



Universidad de la República- CSIC

Formulario de Informe final del Programa de Apoyo  
a la Investigación Estudiantil  
Edición 2014



DATOS DEL PROYECTO
<input type="checkbox"/> Título del Proyecto: Evaluación del efecto de distintos medios de cultivo sobre el crecimiento <i>in vitro</i> , de las células madres mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino.
<input type="checkbox"/> Número ID del proyecto: 189
<input type="checkbox"/> Área de conocimiento: Salud animal
<input type="checkbox"/> Facultad o Servicio: Facultad de Veterinaria
<input type="checkbox"/> Nombre completo de los-as Integrantes del equipo: Valeria Campbell, Sofía Fernandez, Mauro Ríos, Javier Mirazo, Fernando Vila, Kevin Yaneselli.
<input type="checkbox"/> Correo electrónico del/de la estudiante referente: vrcampb@gmail.com
<input type="checkbox"/> Nombre completo del/de la docente orientador-a: Jacqueline Maisonnave
<input type="checkbox"/> Correo electrónico del/de la docente orientador-a: jacmaiso@gmail.com

### INFORME FINAL

(desde ítem 1 a 7 la extensión máxima POR ÍTEM es de una carilla)

- 1) Transcriba los objetivos del proyecto tal cual figuraban en la solicitud financiada  
Objetivos:
  - general

Evaluar cómo afecta la criopreservación las características de crecimiento y diferenciación *in vitro* de las Células Madre Mesenquimales derivadas de Tejido Adiposo (CMM-TA) equinas. (Original y descartado)

Evaluar el efecto de 2 suplementos del medio de cultivo, en el crecimiento *in vitro* de las CMM-TA equinas. (Actual)

- particulares

- 1) Evaluar el Nivel de capacidad proliferativa celular (NCPC) de las CMM cultivadas en ambos medios de cultivo, en diferentes pasajes.

- 2) Caracterizar las CMM-TA a través de: Unidades formadoras de colonias fibroblásticas (UFC-F) y tridiferenciación *in vitro* de las CMM-TA equinas.

- 2) Enumere y describa las principales actividades desarrolladas en el marco de su proyecto. Materiales y métodos

1. Extracción de muestras

Todas las maniobras quirúrgicas y el protocolo anestésico-analgésico están avalados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA, en trámite Nro. de expediente 111130-001375-14).

Las muestras de tejido adiposo fueron extraídas de 4 equinos adultos de entre 3 y 12 años. Fue realizada sobre la zona superior del glúteo en la base de la cola, tomando aproximadamente 10 gramos de tejido adiposo subcutáneo (de Mattos Carvalho y col., 2009; Pascucci y col., 2010).

2. Cultivo celular

- 2.1. Preparación del Lisado Plaquetario (LP) equino

El LP se preparó modificado de Seo y col. (2013), a partir de la sangre de 3 caballos sanos, evaluado a través de examen clínico y análisis hematológicos en el Hospital de Facultad de Veterinaria, UdelaR. Se extrajo 50 ml de sangre en jeringas con 6 ml de citrato ácido dextrosa. Se realizó la primera centrifugación a 230g por 10 minutos a 10°C donde se separó el plasma de las células rojas. El sobrenadante (plaquetas y plasma) se centrifugó nuevamente a 900g por 15 minutos a 10°C. El sobrenadante, plasma pobre en plaquetas (PPP) se separó. El pellet de plaquetas se mezcla en PPP hasta llegar a una concentración de  $1 \times 10^5$  plaquetas/ $\mu$ l. Luego se congela a -20°C, paso seguido se lleva a 37°C para liberar los factores de crecimiento plaquetarios. Por último se realiza una centrifugación a 1600g por 30 minutos a 10°C para remover los fragmentos plaquetarios residuales. El sobrenadante se filtra a través de un filtro de jeringa de 0,8 y 0,22  $\mu$ m y se almacena a -20°C.

- 2.2. Aislamiento y adaptación de las células al LP

El protocolo de cultivo primario de CMM-TA es adaptado del descrito por Ranera y col. (2011). Se corta la muestra de tejido adiposo en trozos, luego son sometidos a una digestión enzimática con 1 mg/ml de colagenasa tipo I durante 20-40 minutos. Posteriormente se centrifuga a 300 g durante 5 minutos y se resuspende el pellet en medio de crecimiento celular con SFB (MC-SFB), para sembrar en placas de 6 hoyos (una muestra por hoyo) e incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Cada 2 días se les cambió el medio de cultivo y se pasan 1:3 cuando llegan a un 80% de confluencia, usando

0,5 mM EDTA/tripsina al 0,05%. Los medio de crecimientos (MC) utilizados fueron: Medio de crecimiento celular con suero fetal bovino (MC-SFB): DMEM, 10% suero fetal bovino (SFB) y 2% antibiótico (ATB); y medio de crecimiento con Lisado Plaquetario (MC-LP): DMEM, 20% LP y 2% ATB, 0,04 % de heparina. Se realizó una adaptación de las células aisladas para ser cultivadas con LP. Las células cultivadas se los colocaba progresivamente el medio con LP hasta llegar a un 100% de MCLP.

### 3. Nivel de capacidad proliferativa celular (NCPC)

El protocolo fue adaptado de Yaneselli (2015), brevemente se siembran CMM-TA en ambos medios de crecimiento celular, MC-SFB y MC-LP, en placas de cultivo celular de 24 hoyos de 2 cm<sup>2</sup>/hoyo (Cellsstar) a una concentración de 1 x 10<sup>4</sup> células viables/cm<sup>2</sup> en pasaje 2 hasta pasaje 6 (P<sub>2</sub>-P<sub>6</sub>). El recuento de células se realiza en cámara de Neubauer utilizando Trypan Blue 0,1% para determinar viabilidad. Cuando están al 80-90% de confluencia son levantadas (tripsinización) y contadas. Fue registrado el tiempo en que llegan al 80-90% de confluencia y la cantidad de células cosechadas en cada pasaje, todos los ensayos se hicieron por triplicado.

### 4. Caracterización de CMM-TA equinas

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

Se sembraron CMM-TA P<sub>2</sub> en una cantidad de 100 células/cm<sup>2</sup>. Se cambió el medio cada 3-4 días durante 14 días. Posteriormente la capa celular se fija en metanol y se tiñe con Giemsa. Se realizó con muestras cultivadas con ambos medios de cultivo. Se evaluaron cualitativamente la formación de las colonias (Guercio y col. 2013).

#### 4.2. Diferenciación celular *in vitro*

Entre P<sub>2</sub>-P<sub>4</sub>, fueron sembradas 9,4 x 10<sup>3</sup> células/hoyo en placas de cultivo celular de 24 pocillos. Después de 24 horas de siembra con medio de crecimiento, se realizó la inducción de diferenciación *in vitro* con el medio de cultivo apropiado. El procedimiento está basado y adaptado (Ranera y col., 2010; Pascucci y col., 2011; Vieira y col., 2010; Zamperone y col., 2013).

### 6. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó a través de estadística descriptiva y análisis de varianza (ANOVA y Test de t). Se realizó primariamente la organización de los datos (variables: recuento de células y días) determinando media, mediana y desvío (se graficaron los datos). Luego el análisis de varianza de todo el recuento celular sin distinguir el medio de cultivo y luego por cada medio. Lo mismo se hizo con la variable tiempo (días). Se aplica Test de t para las medias de dos muestras pareadas para hacer la comparación de cada pasaje. Se determina el valor de p, siendo el resultado significativo cuando es menor a 0,05, existe tendencia cuando el valor de p esta entre 0,05-0,10 y no es significativo cuando p es mayor a 0,10.

3) Indique si se han efectuado todas las etapas planteadas en el cronograma de ejecución del proyecto. En caso de que su cronograma haya sufrido alteraciones o no se haya

podido cumplir con todas las etapas definidas en el cronograma, aclare los motivos de tal situación.

El cronograma planteado fue cumplido con modificaciones, cambiamos el objetivo general del trabajo, en vez de evaluar el efecto de la criopreservación sobre las células se evaluó el comportamiento celular comparando dos medios de cultivo diferentes. Debido al interés actual de utilizar un sustituto del SFB por sus inconvenientes éticos y de bioseguridad, y porque hallamos varios trabajos sobre la criopreservación y sus efectos sobre las células, nos pareció más interesante y útil comparar medios de cultivo. Se sumaron experimentos de caracterización como la prueba de unidades formadoras de colonias fibroblásticas (UFC-F). Se utilizaron 4 individuos para la extracción de tejido adiposo en vez de 5 animales debido a inconvenientes en el transporte de las muestras donde se perdió una.

- 4) Indique los principales resultados obtenidos. Aclare hasta qué punto coinciden - o no - con los resultados esperados por parte del equipo.

#### Aislamiento de CMM-TA

Se logró el aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo extraído de équidos adultos con medio de cultivo celular usando MC-SFB. Son células adherentes al plástico y de morfología fibroblástica. Las CMM-TA fueron adaptadas al medio suplementado con lisado plaquetario (LP).

#### Proliferación de las CMM-TA

El recuento celular a través de la prueba NCPC mostró diferencias significativas entre el MC-SFB y MC-LP. Existió un mayor recuento para el MC-LP en el caso de los P<sub>2</sub> (p= 0,001) y P<sub>5</sub> (p= 0,01). En el caso del P<sub>3</sub> (p= 0,02) se vio mayor recuento con el MCSFB (Fig. 1). El tiempo de crecimiento de las células fue similar para la mayoría de los pasajes, pero en los P<sub>2</sub>-P<sub>3</sub> se vieron tendencias (p=0,08) indicando menor tiempo para llegar al 80-90% de confluencia de las células cultivadas con MC-LP (Fig. 2). (VER FIGURA 1 Y 2 DE ANEXOS).

#### Caracterización de CMM-TA equinas

Fueron caracterizadas las CMM-TA presentando la capacidad de UFC-F con ambos medios (Fig. 4 EN ANEXOS).

Se obtuvo la diferenciación *in vitro* en los linajes condrogénico y osteogénico para las células cultivadas con MC-SFB y solo en condrogénico para las células cultivadas con MC-LP (Fig. 4 EN ANEXOS).

- 5) Indique si los resultados parciales o finales del proyecto fueron difundidos a través de alguna actividad (charlas, seminarios, talleres, prensa, edición de materiales impresos, etc.).

El trabajo fue presentado como propuesta de tesis de grado, pero no se han difundido aun los resultados.

- 6) En caso de haber enfrentado dificultades en el desarrollo del proyecto de investigación, realice una breve descripción de las mismas.

Problemas de contaminación en los cultivos de células cuando estábamos comenzando el ensayo, lo que nos llevó a incrementar las medidas de bioseguridad en el laboratorio.

- 7) En base a su experiencia de trabajo en equipo en el marco de este Programa, le solicitamos que realice sugerencias o comentarios para ser tomados en cuenta en futuras ediciones del mismo.

Toda la ayuda e indicaciones a través de la página de internet nos fueron muy útiles, el mantener actualizado eso sería nuestra sugerencia, también nos fue de gran ayuda el asistir a las charlas informativas.

- 8) **Resumen publicable de no más de 250 palabras** que sea accesible para un público amplio, y en un lenguaje dirigido a no especialistas en la temática de la investigación. En este resumen se debe dar cuenta de los objetivos del proyecto, los pasos seguidos para cumplirlos y los principales resultados alcanzados.

**El resumen debe contener la siguiente información:**

Título del proyecto: Evaluación del efecto de distintos medios de cultivo sobre el potencial de crecimiento y multidiferenciación *in vitro*, de las células madres mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino.

Servicio: Área de Inmunología-Facultad de Veterinaria

Nombre de los integrantes del equipo: V. Campbell; S. Fernandez; M. Ríos Nombre del docente orientador: J. Maisonnave

**Resumen publicable:**

Las células madre mesenquimales (CMM) se utilizan cada vez más en medicina regenerativa. Normalmente se utiliza como suplemento el suero fetal bovino (SFB), siendo un producto comercial costoso, afecta el bienestar animal (sufrimiento del feto al extraer el suero), contiene proteínas xenogénicas, y el riesgo de transmitir patógenos de una especie a otra. El objetivo de este trabajo fue evaluar la sustitución del SFB por el lisado plaquetario (LP) equino en el medio de cultivo de las CMM. El aislamiento y expansión de células se realizó a partir de tejido adiposo (TA) de cuatro equinos adultos, se mantuvieron los cultivos celulares con dos medios de crecimiento distintos, suplementados SFB o LP equino, siendo incubados a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se realizó el recuento de células y el tiempo en que los cultivos alcanzaban una confluencia de 80-90%. Fue posible cultivar y expandir CMM-TA con ambos suplementos. Se observaron diferencias

significativas en el recuento celular en algunos pasajes (a favor del MC-LP en el caso de los P<sub>2</sub>(p=0,001) y P<sub>5</sub>(p=0,01). En el caso del P<sub>3</sub> (p=0,02) se vio mayor recuento con el MC-SFB). El tiempo de crecimiento de las células fue similar para la mayoría de los pasajes, pero en los P<sub>2</sub>-P<sub>3</sub> se vieron tendencias (p=0,08) indicando menor tiempo para llegar al 80-90% de confluencia de las células cultivadas con MC-LP. Las CMM-TA cultivadas con ambos medios fueron caracterizadas mostrando la formación de colonias fibroblásticas y diferenciándose *in vitro* al linaje cartilaginoso. En conclusión, las CMM-TA equinas pueden ser expandidas *in vitro* con el sustituto de LP, sin perder sus características de célula madre. Se observaron diferencias no conclusivas, en su capacidad proliferativa, por lo que sería necesario realizar nuevas investigaciones.

9) En la siguiente tabla ingrese la información solicitada en relación a los **equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE**. Recuerde que debe entregar todos los ítems adquiridos en los dos rubros antes mencionados, para que éstos formen parte del acervo de su institución y puedan ser utilizados por equipos financiados en posteriores ediciones de este programa.

EQUIPOS	
cantidad	ítem - descripción
	ninguno

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	autor(es), título, editorial, año
	ninguna


Desde el 1/12/2015 y hasta el 15/12/2015 se deberá entregar a los Ayudantes I+D de los Servicios lo siguiente:

- Un CD con el informe final en formato .odt o .pdf. Y con el póster en su versión digital en formato .jpg o .pdf
- Equipos y bibliografía adquiridos con fondos del PAIE (declarados en la lista conformada en el ítem 8 de este documento)

.....  
FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Se solicita al docente orientador que brinde una opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los resultados expuestos a través de este informe y el contenido de su resumen publicable. (máx 200 palabras)

**Comentarios del docente orientador:**

El equipo de estudiantes se ha desempeñado con mucha responsabilidad, seriedad, constancia e iniciativa. También han demostrado un gran potencial de trabajo en equipo, de fundamental importancia en Veterinaria y en Medicina Regenerativa.

Los resultados obtenidos en el transcurso de esta investigación han sido muy valiosos para el grupo de Medicina Regenerativa Veterinaria del Uruguay, así como para la comunidad científica dedicada a la investigación con Células Madre. El hallazgo de que el LP alogénico (de la misma especie) es igual o más beneficioso para cultivar CMM-TA equinas que el Suero Fetal Bovino, permite evitar transmisión de patógenos de una especie a otra, bajar los costos de aislamiento y expansión de las CMM, lo que contribuye a hacer que la Medicina Regenerativa, de por sí cara sea más accesible. También nos permite investigar el mantenimiento de las CMM de otras especies como las Canina, lo que dará oportunidad a otros estudiantes de grado de realizar su trabajo final en la temática. También se evita el sufrimiento de los fetos bovinos a nivel de frigorífico (materia prima del SFB comercial).

Considero que el resumen publicable está correctamente expresado, para un público no especializado y refleja los resultados más importantes obtenidos.

.....  
FIRMA DEL DOCENTE ORIENTADOR

*D. Maisonnave*

# ANEXOS

Figura 1: Recuentos celulares por pasaje comparando entre medios de cultivos. Los \* indican diferencias significativas de un medio con respecto al otro en el mismo pasaje ( $p < 0,05$ ).

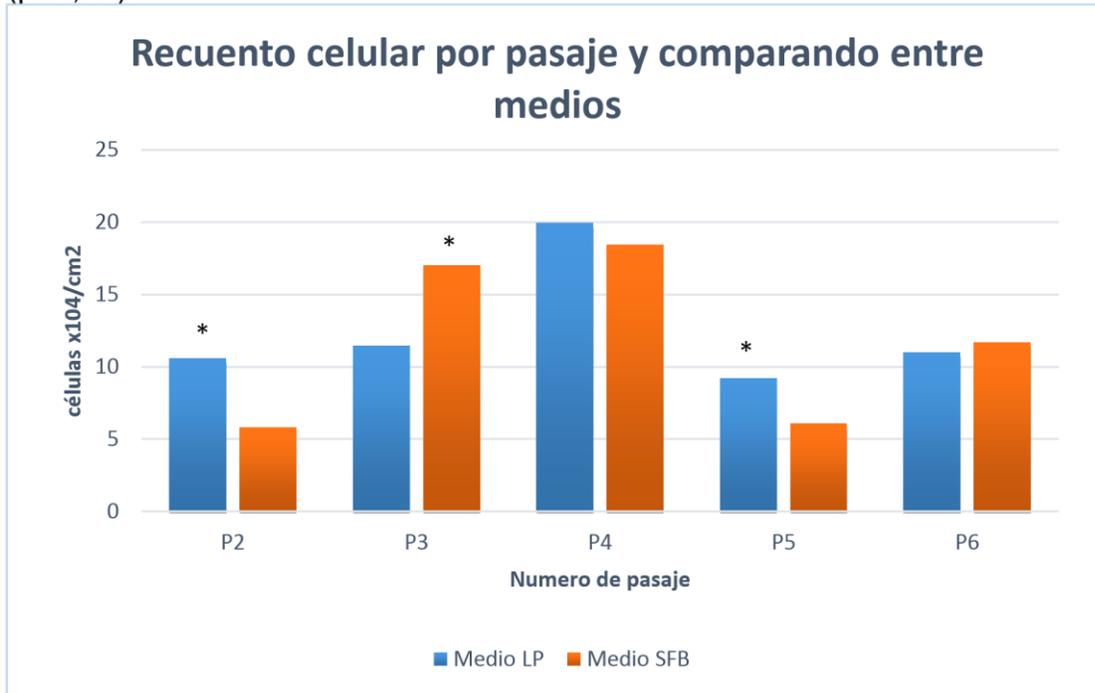


Figura 2: Tiempo (días) en lograr una confluencia de 80-90% de crecimiento celular. Las tendencias están indicadas con  $t$ .

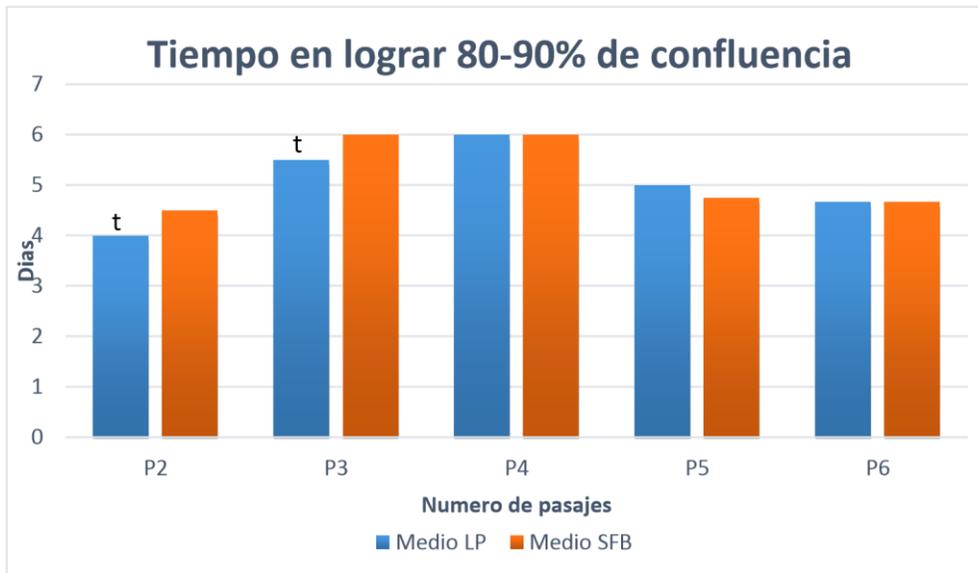


Figura 3: UFC-F de las CMM-TA. Las células cultivadas con MC-LP (tres hoyos superiores) y con MC-SFB (tres hoyos inferiores).

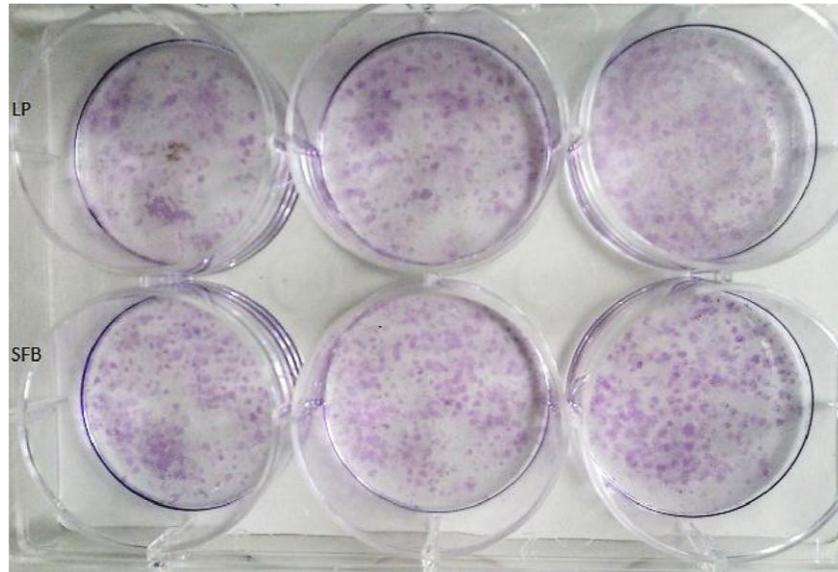


Figura 4: Diferenciación *in vitro* de las CMM-TA equinas. Las imágenes microscópicas con un aumento 10X, nos indican que las células cultivadas en MC-LP (A) y MC-SFB (C) diferenciaron a cartílago mostrando afinidad por Alcian blue, B y D son sus respectivos controles negativos. Cuando fueron inducidas a linaje óseo, las células cultivadas con MCSFB (G) diferenciaron mostrando afinidad por el colorante Alizarin Red, en cambio las cultivadas con LP no diferenciaron (E). Sus respectivos controles son F y H.

