 10%, (I-L) CEM +LP 10%.**

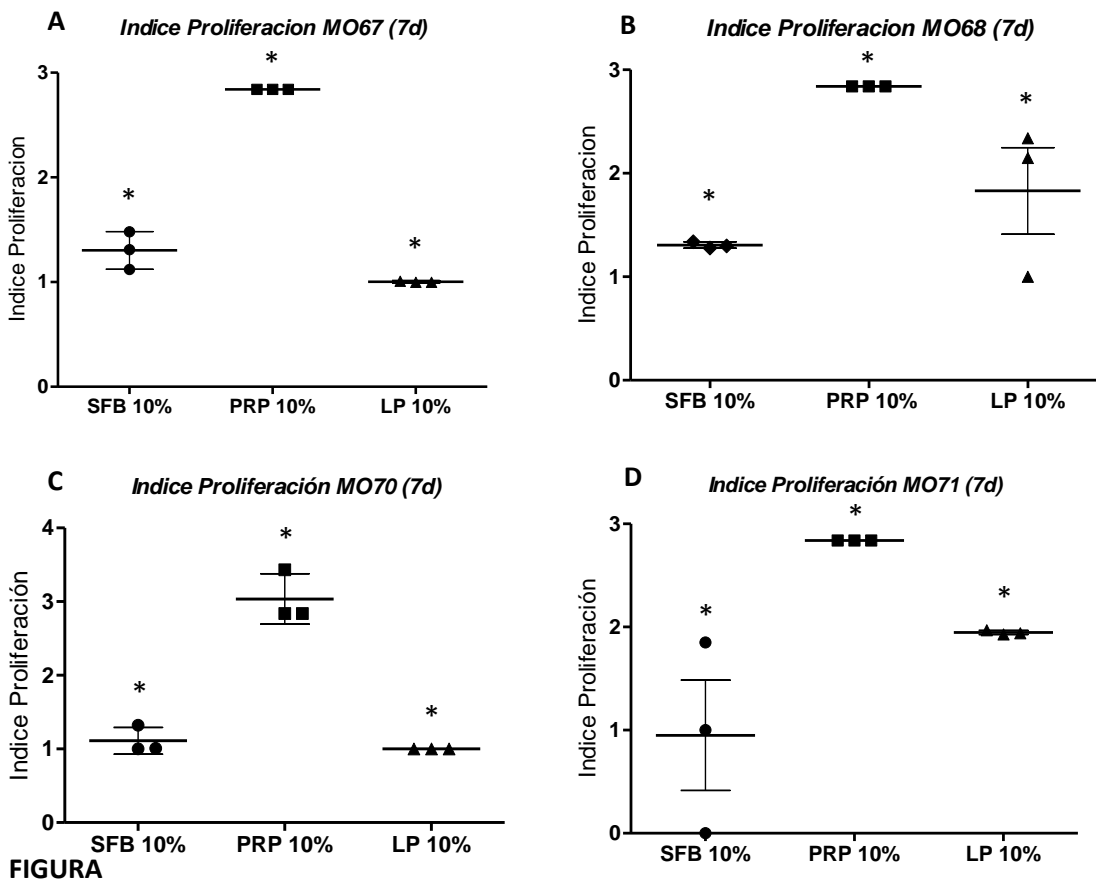


Después de 7 días de cultivo, las células fueron recolectadas y analizadas por citometría de flujo. La división celular se caracteriza por reducción a la mitad secuencial de fluorescencia CFSE, generando igualmente espaciados picos en una escala logarítmica. Las células sin proliferación (CEM) fueron sincronizadas por depleción de SFB después de 48 horas FIGURA 7.



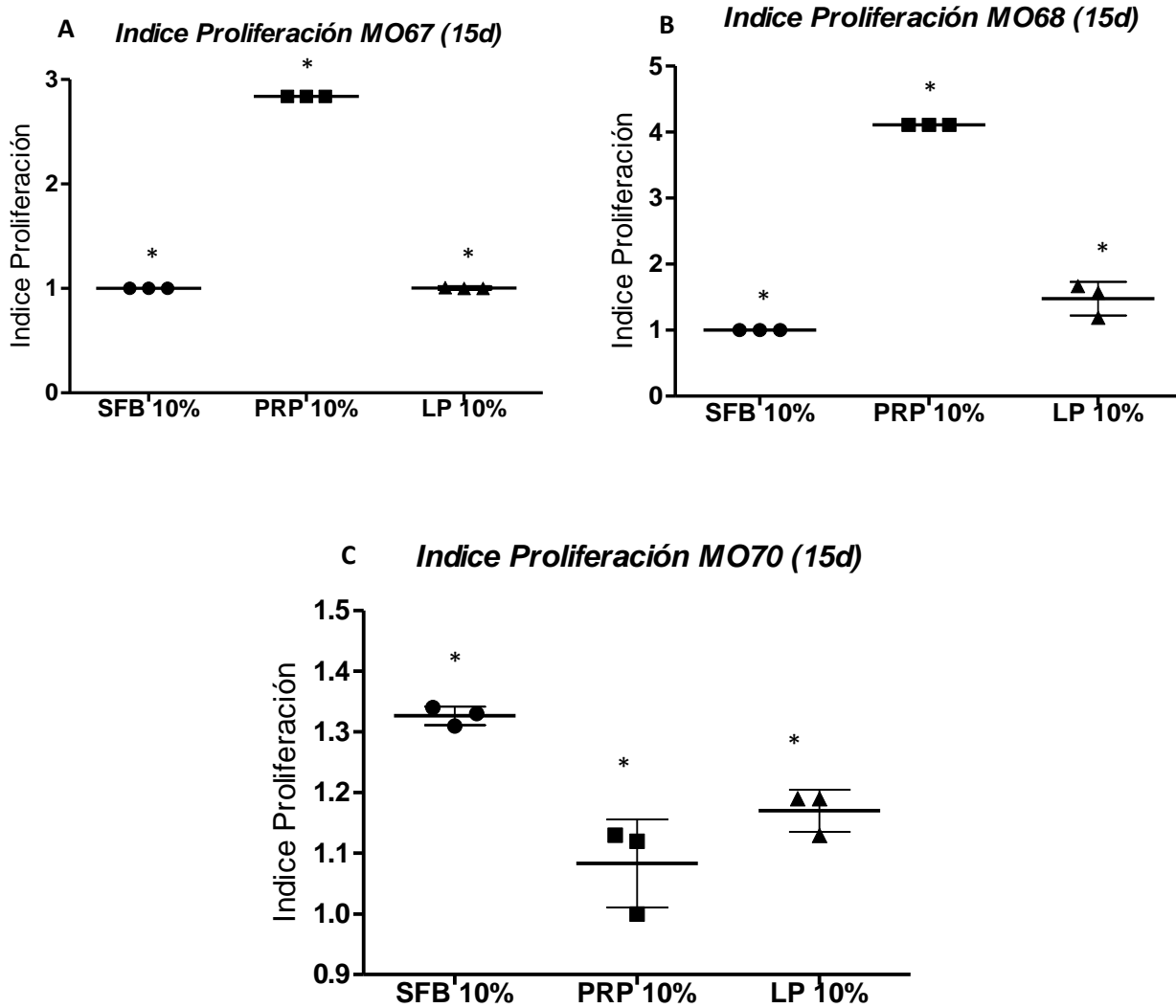
**FIGURA 7. Efecto del PRP, LP y SFB sobre la proliferación de las CEM a los 15 días.** Las CEM cultivadas en diferentes condiciones durante 15 días marcadas con CFSE. (A-C) CEM + SFB 10%, (D-F) CEM + PRP 10%, (G-I) CEM + LP 10%. Las células sin proliferación (CEM) fueron sincronizadas por depleción de SFB después de 48 horas.

Para el análisis de la proliferación celular se utilizó la herramienta de flow Jo- proliferación determinando el índice de proliferación para cada condición. Los datos fueron adquiridos mediante citometría de flujo y analizados por la prueba de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos obtenidos. Según esta prueba los datos presenta una distribución paramétrica ( $p>0.05$ ) en las condiciones "SFB 10%" ( $P>0.9388$ ). Pero una distribución no paramétrica en la condición "LP 10%" ( $p< 0.0001$ ) y "PRP 10%" ( $p<0.0001$ ). Debido a ésta distribución y al número de datos analizados se decidió utilizar la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, para comparar índice de proliferación (IP) de las diferentes muestras adquiridas entre las condiciones experimentales. Después de 7 días de cultivo, se observan diferencias estadísticamente significativas en la Índice Proliferación entre las condiciones experimentales PRP, SFB, LP; MO67- ( $p<0.0234$ ), MO68- ( $p>0.0552$ ), MO70- ( $P<0.0329$ ), MO71 - ( $p<0.0241$ ) ver FIGURA 8.



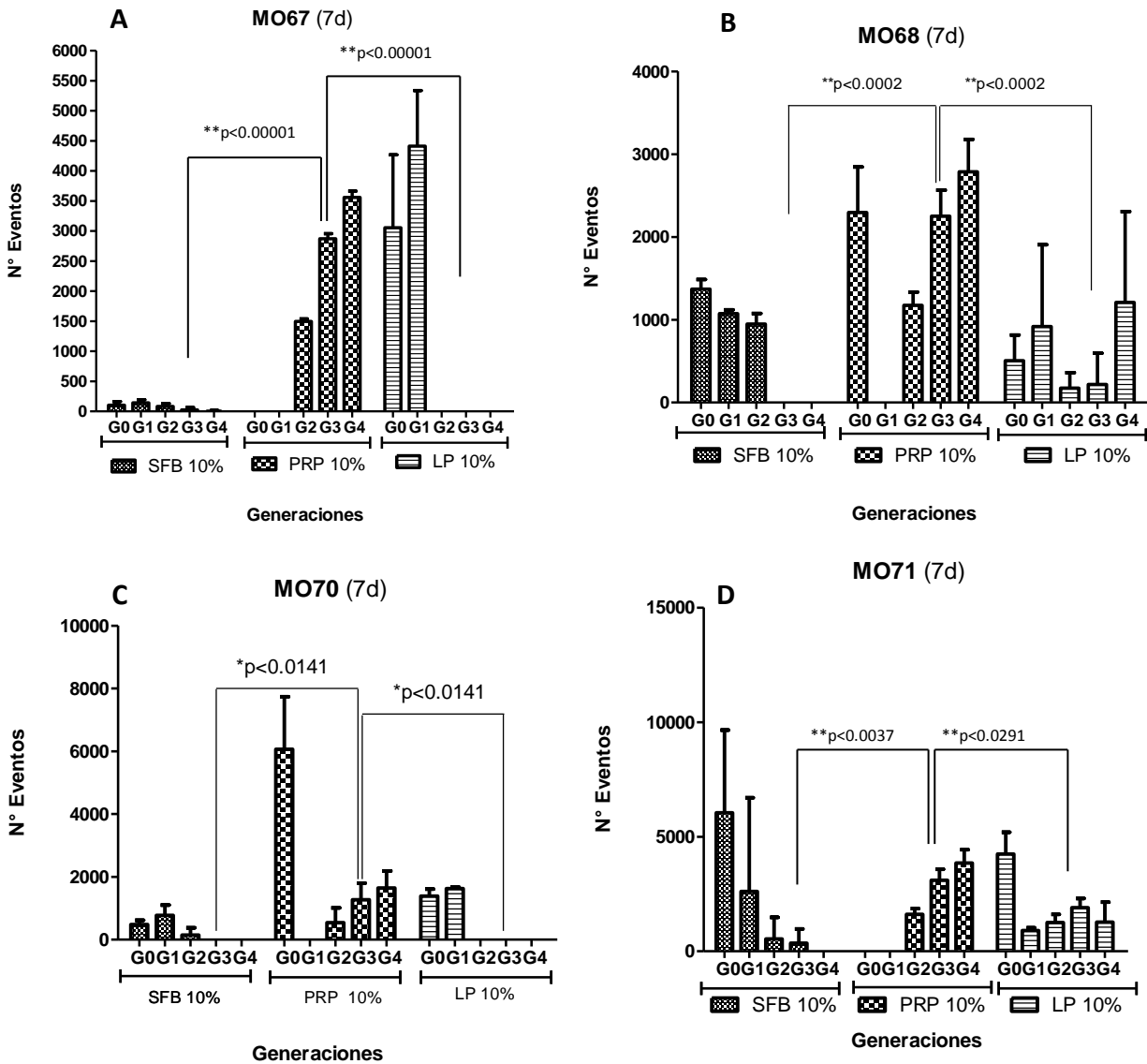
**FIGURA 8. Índice proliferación de las CEM a los 7 días.** Se observa un experimento representativo del efecto de PRP y LP sobre CEM evaluado a los 7 días de incubación en cada una de las condiciones experimentales. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con PRP 10%. Se observan los valores de p para cada una de las muestras ( $\pm$  Desviación estándar). (A) CEM de MO67 \* ( $p<0.0234$ ), (B) CEM de MO68 \* ( $p<0.0552$ ), (C) CEM de

MO70 \*( $p < 0.0329$ ), (D) CEM de MO71 \*( $p < 0.0241$ ). Prueba de Kruskal-Wallis – Análisis en Statistix 8. Gráficas hechas en GraphPad Prism 5.



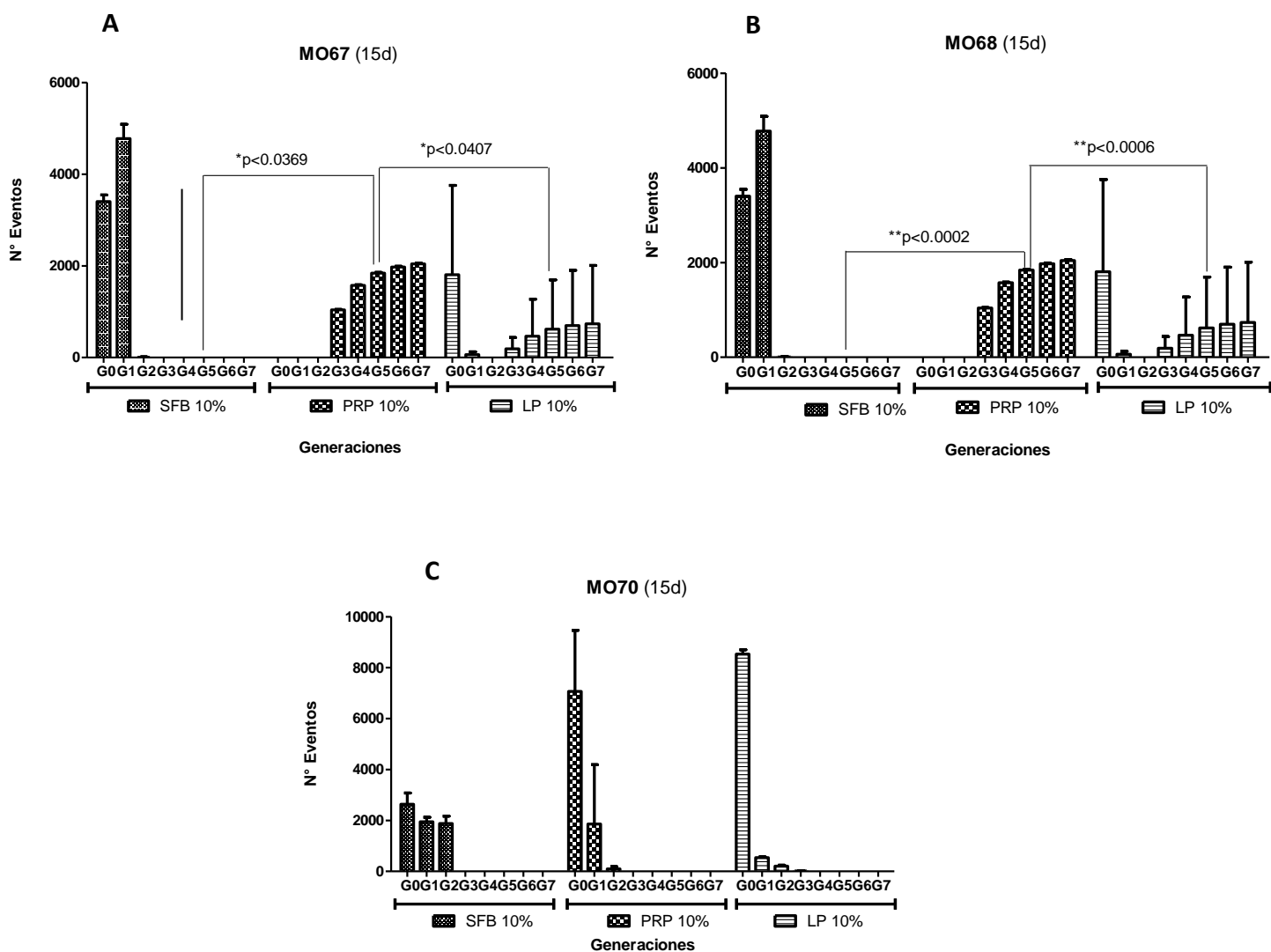
**FIGURA 9. Índice proliferación de las CEM a los 15 días.** Se observa un experimento representativo del efecto de PRP y LP sobre CEM evaluado a los 15 días de incubación en cada una de las condiciones experimentales. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las células tratadas con PRP 10%. Se observan los valores de p para cada una de las muestras ( $\pm$  Desviación estándar). ((A) CEM de MO67 \*( $p < 0.0312$ ), (B) CEM de MO68 \*( $p < 0.0211$ ), (C) CEM de MO70 \*( $p < 0.0309$ ). Prueba de Kruskal-Wallis – Análisis en Statistix 8. Gráficas hechas en GraphPad Prism 5.

Como complemento para el análisis de la proliferación celular se consideró el número de células divididas en cada generación. Se estableció para los 7 días (5 generaciones) y para los 15 días (8 generaciones). Se observaron diferencias estadísticamente significativas en las tres condiciones cuando se compararon en los 7 días (G3) y 15 días (G5) FIGURA 10 y FIGURA 11. Los ensayos se realizaron por triplicado.



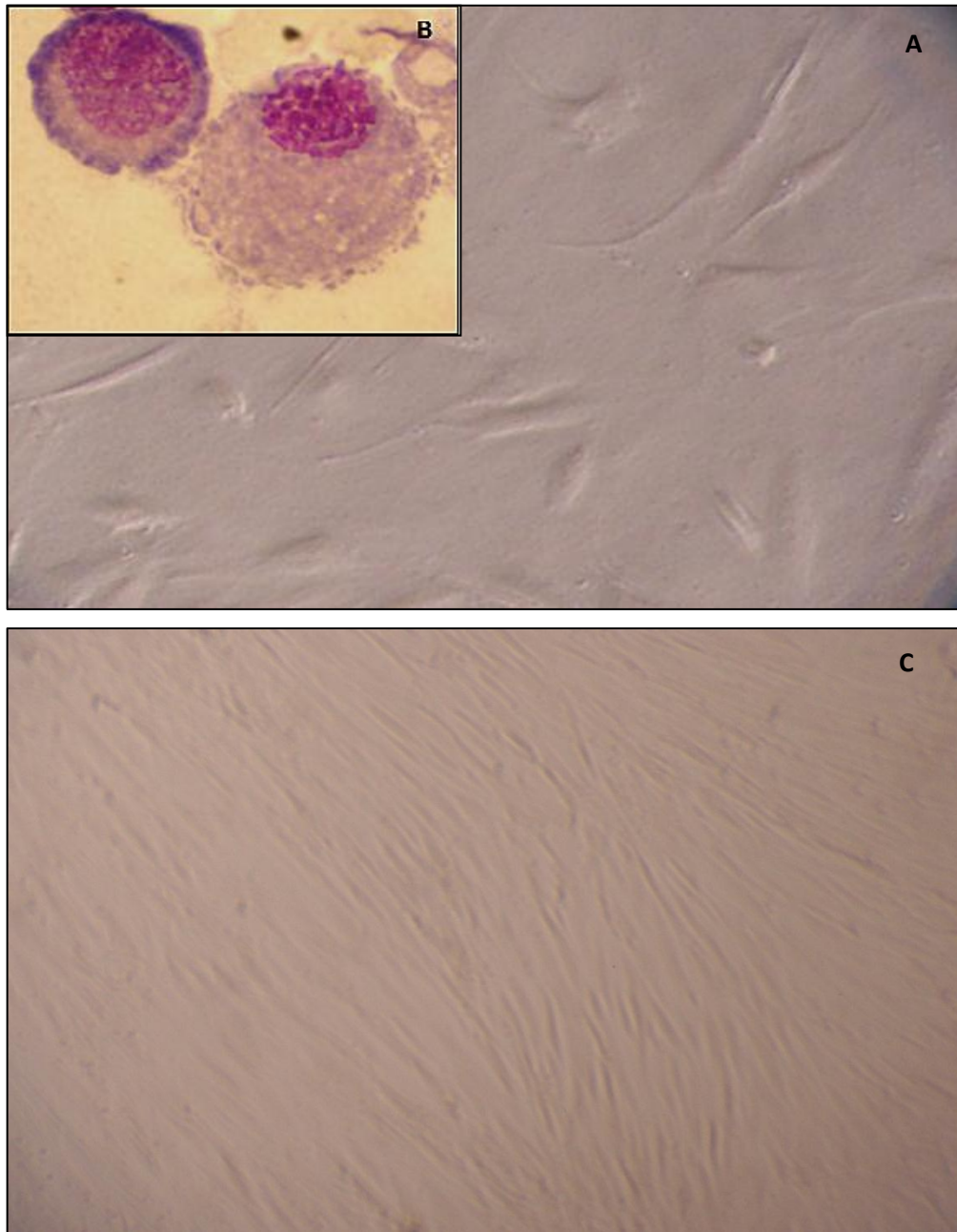
**FIGURA 10. Numero de eventos por generación de las CEM a los 7 días.** Se presenta un grafico de barras representando el número de eventos en cada generación para cada condición experimental a los 7 días de cultivo, los ensayos se realizaron por triplicado. Se observaron diferencias estadísticamente significativas. (A)MO67 –\*\*p<0.00001, (B) MO68 – \*\*p<0.0002, (C) MO70 – p<0.0141, (D) MO71 – p<0.0037.



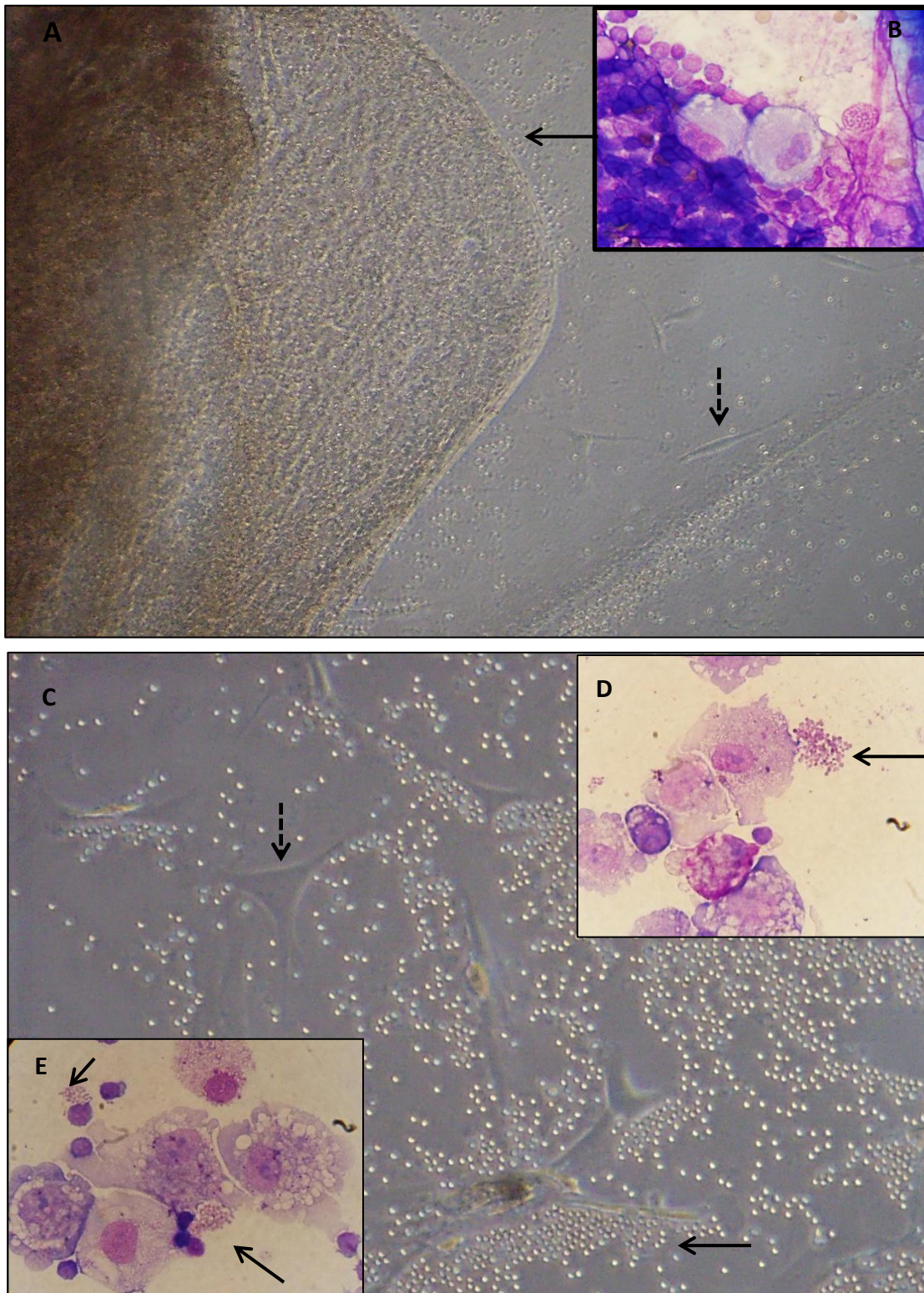


**FIGURA 11. Numero de eventos por generación de las CEM a los 15 días.** Se presenta un grafico de barras representando el número de eventos en cada generación para cada condición experimental a los 15 días de cultivo, los ensayos se realizaron por triplicado. Se observaron diferencias estadísticamente significativas (A) **MO67** SFB vs PRP ( $*p<0.0369$ ) PRP vs LP ( $*p<0.0407$ ), (B) **MO68** SFB vs PRP ( $**p<0.0002$ ) PRP vs LP ( $**p<0.0006$ ), (C) **MO70** no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Posteriormente, se observo los cambios morfológicos de las CEM cultivadas en las tres condiciones **FIGURA 12.**



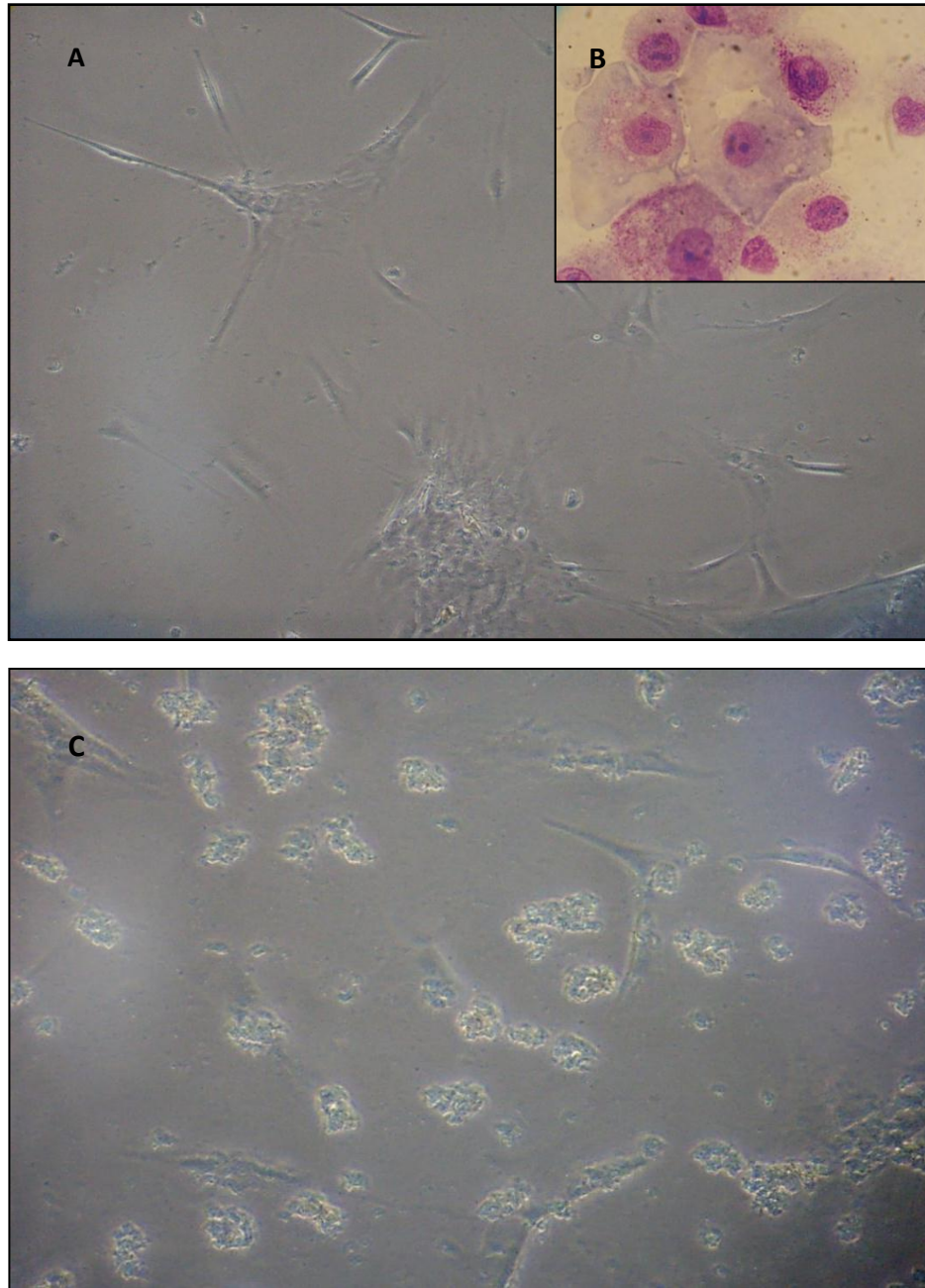
**FIGURA 12. Morfología de CEM cultivadas con SFB.** CEM en tercer pase de cultivo (A) morfología fibroblastoide (30% confluencia) (Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus) (B) (Cythospin, coloración con Wright - Objetivo 100x), (C) CEM morfología fibroblastoide después de 15 días en cultivo con SFB (90% confluencia Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus). Registro fotográfico cámara Samsung SL420.



**FIGURA 13. Morfología de CEM cultivadas con PRP.** CEM en tercer pase de cultivo (A) se observa la formación de malla de fibrina con CEM embebidas en ella después de 7 días de cultivo, (30% confluencia) (Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus) (B) (Cythospin, coloración con Wright -



Objetivo 100x), (C) se observan CEM con las plaquetas adheridas a ellas, cultivo después de 15 días (Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus), (D y E) (Cythospin, coloración con Wright - Objetivo 100x . Flechas negras (plaquetas rodeando las CEM), Flechas punteadas CEM. Registro fotográfico cámara Samsung SL420.

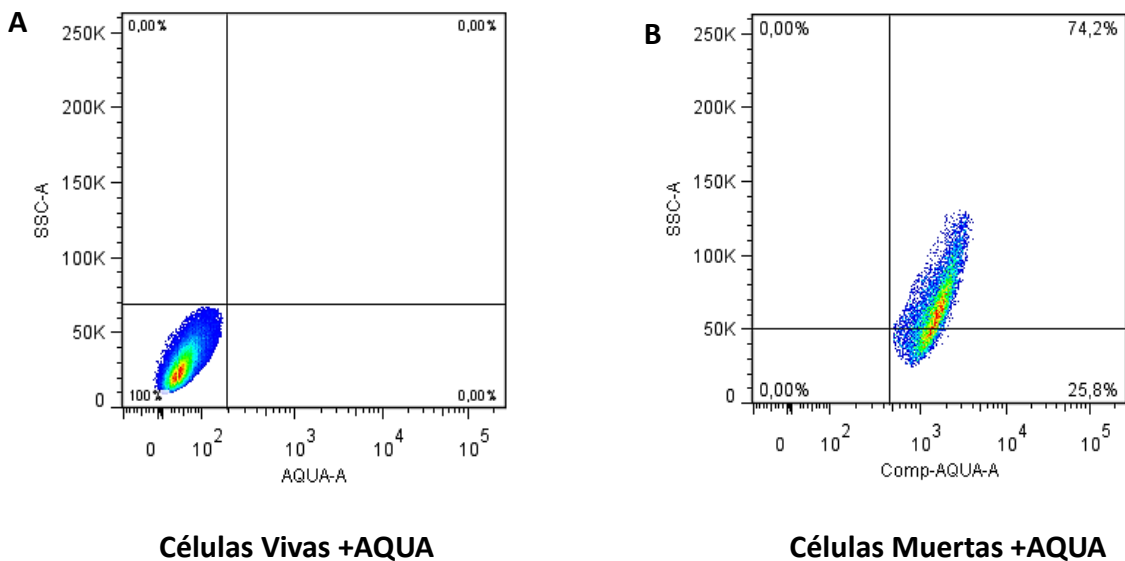


**FIGURA 14. Morfología de CEM cultivadas con LP.** CEM en tercer pase de cultivo (A) se observan cambios en la morfología de las CEM cuando son cultivadas con lisado plaquetario, morfología aplanadas (20% confluencia) (Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus) (B) (Cythospin,

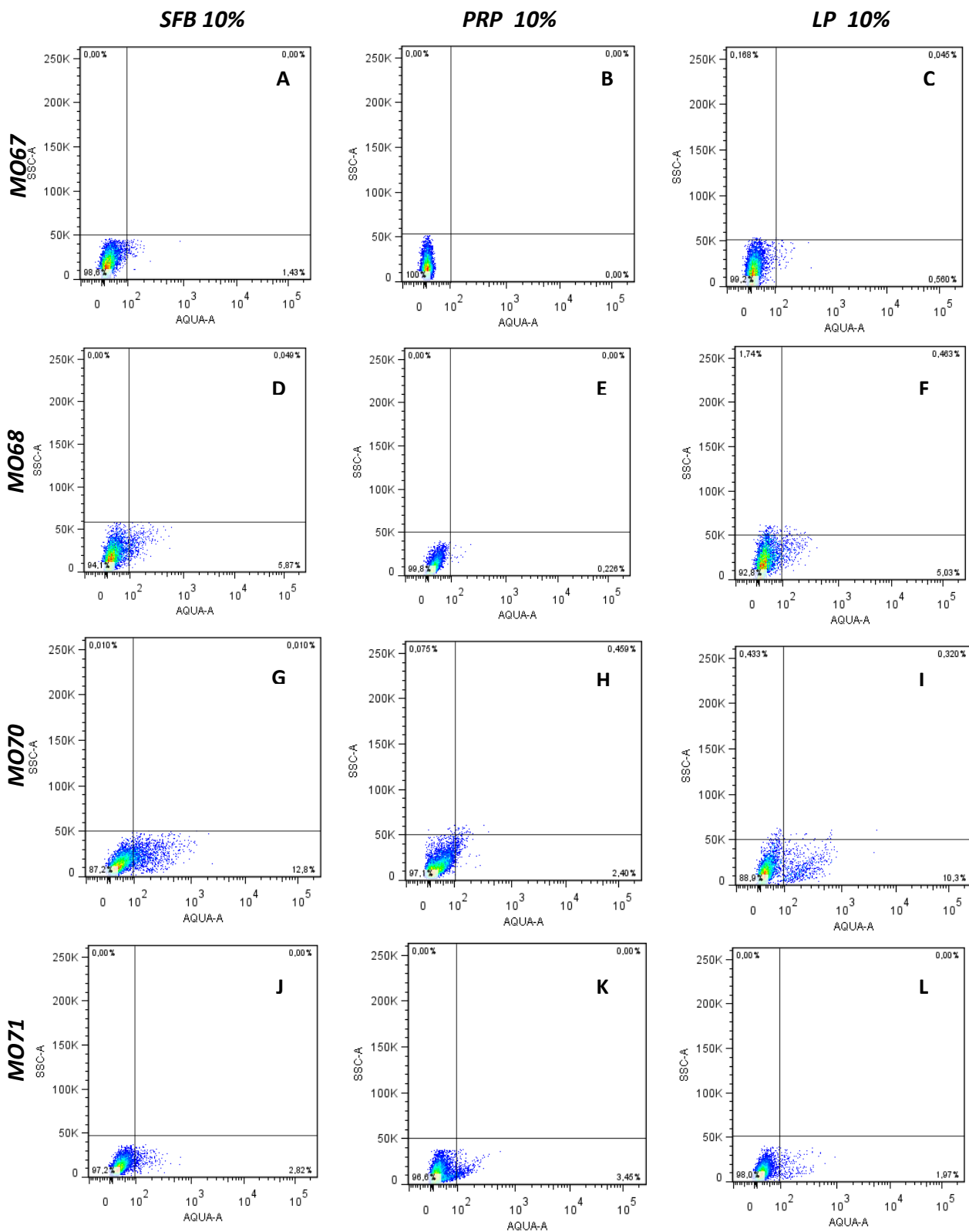
coloración con Wright - Objetivo 100x), (C) CEM después de 15 días en cultivo con LP (50% confluencia Objetivo 10x, microscopio invertido Olympus). Registro fotográfico cámara Samsung SL420.

#### 6.4 Evaluación de la viabilidad celular de CEM humanas expuestas a PRP, LP y SFB. Mediante el uso de la Tinción supravital LIVE/DEAD AQUA. (L34957 invitrogen).

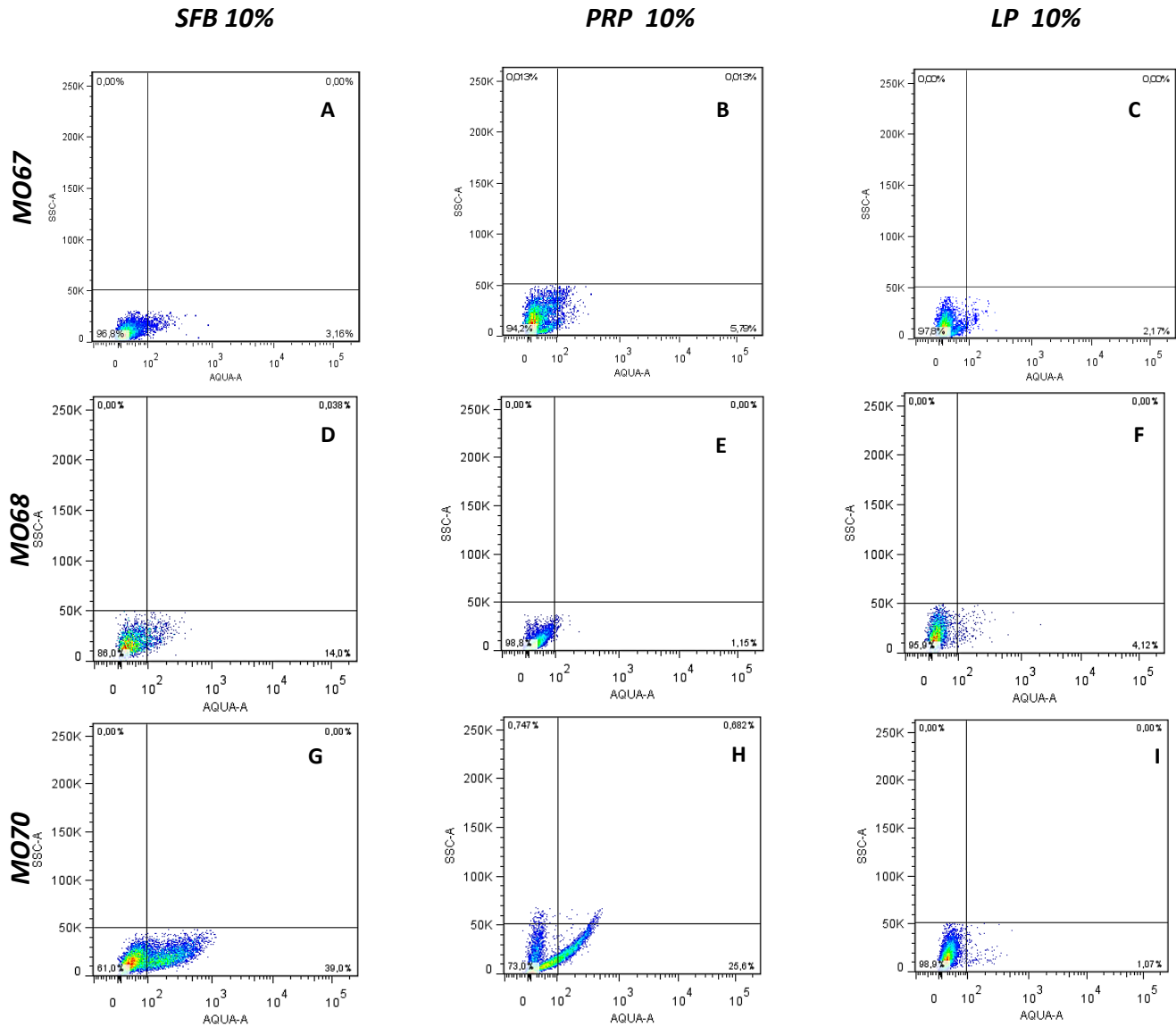
Con el fin de analizar el efecto de plasma rico en plaquetas y lisado plaquetario en la viabilidad celular de las CEM en comparación con el control (CEM + SFB), se evaluó por citometría de flujo mediante la Tinción supravital LIVE/DEAD AQUA a los 7 y 15 días de cultivo. Se observó que en la condición donde se le adiciono 10% plasma rico en plaquetas se presenta un porcentaje mayor de células vivas, que en comparación con las otras condiciones, donde se observó un menor porcentaje de células vivas **FIGURA 16 y FIGURA 17**.



**FIGURA 15. Compensación Tinción supravital LIVE/DEAD AQUA. (A) CEM Vivas + AQUA, (B) CEM Muertas + AQUA.**



**FIGURA 16 Viabilidad celular de las CEM a los 7 días.** Las CEM cultivadas en diferentes condiciones durante 7 días marcadas con AQUA LIVE DEAD. (A-J) CEM + SFB 10%, (B-K) CEM + PRP 10%, (C-L) CEM + LP 10%. MO67 (A-C), M068 (D-F), MO70 (G-I), MO71 (J-L).



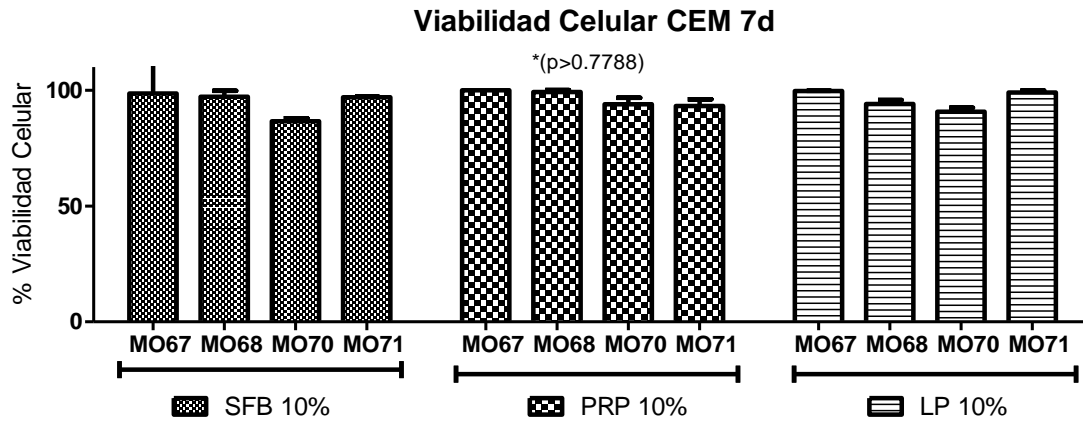
**FIGURA 17. Viabilidad celular de las CEM a los 15 días.** Las CEM cultivadas en diferentes condiciones durante 15 días marcadas con AQUA LIVE DEAD. (A, D, G) CEM + SFB 10%, (B, E, H) CEM + PRP 10%, (C, F, I) CEM + LP 10%. MO67 (A-C), MO68 (D-F), MO70 (G-I).

Después de 7 y 15 días de cultivo, las células fueron recolectadas y analizadas por citometría de flujo. Se observa el porcentaje de células vivas en cada condición, la condición de PRP se mantuvo el 100% de las células vivas después de 7 días de cultivo, en comparación con SFB y LP. Las células vivas y muertas se utilizaron de control para el análisis.

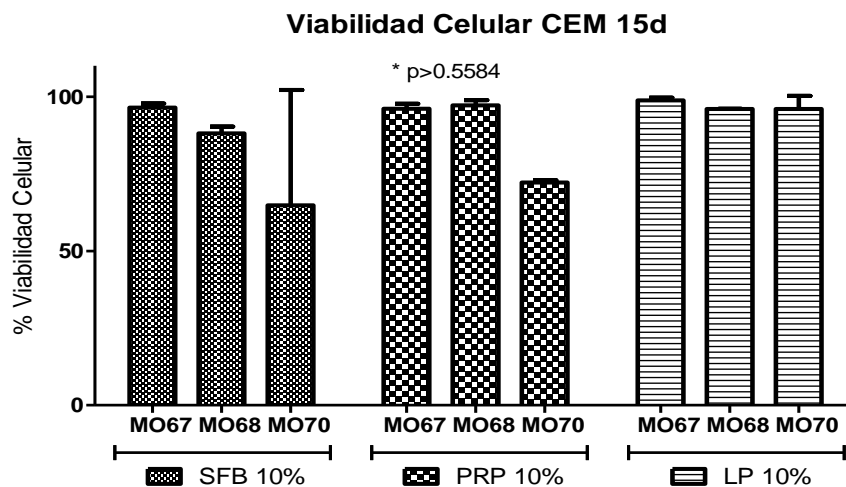
Para el análisis de la viabilidad celular, los datos fueron adquiridos mediante citometría de flujo y analizados por la prueba de Shapiro-Wilk para probar la normalidad de los datos obtenidos.

Según esta prueba los datos presenta una distribución paramétrica ( $p > 0.05$ ) en las condiciones "PRP 10%" ( $P > 0.1684$ ) y "LP" ( $p > 0.4413$ ), pero una distribución no paramétrica en las condiciones "SFB 10%" ( $p < 0.0339$ ). Debido a ésta distribución y al número de datos analizados se decidió

utilizar la prueba de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos, para comparar los porcentajes de viabilidad de las diferentes muestras adquiridas entre las condiciones experimentales. Después de 7 y 15 días de cultivo, no se observan diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de células vivas entre las condiciones experimentales PRP, SFB, LP FIGURA 18 y FIGURA 19.



**FIGURA 18. Porcentaje de viabilidad celular CEM a los 7 días.** Se observa un experimento representativo del efecto de PRP y LP sobre la viabilidad celular CEM evaluado a los 7 días de cultivo en las diferentes condiciones experimentales en cada una de las concentraciones establecidas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el % de células vivas tratadas en las 3 condiciones \* (p> 0.7788). Se observan las medias de los valores de % células vivas para cada condición. (± Desviación estándar). Prueba de Kruskal-Wallis – Análisis en Statistix 8. Gráficas hechas en GraphPad Prism 5.



**FIGURA 19. Porcentaje de viabilidad celular CEM a los 15 días.** Se observa un experimento representativo del efecto de PRP y LP sobre la viabilidad celular CEM evaluado a los 15 días de cultivo en las diferentes condiciones experimentales en cada una de las concentraciones



establecidas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el % de células vivas tratadas en las 3 condiciones \* ( $p > 0.5584$ ). Se observan las medias de los valores de % células vivas para cada condición. ( $\pm$  Desviación estándar). Prueba de Kruskal-Wallis – Análisis en Statistix 8. Gráficas hechas en GraphPad Prism 5.

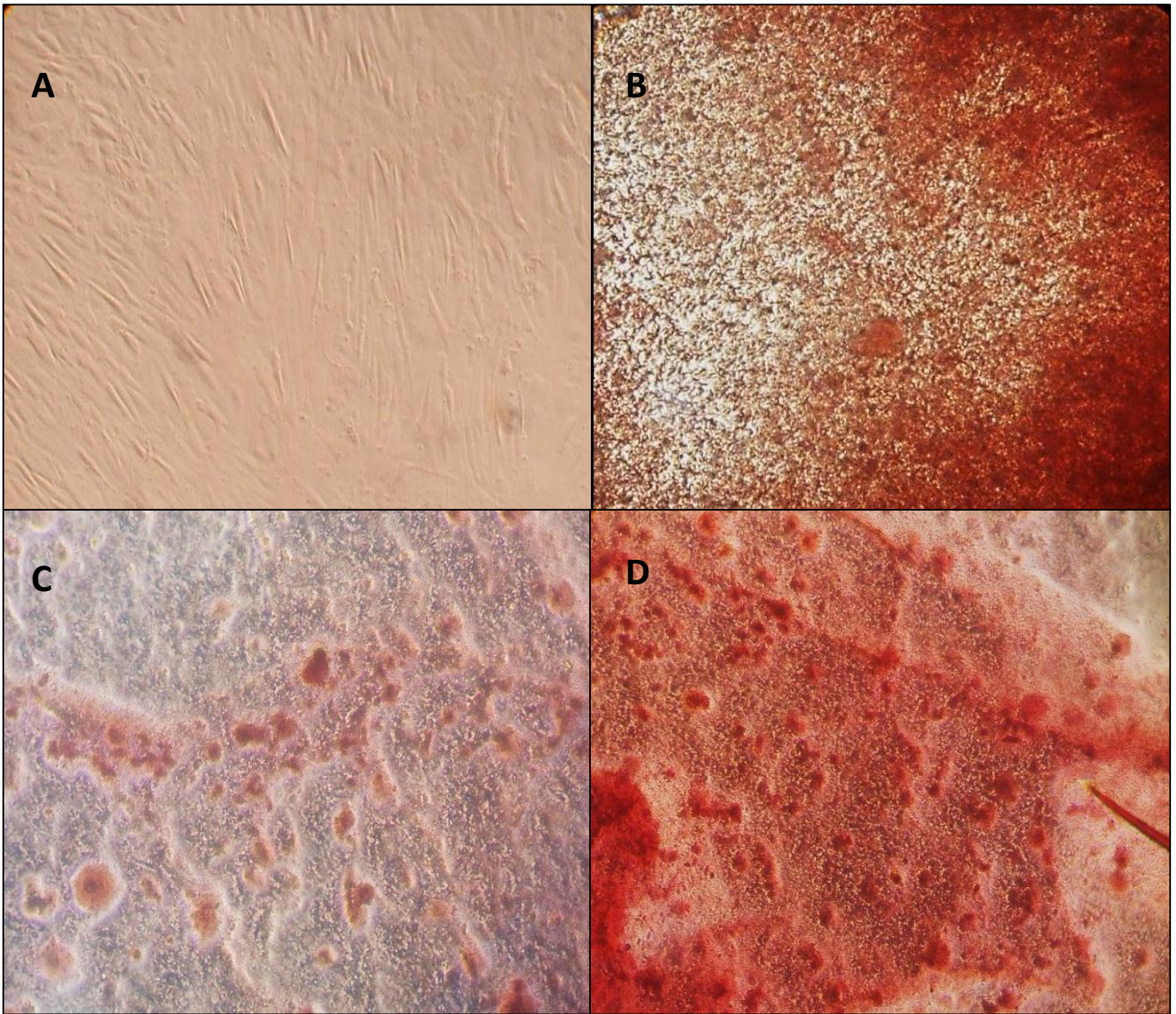
**6.5 Evaluación de la diferenciación condrogénica de CEM expuestas a PRP y LP mediante el uso de medios selectivos para su diferenciación. (STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit Ref. A1007101)**

Para evaluar el efecto del PRP sobre la diferenciación condrogénica a partir de las CEM, se utilizó el medio de diferenciación (STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit Ref. A1007101) como base para cada condición de cultivo, suplementado con plasma rico en plaquetas al 10%, lisado plaquetario 10% y como control se utilizó el medio completo de diferenciación condrogénica

La diferenciación condrogénica fue inducida por 14 días; las CEM presentaron cambios morfológicos pasando de fibroblastoide a una formación de nódulos condrogénicos, el cual es un acumulo de MEC, que gracias al estímulo de muchos factores permite su diferenciación a condroblastos células redondas, las cuales producen su propia matriz extracelular **FIGURA 20**.

Estas se pudieron evidenciar por medio de la tinción Safranina "O", se tiñeron de color rojo indicando la producción de matriz extracelular (**FIGURA 20B-D**).

Por el contrario las células que fueron cultivadas con medio IMDM +SFB10% (control) no se detectó formación proteoglicanos (**FIGURA 20A**).



**FIGURA 20. Evaluación la diferenciación condrogénica de las CEM.** Las CEM en tercer pase se sembraron en placas de 24 pozos, la inducción se inició mediante el cultivo de células con medios base de diferenciación + suplemento (PRP, LP, suplemento condrogénico); la progresión de la diferenciación se confirmó mediante tinción histoquímica Safranina O para condrogénesis (Matriz extracelular), fueron revelados a los 14 días.  
(A) Celulas control cultivadas con IMDM +SFB 10%, (B) CEM MO67 + Medio de diferenciación (STEMPRO®Chondrogenesis Differentiation Kit Ref. A1007101), (C) CEM +LP 10% (Medio base), (D) CEM + PRP 10% (Medio base).

## 6 DISCUSIÓN

Desde de la década 1990, el PRP ha sido ampliamente estudiado como una herramienta biológicamente potencial para tratar trastornos de cicatrización de tejidos, regeneración ósea y del tejido cartilaginoso. Los primeros investigadores que establecieron la obtención del PRP fue *Anitua et al.* Quienes obtuvieron un promedio de plaquetas 785.000 plaquetas , mas o menos 338% mas que el promedio basal en sangre total [54, 55]. En nuestro trabajo logramos obtener un concentrado plaquetario que supera de 3 a 5 veces del recuento basal como se observa en la FIGURA 1. Mediante éste protocolo nosotros logramos obtener un incremento promedio de plaquetas  $1290 \times 10^3/\text{mm}^3$ , de tal forma que nuestros cultivos se realizaron con más de 10.000 plaquetas por CEM, donde se observo un efecto significativo en las CEM, en cuanto a su morfología, proliferación y diferenciación. Una vez obtuvimos el PRP, el aislamiento y caracterización de las CEM este estudio fue eficiente en comparación con lo publicado.

Según la SITC se establecieron tres criterios para identificar CEM, primero, la adhesión de las células aisladas en cultivo al plástico, segundo, la expresión de marcadores de diferenciación tales como CD105, CD73, y CD90, >95% en las células del cultivo, con ausencia en la expresión de marcadores como CD34, CD45 o antígeno leucocitario humano- DR (HLA-DR), >95% en las células del cultivo, y tercero, la capacidad para diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteocitos [18]. Trabajos de *Harichandan et al* y *Akiyama et al* han demostrado que las CEM de MO son células multipotentes, que son capaces de formar UFC-F; y cumplir con los criterios de identificación de CEM después de la expansión en cultivo [56, 57]

En nuestro estudio nosotros logramos aislar y caracterizar las CEM, según los criterios establecidos por la SICT. Observamos que las células aisladas eran células adherentes con morfología fibroblastoide y su inmunofenotipo correspondía a la expresión de antígenos CD105 y CD73 positivos, en ausencia de antígenos CD34 y CD45, en más del 95% de las células en cultivo. Las CEM se han caracterizado por su capacidad de diferenciación en adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Hasta el momento no es claro cuál es la jerarquía de las CEM, sin embargo *Minguell et al* proponen que la jerarquía puede estar basada en su potencial de diferenciación multipotente, tri-potente, bi-potente o uni-potente; indicando que el progenitor multi-potente tiene la capacidad de diferenciación hacia los tres linajes principales (Adipocitos, Condrocitos y Osteoblastos), el estroma de soporte hematopoyético y tenocitos; el progenitor tri-potente con capacidad de diferenciación hacia condrocitos, osteoblastos y tenocitos; el progenitor bi-potente con capacidad de diferenciación en condrocitos y osteoblastos, y el progenito uni-potente con capacidad de diferenciación hacia un solo linaje [58].

Sin embargo se ha demostrado que existen subpoblaciones que tienen la capacidad de expresar diferentes marcadores Otros autores describen que la población de CEM no es homogénea, encontrando diferentes subpoblaciones que tienen la capacidad de expresar diferentes marcadores neuronales, observado en la expresión o no de marcadores neuronales y gliales con el marcador progenitor neuronal nestin, lo que sugiere la existencia de subpoblaciones maduras e inmaduras de CEM [59]. En comparación a nuestros resultados, observamos que todas las CEM de

las médulas óseas aunque hacen diferenciación a los tres linajes, unas poseen más capacidad de diferenciación adipogénica y condrogénica que otras.

Después de aislar y caracterizar las CEM, se evaluó el efecto del PRP en la proliferación de las Células Estromales Mesenquimales; Estudios realizados por *Drengk et al* y *Mishra et al* han demostrado que el PRP a una concentración del 10% ejerce un efecto significativo tanto en la proliferación y diferenciación de las CEM aisladas de animales, en cultivos *in vitro*. Nuestros resultados muestran que el PRP 10% aumenta el índice de proliferación de las CEM, en cultivos *in vitro*, en comparación con el control SFB 10% (ver FIGURA 7 y 8). También observamos diferencias estadísticamente significativas en el número de células por generaciones en la condición de PRP 10% como se observa en la FIGURA 8 y 9.

Muchos estudios afirma que el lisado plaquetario incrementa la tasa de proliferación de las CEM en cultivos *in vitro* e induce la diferenciación osteogénica y en un porcentaje mayor en la condrogénesis cuando se adiciona a una concentración de 10% [12], nuestros resultados demuestran que el lisado plaquetario no ejerce un efecto significativo en la proliferación de las CEM y observamos que induce la diferenciación condrogenica en porcentaje menor en comparación con PRP.

Con respecto a la viabilidad celular este es el primer trabajo donde se evalúa el efecto del PRP sobre la viabilidad celular, aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre PRP, LP y SFB, hay ligeros cambios entre el % viabilidad celular de las CEM en presencia de PRP; esto es interesante, por que este hallazgo no se había demostrado directamente en otros estudios.

Finalmente con respecto a la capacidad de inducción condrogénica, se realizó con un patrón de oro comparando con un medio de cultivo comercial versus el PRP, (evaluado mediante la tinción safranina O) donde se observó que en la condición de PRP las células presentaron cambios morfológicos, observando células completamente redondas y disminuidas de tamaño. Estas se tiñeron de color rojo indicando la producción de matriz extracelular y depósitos menor de glucosaminoglicanos (FIGURA 15 (D)) observándose de manera cualitativa un porcentaje menos de producción de MEC y depósitos de glucosaminoclicanos en LP, que se observa en la FIGURA 15 (C).

Este es el primer trabajo donde se habla directamente del efecto del PRP con CEM, sin embargo es necesario evaluar otras variables para la diferenciación condrogénica, por ejemplo evaluar la expresión de proteínas CD44, CD151, CD49c y CD166 que son antígenos que se expresan cuando las CEM se han diferenciado a condrocito, así como evaluar la expresión de colágeno tipo II directamente en las células; realizado por microscopia confocal.

## 8. CONCLUSIONES

- Las CEM aisladas de MO humana cumplen los tres criterios establecidos por las ISCT.
- El inmunofenotipo de CEM aisladas de MO fue CD105 y CD73 positivas, y CD45 y CD34 negativas.
- Las CEM pueden diferenciarse en adipocitos, condrocitos y osteoblastos en medios de inducción de diferenciación específicos.
- Una buena obtención de PRP depende del recuento basal en sangre total y el protocolo implementado.
- El PRP ejerce un efecto significativo en la proliferación celular en comparación con las otras condiciones experimentales.
- Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad celular entre las condiciones experimentales, las CEM en presencia de PRP mantiene un porcentaje de viabilidad superior en comparación con LP y SFB.
- El PRP induce la diferenciación condrogénica de las CEM de manera similar al patrón de oro previamente estandarizado, observándose depósitos de glucosaminoglicanos por la tinción de safranina O.



## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Crha, M., et al., *Mesenchymal stem cells in bone tissue regeneration and application to bone healing*. Acta Veterinaria Brno, 2009. **78**(4): p. 635-642.
2. Körbling, M. and Z. Estrov, *Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept?* New England Journal of Medicine, 2003. **349**(6): p. 570-582.
3. Tsuchida, H., et al., *Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats*. Journal of orthopaedic research, 2006. **21**(1): p. 44-53.
4. Eppley, B.L., W.S. Pietrzak, and M. Blanton, *Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery*. Plast Reconstr Surg, 2006. **118**(6): p. 147e-159e.
5. Bradley, J. and D. Dandy, *Osteochondritis dissecans and other lesions of the femoral condyles*. Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume, 1989. **71**(3): p. 518-522.
6. Hjelle, K., et al., *Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2002. **18**(7): p. 730-734.
7. Toro Gutiérrez, C.E., et al., *Physiopathology of cartilage and base for future therapies in early osteoarthritis*. Revista Colombiana de Reumatología, 2007. **14**(2): p. 135-142.
8. Figueroa, D., et al., *Lesiones osteocondrales en cirugía de LCA*. PAT. **32**(36): p. 0.
9. Hirsch, R., et al., *Osteoarthritis: new insights*. Ann Intern Med, 2000. **133**: p. 635-646.
10. Alvarez López, A., C. Casanova Morote, and Y. García Lorenzo, *Tratamiento quirúrgico de la osteoartritis de rodilla; Surgical treatment of knee osteoarthritis*. Rev. cuba. ortop. traumatol, 2004. **18**(1).
11. Sgaglione, N.A., et al., *Update on advanced surgical techniques in the treatment of traumatic focal articular cartilage lesions in the knee*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2002. **18**(2): p. 9-32.
12. Huang, A.H., M.J. Farrell, and R.L. Mauck, *Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage*. Journal of biomechanics, 2010. **43**(1): p. 128-136.
13. Oldershaw, R.A., *Cell sources for the regeneration of articular cartilage: the past, the horizon and the future*. International Journal of Experimental Pathology, 2012.
14. Friedenstein, A.J., *Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium*. Acta Anat (Basel), 1961. **45**: p. 31-59.
15. Beyer Nardi, N. and L. da Silva Meirelles, *Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization*. Handb Exp Pharmacol, 2006(174): p. 249-82.
16. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
17. Wang, H.S., et al., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1330-7.
18. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
19. Docheva, D., et al., *Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(1): p. 21-38.
20. Fonsatti, E. and M. Maio, *Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer*. J Transl Med, 2004. **2**(1): p. 18.
21. Airas, L., et al., *Differential regulation and function of CD73, a glycosyl-phosphatidylinositol-linked 70-kD adhesion molecule, on lymphocytes and endothelial cells*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 421-31.
22. Enomoto, H., et al., *Runx2 deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes in vitro*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 3): p. 417-25.

23. Tuan, R.S., G. Boland, and R. Tuli, *Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering*. Arthritis Research and Therapy, 2003. **5**(1): p. 32-45.
24. Rosen, E.D., *The transcriptional basis of adipocyte development*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2005. **73**(1): p. 31-4.
25. Farmer, S.R., *Transcriptional control of adipocyte formation*. Cell Metab, 2006. **4**(4): p. 263-73.
26. Li, J., et al., *MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-beta1/Smads pathway*. Cell Prolif, 2010. **43**(4): p. 333-43.
27. Eppley, B.L., J.E. Woodell, and J. Higgins, *Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing*. Plast Reconstr Surg, 2004. **114**(6): p. 1502-8.
28. Ferrari, M., et al., *A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery*. Int J Artif Organs, 1987. **10**(1): p. 47-50.
29. Dohan Ehrenfest, D.M., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 158-67.
30. Anitua, E., et al., *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration*. Thromb Haemost, 2004. **91**(1): p. 4-15.
31. Matras, H., *[Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin]*. Osterr Z Stomatol, 1970. **67**(9): p. 338-59.
32. Gibble, J.W. and P.M. Ness, *Fibrin glue: the perfect operative sealant?* Transfusion, 1990. **30**(8): p. 741-7.
33. Marx, R.E., et al., *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998. **85**(6): p. 638-46.
34. Anitua, E., et al., *Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture*. J Orthop Res, 2005. **23**(2): p. 281-6.
35. Anitua, E., et al., *Reciprocal actions of platelet-secreted TGF-beta1 on the production of VEGF and HGF by human tendon cells*. Plast Reconstr Surg, 2007. **119**(3): p. 950-9.
36. Boswell, S.G., et al., *Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2012.
37. Zimmerman, G.A., *Platelets in Lung Biology*. Annual Review of Physiology, 2012. **75**(1).
38. Gnatenko, D.V., P.L. Perrotta, and W.F. Bahou, *Proteomic approaches to dissect platelet function: half the story*. Blood, 2006. **108**(13): p. 3983-3991.
39. Mesa, M.G. and C.C. Alfonso, *Características estructurales y funcionales de las plaquetas*. Rev Cubana Angiol y Cir Vasc, 2000. **1**(2): p. 132-41.
40. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet  $\alpha$ -granules: basic biology and clinical correlates*. Blood reviews, 2009. **23**(4): p. 177-189.
41. Beca, T., et al., *Plasma rico en plaquetas: Una revisión bibliográfica*. Avances en Periodoncia e Implantología Oral, 2007. **19**(1): p. 39-52.
42. Ahuja, K.D.K., et al., *Acute effect of a high-carbohydrate low-fat meal on platelet aggregation*. Platelets, 2009. **20**(8): p. 606-609.
43. Ranzato, E., et al., *Platelet lysate promotes in vitro wound scratch closure of human dermal fibroblasts: different roles of cell calcium, P38, ERK and PI3K/AKT*. Journal of cellular and molecular medicine, 2009. **13**(8b): p. 2030-2038.

44. Romero, J.A.A., D.M.P. Guerrero, and V.M.R. Pardo, *Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas*. Nova, 2007(008): p. 177-184.
45. Guerrero, D.P., J.A. Romero, and V.M.R. Pardo, *Evaluación de características morfológicas e inmunofenotipo de células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea*. Nova, 2007(008): p. 114-126.
46. Chen, F.H., K.T. Rousche, and R.S. Tuan, *Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(7): p. 373-82.
47. Mishra, A., et al., *Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation*. Tissue Eng Part C Methods, 2009. **15**(3): p. 431-5.
48. Iwai, R., et al., *Ex vivo cartilage defect model for the evaluation of cartilage regeneration using mesenchymal stem cells*. J Biosci Bioeng, 2011. **111**(3): p. 357-64.
49. Sun, Y., et al., *The regenerative effect of platelet-rich plasma on healing in large osteochondral defects*. Int Orthop, 2010. **34**(4): p. 589-97.
50. García-Álvarez, F., et al., *Influence of concentrated platelets on the reconstruction of cartilage defects in the lamb knee joint*. Revista Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología (English Edition), 2010. **54**(6): p. 378-382.
51. Centeno, C.J., et al., *Regeneration of meniscus cartilage in a knee treated with percutaneously implanted autologous mesenchymal stem cells*. Med Hypotheses, 2008. **71**(6): p. 900-8.
52. Dominici, M., K. Le Blanc, and M. I., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315 317.
53. Quiroz, G., et al., *Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells and evaluation of their osteogenic potential*. Revista Ingeniería Biomédica, 2008. **2**: p. 48-55.
54. Marx, R.E., et al., *Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 1998. **85**(6): p. 638-646.
55. Artitua, E., et al., *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration*. Thromb Haemost, 2004. **91**: p. 4-15.
56. Harichandan, A. and H.J. Buhring, *Prospective isolation of human MSC*. Best Pract Res Clin Haematol, 2011. **24**(1): p. 25-36.
57. Akiyama, K., et al., *Characterization of bone marrow derived mesenchymal stem cells in suspension*. Stem Cell Res Ther, 2012. **3**(5): p. 40.
58. Minguell, J.J., A. Erices, and P. Conget, *Mesenchymal stem cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(6): p. 507-20.
59. Foudah, D., et al., *Expression of neural markers by undifferentiated rat mesenchymal stem cells*. J Biomed Biotechnol, 2012. **2012**: p. 820821.