

11222



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---



FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
SECRETARÍA DE SALUD  
CENTRO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
MEDICINA DE REHABILITACIÓN

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS  
MESENQUIMATOSAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATA PARA SU APLICACIÓN EN EL  
MANEJO DE LA LESIÓN MEDULAR

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**ESPECIALISTA EN MEDICINA DE REHABILITACIÓN**

PRESENTA

**DR. MARCO ANTONIO GUERRERO GODÍNEZ**

PROFESOR TITULAR

**DR. LUIS GUILLERMO IBARRA**

ASESORES

**D. EN C. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND  
D. EN C. GABRIEL GUÍZAR-SAHAGÚN**

MÉXICO, D. F.

MAYO 2005

m. 340835



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**T E S I S**  
**SUBDIVISIÓN DE ESPECIALIZACIÓN**  
**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MESENQUIMATOSAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATA PARA SU APLICACIÓN EN EL MANEJO DE LA LESIÓN MEDULAR**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
 ESPECIALISTA EN MEDICINA DE REHABILITACIÓN**

**PRESENTA**

**DR. MARCO ANTONIO GUERRERO GODINEZ**



**PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE LA ESPECIALIDAD DE MEDICINA DE REHABILITACIÓN**

**C. N. R.**

**DR. LUIS GUILLERMO IBARRA**  
**DIVISIÓN DE ENSEÑANZA  
 E INVESTIGACIÓN**

**DIRECCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN**

**DRA. MATILDE LORETO ENRÍQUEZ SANDOVAL**

**ASESORES**

**D. EN C. REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND**  
**JEFE DEL SERVICIO DE BIOQUÍMICA-ORTOPEDIA, CNR**

**D. EN C. GABRIEL GUÍZAR-SAHAGÚN**  
**DIRECTOR EJECUTIVO DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN "PROYECTO CAMINA"**

## AGRADECIMIENTOS

*Esta parte de la tesis aunque se ve fácil elaborarla en realidad es difícil, y lo es porque hay mucha gente que mencionar y poco espacio. Estas personas que han contribuido en este trabajo, de manera directa o indirecta, en mayor o menor magnitud, siempre me han dado su apoyo, desde una simple observación hasta un gran consejo. Tal vez no alcance a nombrar a todos en esta página, sin embargo quiero que reciban en verdad mi más profundo agradecimiento.*

*Por lo que este trabajo fue gracias y en honor de.....*

- *A mi familia, especialmente a mi hija Rebeca por el tiempo que me regalaron para hacer este proyecto y que su presencia es una motivación para ser mejor cada día como profesional y como persona.*
- *A mis asesores de tesis, mis maestros, D. en C. Rebecca Franco y D. en C. Gabriel Guízar, que por su culpa me gusta la investigación y que sin ellos no hubiera encontrado ese gusto ni esa gran responsabilidad.*
- *Al Dr. Luis Guillermo Ibarra por creer en mi.*
- *Al Dr. Andrés A. Gutiérrez López, jefe de la Unidad de Terapia Celular del Centro Nacional de Rehabilitación y a sus colaboradores, mis amigos, QFB J. Beatriz Guzmán S. y QC Carlos Landa S., que de manera incondicional me brindaron sus conocimientos y mucho más para que fuera posible este trabajo.*
- *A todos mis maestros y gente de rehabilitación, especialmente a la Dra. Irma Espinosa y la Dra. Matilde Enríquez, que me dieron la oportunidad de poder ser algo más que un médico en rehabilitación.*
- *A todos mis amigos del Depto. de Bioquímica del Centro Nacional de Rehabilitación, especialmente a QFB Lupita Melo, Sr, Joel Méndez, M. en C. Carlos Martínez, QFB Martha Lira y QFB Cecilia Hdez. por todo su apoyo y los buenos momentos que pasamos juntos.*
- *A la M. en C. Guadalupe Cervantes Vázquez, encargada del área de citometría de flujo del Instituto Nacional de Cancerología por su ayuda para el marcaje de las células.*
- *Y finalmente a mi PADRE, que su presencia de amor y grandeza, me dio la fuerza para seguir en los momentos que llegué a caer.*

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	6
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1 INTRODUCCIÓN.....	8
2.2 Médula ósea: fuente de células inmaduras.....	9
2.3 Empleo de células de médula ósea en la regeneración de tejido dañado.....	13
2.4 Diferenciación de médula ósea a células neuronales.....	13
2.5 Aplicación de médula ósea en el manejo de la lesión medular.....	14
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4. OBJETIVO GENERAL.....	17
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
6. HIPÓTESIS.....	18
7. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	18
8. METODOLOGÍA.....	19
8.1 Obtención de médula ósea de tibia de rata.....	19

8.2 Obtención de la fracción de células mononucleares de médula ósea-sangre por la técnica de Ficoll.....	22
8.3 Obtención de células adherentes al plástico (mesenquimatosas) de una preparación de células mononucleares de médula ósea.....	24
8.4 Viabilidad y conteo de las células mesenquimatosas con azul de tripano.....	26
8.5 Caracterización inmunológica de las células adheridas al plástico por citometría de flujo.....	27
9. RESULTADOS.....	29
9.1 Aislamiento de médula ósea-sangre de tibia de rata.....	29
9.2 Obtención de células mononucleares de médula ósea por la técnica de diferencial de gradiente con Ficoll.....	30
9.3 Cultivo de células mononucleares de médula ósea-sangre: viabilidad y conteo.....	32
9.4 Células mesenquimatosas para Trasplante.....	35
9.5 Caracterización inmunofenotípica de las células mesenquimatosas.....	35
10. DISCUSIÓN .....	37
11. CONCLUSIÓN.....	43
12. REFERENCIAS.....	45
13. APÉNDICE.....	51

## 1. RESUMEN

Se han estudiado múltiples opciones para el manejo de la lesión medular. Una nueva opción es el trasplante de células inmaduras, planteándose su función de protección y/o reparación en el sitio de la lesión. Una fuente de células madre y/o progenitoras es la médula ósea. Las células de la médula ósea tienen la característica de ser accesibles y renovables. Hay una subpoblación de células mononucleares de la médula ósea que se adhieren al poliestireno recubierto de vitronectina: las células mesenquimatosas. Éstas se caracterizan por su estado de inmadurez, por lo que pudieran ser útiles en el manejo de la lesión medular. El objetivo de este estudio es obtener células mesenquimatosas autólogas de médula ósea de rata para su aplicación en el manejo de la lesión medular de la misma rata donadora, comprobar su inmunofenotipo y mantenerlas viables.

**Metodología.** Se obtuvo 500  $\mu$ l de médula ósea-sangre de una tibia de rata Wistar. Con técnica de gradiente de Ficoll se aisló una fracción de células mononucleares. Éstas se cultivaron en caja para cultivo de poliestireno modificado para la separación de las células mesenquimatosas. Su fenotipo inmunológico se determinó por citometría de flujo.

**Resultados.** El procedimiento quirúrgico para la obtención de la médula ósea de tibia de rata no afectó su marcha. Logramos obtener células mesenquimatosas adheridas a poliestireno en cantidad de 1000 cel/ $\mu$ l y viables en un 98% al noveno día de cultivo. Estas células mostraron un inmunofenotipo positivo para CD 10, CD 13 y CD 61.



**Conclusión.** Se obtuvieron células mesenquimatosas a partir de una fracción de células mononucleares aisladas de médula ósea, con inmunofenotipo característico, aunque con baja proliferación.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Introducción.

Se han buscado diferentes opciones para el manejo de tejidos lesionados en seres vivos, ya que en ocasiones son daños irreversibles, como es el caso de la lesión medular en el ser humano, dando como resultado discapacidad (Kirshblum, et. al., 1998; Hamilton, et. al., 1999). Uno de los métodos que han propuesto algunos investigadores por las propiedades de bloquear los procesos de inhibición del crecimiento neuro-axonal y disminuir el daño local en la lesión de la médula espinal es el trasplante de células, cuya función es la de protección y/o reparación en el mismo sitio de la lesión (Hofstetter, et. al., 2002; Azizi, et. al., 1998).

En esta última década se ha utilizado material celular embrionario, conocido como células madre (stem cells) para el trasplante en tejidos lesionados (Vogel, et. al., 2001). Las células madre tienen dos características: primero, pueden realizar copias de sí misma por largos periodos de tiempo, es decir, renovarse a sí mismas; segundo, estas células pueden diferenciarse en diferentes tipos de células maduras con morfología y funciones especializadas. Típicamente las células madre generan un tipo intermedio de células antes de que lleguen a un estado completamente diferenciado. Estas células intermedias son llamadas **células progenitoras o precursoras**. Las cuales se pueden encontrar en tejidos de feto como en tejidos de

adultos (Zigova, et. al., 1999) y están parcialmente indiferenciadas, teniendo la capacidad de diferenciarse en células maduras (Horwitz, et. al., 2000). Por lo que estas células son consideradas como material biológico "plástico" capaz de tomar características de diferentes tejidos (Vogel, et. al., 2001). El inconveniente del uso de células madre es la poca accesibilidad a estas células embrionarias (Sasaki, et. al., 2001). Además ha despertado controversia desde el punto de vista legal y ético el hecho de destruir embriones humanos para obtener sus células y utilizarlas en diferentes estudios (McLaren, et. al., 2001).

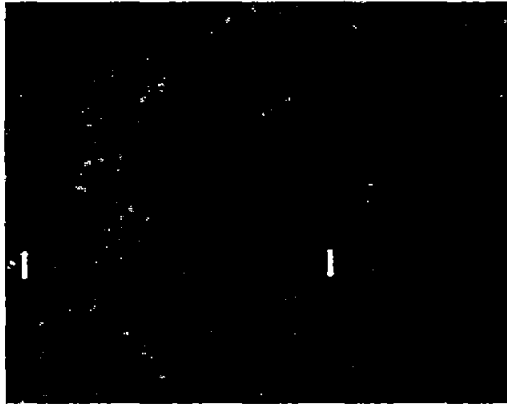
## **2.2 Médula ósea: fuente de células inmaduras.**

Se han encontrado otras fuentes capaces de darnos células madre y/o progenitoras, una de ellas es la médula ósea. Es un tejido compuesto de células inmaduras y diferenciadas de la línea hemática. Sin embargo, en los últimos años se ha observado su capacidad de diferenciarse en otros tejidos o líneas celulares diversas (Vogel, et. al., 2001).

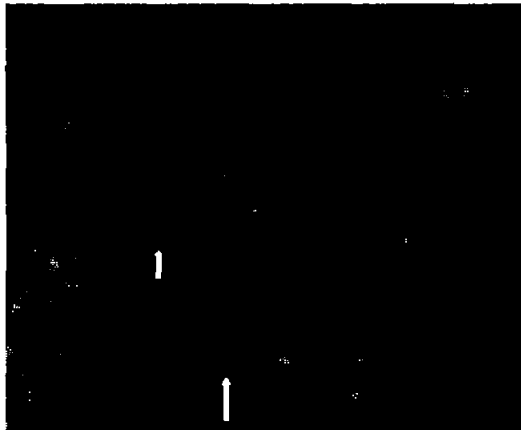
La presencia de células progenitoras en médula ósea fue sugerida por el patólogo alemán J. Cohnhein hace 130 años (Prockop, et. al., 1997). Encontrar células madre en la médula ósea es difícil. Las células madre hematopoyéticas que se encuentran en la médula ósea representan entre el 0.05% y 0.01% (Morrison, et. al., 1995). Es decir, se estima que sólo 1 de 10,000 a 15,000 células es una célula hematopoyética o madre (Weissman, 2000).

Se ha demostrado que algunas células de la médula ósea de ratón que se adhieren al plástico, al igual que algunas de las células de médula ósea de humano, pueden generar considerables unidades formadoras de colonias de la serie granulocítica-mieloide en cultivos a corto plazo *in vitro* (Gordon, 1994). Estas células que se adhieren al plástico son resistentes al tratamiento con 5-fluorouracilo (agente antineoplásico), lo que sugiere que ocupan un estadio de inmadurez (Gordon, et. al., 1987; Randall, et. al., 1998). Estas células formadoras de colonias son células mononucleares que se extraen de la médula ósea, revelando que pueden generar un tipo de célula inmadura que se adhiere al plástico de la caja de cultivo, dándole el nombre de células estromales (Gordon, 1994). Las células estromales de médula ósea son capaces de crecer *in vitro* sin la necesidad de agregar factores de crecimiento al cultivo para su proliferación (Morrison, et. al., 1995; Ferrari, et. al., 1998).

Las células adherentes al plástico de la médula ósea fueron descritas primeramente como células estromales, pero más recientemente se les conoce como células mesenquimatosas por su capacidad de diferenciarse en tejido muscular, óseo, condral y líneas adipogénicas. (Donovan, et. al., 2001; Hofstetter, et. al., 2002). Las células mesenquimatosas o estromales fueron descritas por primera vez en los 70's por Friedenstein (Friedenstein, et. al., 1976), quien mostró su capacidad de adhesión al plástico y su diferenciación en otras líneas celulares (Prockop, et. al., 1997, 2002). Se puede definir entonces que las células mesenquimatosas son células de la médula ósea capaces de regenerarse a sí mismas y dar origen a uno o más tejidos mesenquimatosos (Hofstetter, et. al., 2002), además de otros tejidos (Fig. 1 y 2).



**Fig 1.** Imagen de células mesenquimatosas tomada de Gordon, 1994. Micrografía de un cultivo celular de médula ósea de humano adherida al plástico, con 3 semanas de proliferación. Células mesenquimatosas (flechas negras); matriz extracelular (flechas en bloque).



**Fig 2.** Imagen ampliada de células mesenquimatosas tomada de la figura 1. Células mesenquimatosas (flechas negras); matriz extracelular (flecha en bloque).

Se encontró que las células mesenquimatosas en cultivo expresan los marcadores de superficie celular CD34+ y una proporción variable de Thy-1 (CD90) demostrando su grado de inmadurez (Gordon, 1994; Morrison, et. al., 1995). Sin

embargo con el tiempo, se ha encontrado mayor diversidad en el fenotipo de las células mesenquimatosas.

Se ha encontrado que células mesenquimatosas de médula ósea de humano expresan CD10, CD 13, CD 56, en menor cantidad CD 61, CD 90, CD 105, CD 140b, CD 164 y CD 172a, además encontraron CD 109, CD 140b, CD 164 y CD 172a. También se demostró que los marcadores de superficie CD 15, CD 45, CD 34, CD 117, CD 133 y CD 167a no se expresaban en estas células. Estos datos coincidieron con los que se encontraron en células mesenquimatosas humanas adquiridas en un laboratorio comercial. Las células con tal inmunofenotipo son típicamente células de médula ósea que se adhieren al plástico de la caja de cultivo (Horwitz, et. al., 2000; Clark, et. al., 1995; Jiang, et. al., 2002). Más recientemente se ha determinado que el inmunofenotipo de estas células es CD 10/13 y Thy-1 (CD 90) positivo, y CD34/45 negativo (Horwitz, et. al., 2000; Javazon, et. al., 2001). También se encontró similitud entre células mesenquimatosas de médula ósea y células progenitoras neuronales en cuanto a sus marcadores de superficie en CD 90, CD 164 y CD 172a. Ambos tipos celulares expresan frecuentemente la proteína nestina -proteína que sintetizan las neuronas inmaduras- (Vogel, et. al., 2003).

Los cultivos de células mesenquimatosas forman una matriz extracelular que incluye colágena tipo I, fibronectina y colágena tipo IV (Clark, et. al., 1995). Además sintetizan interleucina (IL)-6, IL-11 (Mareishi, et. al., 2001), IL-7, IL-8 e IL-11 (Prockop, 1997).

### **2.3 Empleo de células de médula ósea en la regeneración de tejido dañado.**

Existe una gran cantidad de experimentos que han utilizado células que derivan de la médula ósea por su capacidad de diferenciación a otros tejidos.

El trasplante de médula ósea en zonas de infarto cardíaco en ratón ha demostrado la formación de nuevo tejido cardíaco a partir del tejido trasplantado con mejoramiento de la función ventricular (Vogel, et. al., 2001; Orlic, et. al., 2001; Sussman, 2001). La inyección local o sistémica de médula ósea en ratón puede reparar músculo esquelético, regenerando las fibras musculares dañadas químicamente (Ferrari, et. al., 1998). El uso de médula ósea en ratón con deficiencia enzimática hepática ha permitido una mejor función hepática, además de la formación de nuevo tejido hepático (Lagasse, et. al., 2000).

### **2.4 Diferenciación de médula ósea a células neuronales.**

Células de médula ósea de rata y humano se han diferenciado *in vitro* en células con morfología neuronal (Woodbury, et. al., 2000). Estas células en medio de cultivo con agentes antioxidantes como beta-mercaptoetanol presentaron morfología neuronal en el 78% de las células inducidas. También se encontró presente la proteína nestina (Woodbury, et. al., 2000).

Kopen, et. al., 1999 trasplantando médula ósea (células mesenquimatosas) por inyección directa a ventrículo lateral de ratón neonatal, observaron que dichas

células podían diferenciarse *in vivo* en astrocitos y neuronas, además de desplazarse a través del cerebro del animal. Esta observación demuestra que las células mesenquimatosas se comportan como células madre neuronales (Azizi, et. al., 1998).

Células tomadas directamente de médula ósea y trasplantadas a cerebro de rata dañado por isquemia, se dirigen a las zonas lesionadas, encontrando un 55% más de células derivadas de médula ósea en el sitio afectado que en el lado contralateral sano (Eglitis, et. al., 1999).

## **2.5 Aplicación de médula ósea en el manejo de la lesión medular.**

El trasplante de médula ósea de células mononucleares a una lesión medular desmielinizante de ratas, logra la remielinización (Sasaki, et. al., 2001).

Chopp, et al., 2000 demostraron que el trasplante de células mesenquimatosas de médula ósea a una lesión medular en rata después de una semana, resultó en una mayor recuperación de la función motora de las patas traseras del modelo lesionado a partir de la segunda semana del trasplante. El análisis inmunohistoquímico del tejido trasplantado a la quinta semana después de la cirugía, mostró que las células de médula ósea expresaban un fenotipo neuronal por presentar positivo para NeuN (antígeno nuclear neuronal) y nestina (Chopp, et. al., 2000).



Realmente se desconoce el mecanismo de acción por medio del cual al realizar un trasplante de células de médula ósea existe la mejoría en la función motora. Se cree que probablemente estas células mesenquimatosas se integren a la zona dañada o que dichas células liberen factores de crecimiento capaces de promover la recuperación o activación de mecanismos compensatorios.

Está descrito que la presencia de factores de crecimiento en la zona de lesión medular en ratas ha provocado una mayor recuperación motora, contribuyendo a modificar el daño en el sitio de lesión del tejido nervioso (Rabchevsky, et. al., 2000). Algunos estudios han demostrado que las células que derivan de células progenitoras se integran al tejido diferenciado *in vivo*, interactuando apropiadamente con sus células vecinas. Tal es el caso de cultivos de médula ósea de humano y de astrocitos de rata que disminuyeron la gliosis o la infiltración de leucocitos alrededor del trasplante de estas células en el interior de cerebro de rata (Azizi, et. al., 1998).

Sin embargo, no se ha descrito en la literatura el aislamiento de células mesenquimatosas de un mismo organismo sin ser dañado, siendo importante para realizar algún trasplante en el mismo organismo, con lo que se evita una posible reacción cruzada entre ambos tejidos. Por ejemplo Azizi, et. al., 2001 utiliza ciclosporina como inmunosupresor en el trasplante de médula ósea a médula espinal desmielinizada, obteniendo buenos resultados. Chopp, et. al., 2000 en su trabajo no utiliza inmunosupresor y también con buenos resultados en el trasplante celular a médula espinal. Sin embargo para una posible aplicación en humano la primera elección será el uso de tejido autólogo para evitar rechazo.

En este trabajo nos dimos a la tarea de obtener células mesenquimatosas de médula ósea de rata, sin la necesidad de sacrificar al donador, tipificarlas para comprobar su identidad (fenotipo inmunológico) y mantenerlas viables por un período corto de tiempo en medio de cultivo.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El uso actual de células indiferenciadas (células embrionarias) es un campo fértil en el manejo experimental de lesiones de tejidos *in vivo*. Sin embargo su obtención y cuidados son complicados, sin olvidar aspectos éticos. Por lo que es necesario encontrar otra fuente de células inmaduras, de fácil acceso, renovable y que requieran cuidados relativamente sencillos sin provocar daño al donador.

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Obtener y mantener en cultivo células mesenquimatosas de médula ósea de rata viva para su aplicación en el manejo de médula espinal lesionada.

### **5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A. Obtener médula ósea de rata viva.
- B. Aislar una fracción de células mononucleares de médula ósea de rata.
- C. Estandarizar la técnica de cultivo en cajas de plástico para la proliferación y supervivencia de células mesenquimatosas de médula ósea de rata.
- D. Cuantificación de células mesenquimatosas en el medio de cultivo.
- E. Identificar el fenotipo inmunológico de las células mesenquimatosas definido.

## **6. HIPÓTESIS**

Las células de médula ósea de rata adheridas al plástico en cajas de cultivo son células mesenquimatosas viables.

## **7. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

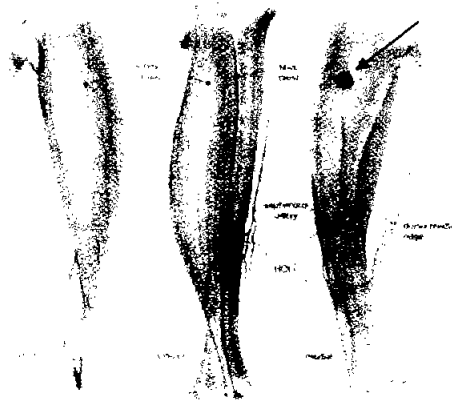
Observacional, descriptivo, prospectivo y transversal.

## 8. METODOLOGÍA

### 8.1 Obtención de médula ósea de tibia de rata.

Se obtiene 500 µl de médula ósea de la tibia de una de las extremidades de rata de la cepa Wistar, con peso de 250 g a 300 g. Los cuidados generales de los animales de experimentación están basados en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Ver apéndice). El animal es anestesiado con una mezcla de ketamina 65 mg/kg (Lab. Cheminova 1 g) y xilacina 10mg/kg (Bayer, 20 mg/ml) por vía intraperitoneal (Franco-Bourland, 1998). Se coloca la rata en decúbito dorsal y se fijan las 4 extremidades con cinta adhesiva. Se realiza tricotomía de toda la extremidad en la que se va a trabajar. Se aplica con gasa estéril una solución de isodine espuma (Promeco, 8 g/100 ml) en toda la extremidad, incluyendo pata y parte de pelvis. Se cubre a la rata con campos estériles dejando libre la extremidad en la que se va a operar. Se realiza una incisión con hoja de bisturí del No. 11 de 5 mm de longitud en el tercio superior y cara medial en tibia, cortando únicamente piel y tejido subcutáneo (Fig. 3). Por medio de pinzas de mosco, se disecan los tejidos blandos hasta lograr visualizar la tibia, dejando una área expuesta de tejido óseo. Dicha zona se mantiene siempre limpia de sangre. Con soporte para broca manual y una broca con un diámetro de 1.6 mm (Triumph) se realiza una perforación en el tejido óseo manualmente en posición perpendicular a la superficie de la tibia (Landry, et. al., 1996), evitando que la broca resbale y dañe estructuras contiguas (Fig. 4). La perforación se realiza de manera firme, suave sin aplicar demasiada

presión sobre el soporte de la broca. La perforación se detiene hasta el momento en que la punta de la broca llega al canal medular (esto se denota por la disminución de la resistencia de manera súbita en el giro de la broca). Otra manera de saber que estamos en el sitio indicado es que al retirar la broca se presenta un sangrado importante del orificio realizado en la tibia.



**Fig 3.** Imagen de zona donde se realiza perforación en tibia de rata (flecha). Se considera esta zona por su fácil acceso al hueso. Imagen modificada, tomada de Landry, et. al., 1996.



**Fig 4.** Imagen de perforación con broca de 1.6 mm de diámetro en tibia de rata.

Previo a la perforación, se prepara una jeringa de 3 ml con aguja de 22G x 32 mm (BD Plastipak, cat. 302541). A la aguja se le inserta un tubo de polipropileno de 5 cm de longitud y 0.58 mm de diámetro interno (PE 50, Becton Dickinson, cat. 7410). La jeringa es lavada en su interior con 200  $\mu$ l de heparina (PISA, 1 000 UI/ml). Se coloca el extremo libre del tubo de polipropileno dentro de la perforación de la tibia y se aspira mediante el émbolo de la jeringa de una manera suave. Al momento que ingresa médula ósea y sangre a la cámara se agita la jeringa, no bruscamente, con la finalidad de mezclar el contenido y la heparina, previniendo la coagulación del material biológico. Esto se realiza constantemente mientras siga entrando médula ósea y sangre al interior de la jeringa. Este procedimiento dura hasta que se completen 500  $\mu$ l (Fig. 5).

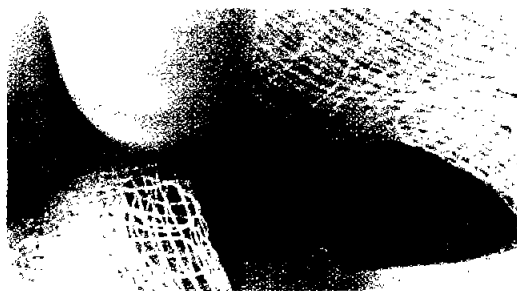


Fig 5. Aspirado de médula ósea-sangre de tibia de rata con tubo de polipropileno.

No es factible aspirar una menor cantidad de médula ósea por el número reducido de células que se obtienen, y tampoco es posible aspirar una mayor cantidad por la

posibilidad de que se coagule la muestra. Al terminar, se retira el tubo de polipropileno de la perforación y se aplica sobre ésta una gasa estéril por un período de 5 minutos aproximadamente para detener el sangrado. Verificando que definitivamente no existan datos de sangrado activo de la tibia de la rata, se cierra la herida quirúrgica en un solo plano con sutura de nylon 3-0. Se vuelve a limpiar la herida con isodine espuma y se mantiene la rata a temperatura ambiente hasta la recuperación de la anestesia.

## **8.2 Obtención de la fracción de células mononucleares de médula ósea-sangre por la técnica de diferencial de gradiente con Ficoll.**

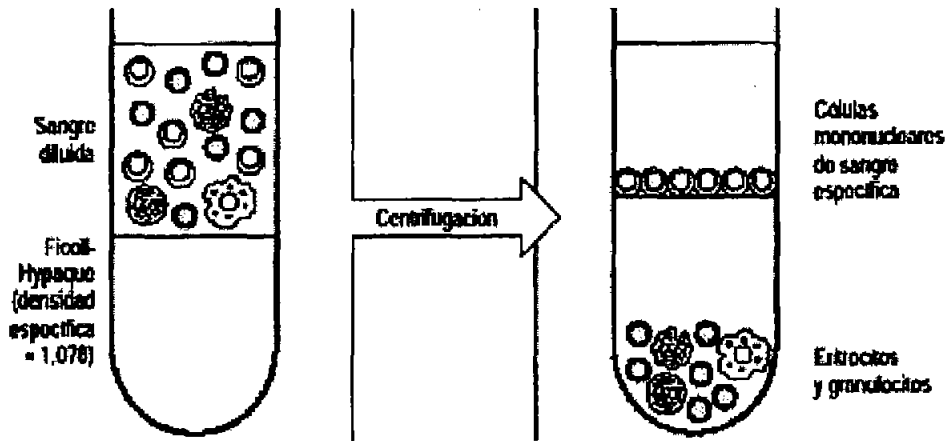
Los 500  $\mu$ l de médula ósea y sangre obtenidos se colocan inmediatamente en tubos de cultivo estériles de poliestireno de 5 ml con tapa de dos posiciones (Sarstedt, cat. 55.476.013) conteniendo 1.5 ml de medio de cultivo L-15 Leibovitz con rojo de fenol y L-glutamina (GibcoBRL, cat. 11415064). Se agita la muestra biológica muy suavemente en el tubo hasta formar una mezcla homogénea entre el medio y la médula ósea.

En otro tubo de cultivo de 5 ml de las mismas características previamente descritas, se colocan 3 ml de Lymphoprep estéril (Ficoll, Nycomed, cat. 10094302). Se toman con pipeta automática (Finnpipette colour, 200-1000  $\mu$ l) 2 ml de la mezcla de médula ósea-sangre y medio L-15 y se colocan en el tubo que contiene Lymphoprep, dejando escurrir por las paredes del tubo dicha mezcla de una manera lenta para evitar que se mezcle la muestra con el Ficoll. Se tapa el tubo y se centrifuga (Hermle Z320) a una velocidad de 400 x g (1600 rpm en nuestra centrifuga) por 30 minutos,



sin utilizar freno, a temperatura ambiente. Mostramos la formula de conversión de rpm a (x g):  $RCF = 0.00001118 \times \text{radio de rotación (cm)} \times (\text{rpm})^2$  (Manual de aplicaciones, IEC International Equipment Company).

Al término, se retira el anillo de células mononucleares o capa linfocitaria que se forma entre las dos fases. Con el uso de pipeta automática (Finnpipette colour, 40-200  $\mu\text{l}$ ) se recolectan cuidadosamente 200 a 300  $\mu\text{l}$  de la zona de interfase, evitando en lo posible aspirar de la fase de Lymphoprep (Fig. 6).



**Fig 6.** Esquema de la separación de células mononucleares con técnica de diferencial de gradiente y uso Ficoll. En el tubo de la izquierda se encuentra en la fase superior la mezcla de médula ósea-sangre y medio L-15. La fase inferior es Ficoll con una densidad de 1.077 g/ml. La centrifugación se realiza a 400 x g. Posteriormente en el tubo de la derecha se encuentra la capa de células mononucleares separadas en el límite superior de la fase de Ficoll. En el fondo del tubo se encuentran eritrocitos, granulocitos y plaquetas.

La fracción de células mononucleares que se obtuvo se coloca posteriormente en otro tubo para cultivo y se le agrega 500  $\mu\text{l}$  de una solución isotónica de cloruro de

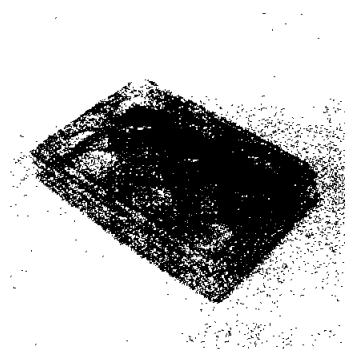
sodio 0.9% (Abbott) con la finalidad de eliminar el Ficoll de la muestra. Este tubo se centrifuga a 234 x g (1200 rpm en nuestra centrífuga) por un periodo de 5 min sin uso de freno. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células nuevamente en 300 µl de solución isotónica de cloruro de sodio 0.9%.

### **8.3 Obtención de células adherentes al plástico (mesenquimatosas) de una preparación de células mononucleares de médula ósea.**

Toda la preparación de medios de cultivo, cultivo de las células, pases y cualquier actividad que implique la manipulación celular, se realiza en condiciones de esterilidad trabajando dentro de la campana de flujo laminar horizontal encendida, la cual antes y al final de la sesión de trabajo se limpia con una solución de hipoclorito de sodio 1% y se enciende la lámpara ultravioleta y el flujo de aire por 20 minutos.

El volumen obtenido de células mononucleares es cultivado en cajas para cultivo con 6 pozos, cada uno de 9.5 cm<sup>2</sup> de área de crecimiento (Sarstedt, cat. 83.1839.300). La superficie de cultivo está hecha de plástico modificado (poliestireno) para el crecimiento y la adhesión celular, sin la necesidad de usar otro factor. Esto se debe a que en la superficie de crecimiento celular tiene componentes de nitrógeno cargados positivamente, lo que permite que las células se adhieran al plástico más fácil (Manual Sarstedt, 2002/2003). Se utilizan dos pozos para el cultivo. A cada uno se le coloca 1.5 ml de medio de cultivo de Iscove que es una modificación del medio de Dulbecco con L-glutamina y rojo de fenol (IMDM, GibcoBRL, cat. 12440046), con 10% de suero fetal bovino (Gibco, cat. 26140-087) y

10 ml/l de antibiótico (10,000 U/ml penicilina G sódica, 10,000  $\mu$ l/ml sulfato de estreptomina y 25  $\mu$ l anfotericina B. GibcoBRL, cat. 15240-062). Se utiliza 150  $\mu$ l de la suspensión de células y solución isotónica para cultivar en cada pozo. Se incubaba a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>, en ambiente húmedo (National Weinicke Company) por 3 días (Fig. 7).



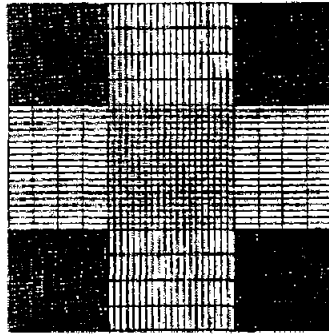
**Fig 7.** Cajas para cultivo de poliestireno con 6 pozos para células de difícil adhesión. El plástico de la caja de cultivo contiene componentes nitrogenados cargados positivamente, facilitando la adhesión de las células a la superficie de crecimiento.

Se vigila diariamente la integridad de las células mediante el uso de un microscopio invertido (Axiovert 25, Zeiss), así como de la cantidad de medio de cultivo en cada pozo. Al cuarto día se realiza el primer y único cambio de medio de cultivo; se agita la caja moderadamente y se retira por medio de pipeta automática el medio, se vuelve a colocar 500  $\mu$ l de medio IMDM con agitación suave para después retirarlo. Con estos dos movimientos se eliminan las células no adheridas. Finalmente se colocan 2 ml de medio IMDM con 10% de suero fetal bovino y 10 ml/l de la solución de antibiótico con penicilina G sódica, sulfato de estreptomina y anfotericina B. Se

revisan a las células verificando su integridad y que se encuentren adheridas al plástico de la caja de cultivo.

#### **8.4 Viabilidad y conteo de las células mesenquimatosas con azul de tripano.**

Para conocer la viabilidad de las células cultivadas y contarlas, se utiliza la técnica de azul de tripano en cámara de Neubauer. Para hacer el recuento celular solo consideramos las células que se encuentran en los cuatro cuadrantes en las esquinas de la cuadrícula principal (Fig. 8). Se toman 400 µl de azul de tripano al 0.4% ( Gibco, cat. 15250-061) y se colocan en un tubo de vidrio de ensayo limpio. Se agrega 100 µl de la suspensión de células mesenquimatosas para tener una dilución 1:5. Se agita de manera moderada e inmediatamente después por medio de pipeta Pasteur se coloca una gota en cada extremo de los rectángulos centrales de la cámara de Neubauer (American Optical Company) exactamente en el borde del cubreobjetos. Así la muestra fluye por el rectángulo de la cámara. Nos aseguramos que dicho rectángulo se encuentre totalmente lleno de muestra sin que éste rebose a los surcos laterales. Posteriormente se coloca la cámara en microscopio de luz y se observa la cuadrícula de la cámara con objetivo de 10X. Se hace la cuenta total de células. Las células viables son aquellas que presentan una coloración verdosa-birrefringente en su interior y las células muertas son aquellas que presentan una coloración azulosa por haber permitido el paso del colorante a través de su membrana.



**Fig 8.** Cuadrícula de la cámara de Neubauer. Formada por 9 cuadros en su interior de 1 mm en cada lado con una altura de 0.1 mm con respecto al cubreobjeto que se coloca sobre la cuadrícula. El volumen de cada cuadrante es de  $0.1 \text{ mm}^3$  que al sumar los 4 cuadrantes marcados dan un total de  $0.4 \text{ mm}^3$ , por lo que es el total de células cuantificadas en este volumen. Por regla de tres llevamos los valores a  $1 \text{ mm}^3$ . Estos valores corresponden a una dilución con el colorante 1:1, cómo se utiliza una dilución 1:5 para proteger la integridad de las células, el valor obtenido en la anterior ecuación se multiplica por 5. El resultado final nos indica el número total de células por  $\text{mm}^3$ . Davidsohn, et. al., 1972.

### **8.5 Caracterización inmunológica de las células adheridas al plástico por citometría de flujo.**

Al tercer día de cultivo de las células mesenquimatosas de médula ósea, se realiza el marcaje de las células para identificar su fenotipo. Se despegan las células con el uso de raspador estéril (scraper cell. Sarstedt, cat. 83.1830) (Fig 9) posterior a un lavado con solución isotónica de cloruro de sodio al 9%. Una vez obtenidas las células se agregan  $600 \mu\text{l}$  de solución fisiológica 0.9% de cloruro de sodio. Posteriormente se distribuye el material en 3 tubos de cultivo colocando  $200 \mu\text{l}$  en cada uno y  $5 \mu\text{l}$  de anticuerpos para CD 10, CD 13 y CD 61 (anticuerpos de ratón anti-humano, Beckman Coulter) dejando reposar por 15 min en la obscuridad. Posteriormente se colocan en citómetro de flujo para su análisis (Epics XL, Beckman Coulter).



**Fig 9.** Desprendimiento de células mesenquimatosas con el uso de descamador estéril. Con lo que se sustituye el uso de métodos enzimáticos (tripsina) para desprender las células de la superficie de crecimiento.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Aislamiento de médula ósea-sangre de tibia de rata.

Se logró el aislamiento de médula ósea-sangre (Fig. 10) de una tibia de la rata. El procedimiento quirúrgico no afecta el estado general de la rata. No hay daño importante en la tibia. El inicio de la recuperación del tejido óseo en el sitio de la perforación es entre el día 5 y 14 (Landry, et. al., 1996). No se afecta la marcha del modelo animal.

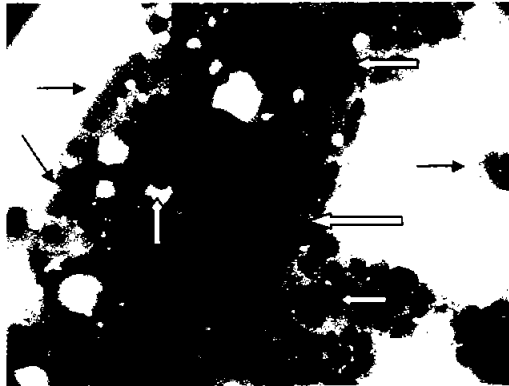


Fig 10. Micrografía de frotis de médula ósea-sangre de rata con tinción de hematoxilina-eosina. Aumento a 100X en microscopio de luz. Megacariocito (flecha en bloque negra); células mononucleares (flechas en bloque blancas) y globulos rojos (flechas).

## 9.2 Obtención de células mononucleares de médula ósea por la técnica de diferencial de gradiente con Ficoll.

Se obtuvo 500  $\mu$ l de médula ósea-sangre de una tibia de rata de acuerdo a la técnica descrita en metodología. Ésta se mezcló con 1.5 ml de medio L-15 Leibovitz en una tubo para cultivo. Regularmente se agitaba con suavidad el tubo para evitar la formación de coágulos (Fig. 11).

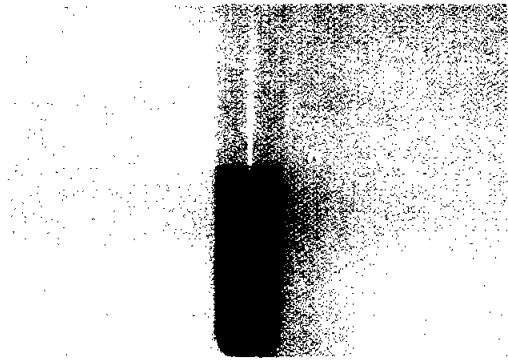
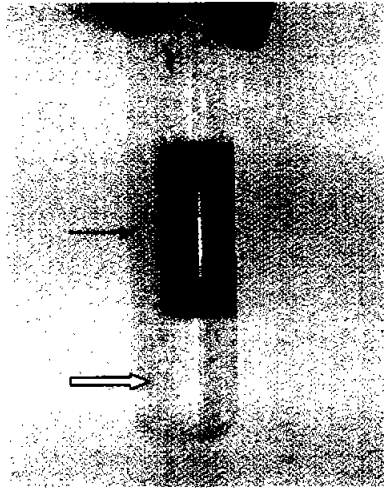


Fig 11. Imagen de mezcla de 500  $\mu$ l de médula ósea-sangre de rata con 1.5 ml de medio L-15 Leibovitz.

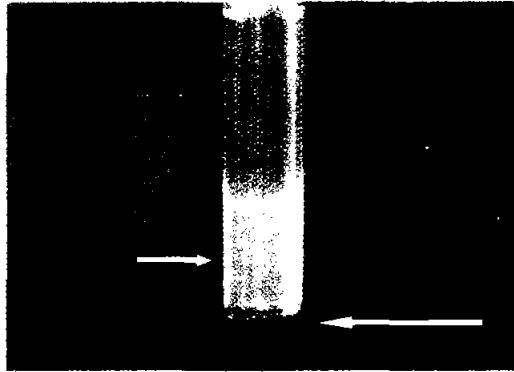
Se tomaron 2 ml de la mezcla de médula ósea-sangre de rata y medio L-15, se colocaron en un tubo de cultivo que previamente tenía 3 ml de Ficoll. Este procedimiento se hace con cuidado para evitar que se rompan las dos fases que se forman (Fig. 12).





**Fig 12.** Mezcla de médula ósea-sangre en medio L-15 sobre Ficoll antes de centrifugar. La fase superior está formada por médula ósea-sangre y medio L-15 (flecha). La fase inferior es de Ficoll con una densidad de 1.077 g/ml (flecha de bloque).

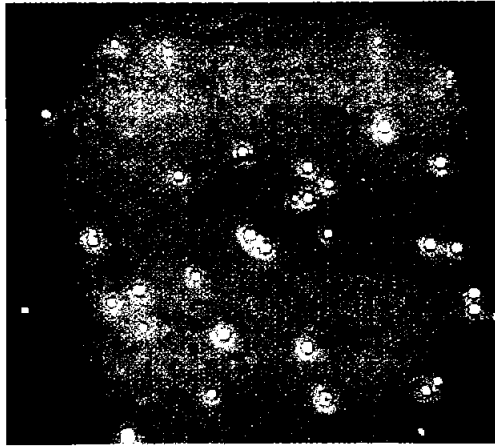
Después de centrifugar la muestra a 400 x g por 30 minutos, se logró obtener en la interfase un anillo blanquecino formado por células mononucleares provenientes de la muestra de médula ósea-sangre. En el fondo del tubo sedimentaron eritrocitos, plaquetas y otros elementos que no fueron separados (Fig. 13).



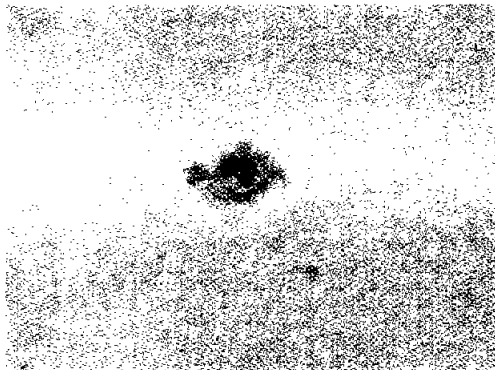
**Fig 13.** Mezcla de médula ósea-sangre sobre Ficoll después de centrifugar. Se observa el anillo blanquecino que se encuentra en la interfase formado por células mononucleares (flecha). La fase superior formada por plasma de la muestra original (flecha en bloque negra). Fase inferior formada de Ficoll (flecha en bloque blanca). En el fondo del tubo encuentran células como eritrocitos y plaquetas (flecha en bloque larga).

### **9.3 Cultivo de células mononucleares de médula ósea-sangre: viabilidad y conteo.**

Las células que cultivamos presentan una morfología esférica, separadas entre si, no se observa claramente su matriz extracelular que forman para la adhesión al plástico. Sin embargo corroboramos su adhesión agitando la caja y al realizar su lavado en el cuarto día del cultivo (Fig 14 y 15).

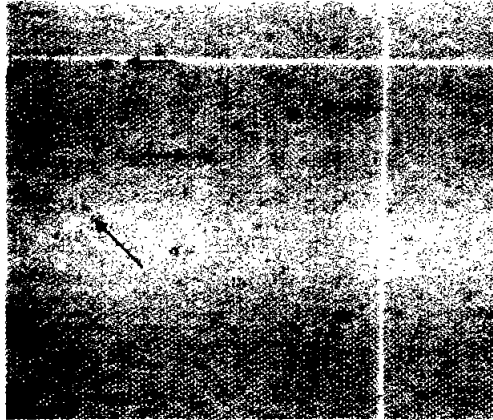


**Fig 14.** Imagen de células mesenquimatosas en microscopio invertido con aumento de 40X. Células adheridas al plástico (flechas) al cuarto día del cultivo posterior al lavado con medio IMDM.

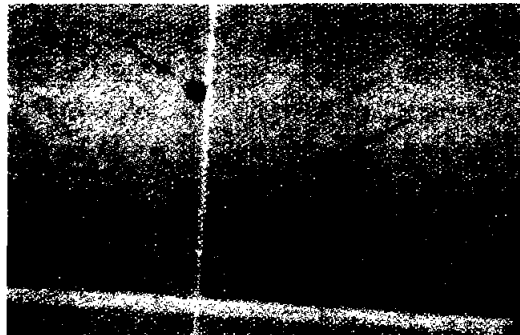


**Fig 15.** Imagen de célula mesenquimatosas en microscopio invertido con aumento de 40X, modificada para su mejor apreciación. Se observa en la periferia de la célula su matriz extracelular para adherirse al plástico.

Se verificó la viabilidad de las células mesenquimatosas mediante la técnica de azul de tripano y la cámara de Neubauer en el noveno día de cultivo, encontrándose en promedio 1000 cel/ $\mu$ l con una viabilidad del 98% (Fig. 16 y 17).



**Fig 16.** Conteo de células mesenquimatosas vivas con tinción de azul de tripano en cámara de Neubauer al microscopio de luz con aumento de 10X. El color verde birrefringente (retocado) nos indica que las células se encuentran en buen estado (flechas).



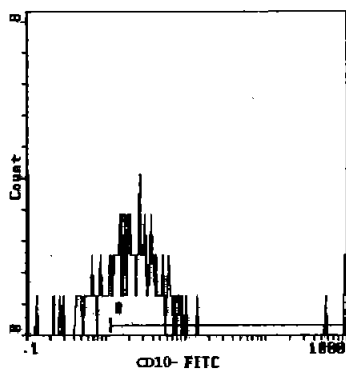
**Fig. 17** Imagen de células mesenquimatosas muertas con tinción de azul de tripano en cámara de Neubauer al microscopio de luz con aumento de 10X. Se observan las células de color azul (retocado) por permitir el paso del colorante a través de su membrana celular (flechas).

#### **9.4 Células mesenquimatosas para trasplante.**

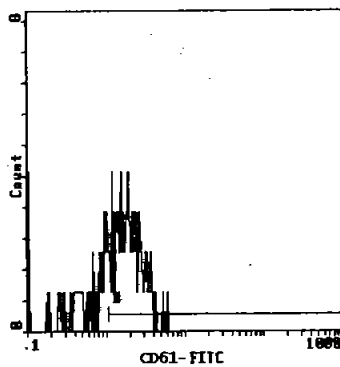
Al noveno día se despegan las células del cultivo mediante el uso del descamador estéril. Se coloca la hoja del descamador en el pozo y se arrastra por toda el área de crecimiento en una sola ocasión para evitar daño celular. Con esto evitamos el uso de medios enzimáticos como la tripsina, protegiendo a nuestras células de su actividad proteolítica. Se aspiran las células y el medio de cultivo del pozo con pipeta automática. Se colocan en tubo para cultivo de 5 ml y se centrifuga a 234 x g por 5 min. Se elimina el medio de cultivo y se resuspenden las células en 300 µl de medio IMDM. En este momento se tienen las células mesenquimatosas aisladas y en condiciones para ser trasplantadas.

#### **9.5 Caracterización Inmunofenotípica de las células mesenquimatosas.**

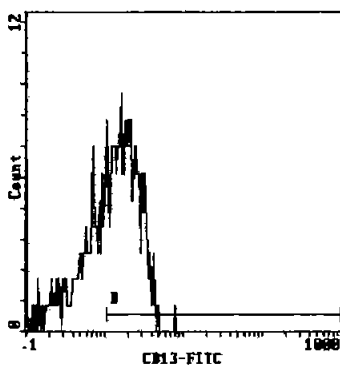
La tipificación del inmunofenotipo de las células que se encontraban en el medio de cultivo al tercer día fue positivo para los tres anticuerpos que se utilizaron, es decir para CD 10, CD 13 y CD 61 (Fig. 18).



A. Gráfica para CD-10.



C. Gráfica para CD-61.



B. Gráfica para CD-13.

**Fig 18.** Fenotipo inmunológico de las células mesenquimatosas de médula ósea de rata. Análisis por citometría de flujo. A. Gráfica para CD-10, se observa que en el eje horizontal de la gráfica se encuentra desplazada la curva hacia la derecha, por lo que se considera positivo el marcaje. B. Gráfica para CD-13, de manera igual la curva se desplaza hacia la derecha por lo que es un valor positivo. Una curva alta con respecto al eje vertical nos indica mayor cantidad de estas células. C. Gráfica para CD-61, también se encuentra positivo en nuestras células mesenquimatosas aisladas.

## 10. DISCUSIÓN

El uso de células madre (stem cells) en trasplantes es una práctica que actualmente ha tomado mucha importancia por su capacidad de diferenciarse en otros tejidos, como en neuronas y astrocitos. Sin embargo, no es fácil obtenerlas por su compleja localización en organismos adultos (McDonald, et. al., 1999), los aspectos morales y éticos que implica el aislarlas de embriones humanos (McLaren, 2001) y los cuidados para mantenerlas en cultivo (Mareschi, et. al., 2001).

La médula ósea es también una fuente de células inmaduras que son capaces de diferenciarse en otros tejidos (Vogel, et. al., 2001). Esta fuente de obtención tiene la ventaja añadida de su accesibilidad y su pronta recuperación.

Se ha usado médula ósea como fuente de células a trasplantar en rata con lesión medular (Chopp, et. al., 2000). Estamos interesados en trasplantar la médula ósea autóloga como fuente de células inmaduras para el manejo de la misma rata con lesión medular.

Dado que la forma de evaluar el efecto del trasplante sobre la rata lesionada es en base a su desempeño en una escala motora de locomoción, es indispensable asegurar que ésta no se afecte durante la toma de la médula ósea. Por lo que la obtención de médula ósea fue a partir de un solo hueso largo (tibia) con daño mínimo en tejidos blandos.

Al realizar la perforación en el hueso de tibia de la rata, se provoca un sangrado importante dentro del canal medular del hueso. Este fenómeno de sangrado favorece la obtención de médula ósea porque la sangre arrastra las células de la médula ósea al momento de aspirar. Entonces, la muestra que se recupera es una mezcla de células de médula ósea y sangre que denominamos médula ósea-sangre.

La cantidad que obtuvimos de médula ósea-sangre fue en promedio de 500  $\mu$ l. La presencia de las células mononucleares de la sangre en la muestra de médula ósea-sangre, nos permitió separar las células mononucleares de la médula ósea mediante el diferencial de gradiente de una manera fácil y eficaz. Un menor volumen de la muestra de médula ósea-sangre nos dificultaría observar el anillo linfocitario que se forma sobre el Ficoll y aislar las células mononucleares de la médula ósea.

El Lymphoprep que utilizamos para separar a las células mononucleares es una mezcla de Ficoll (polímero de sacarosa) y diatrizoato de sodio, los cuales forman una solución con una densidad de 1.077 g/ml. Con esta preparación podemos eliminar de la muestra de médula ósea-sangre por sedimentación eritrocitos, plaquetas y otras células (Azizi, et. al., 1998; Colter, et. al., 2000; Sasaki, et. al., 2001). El porcentaje de células mononucleares que se aíslan mediante el diferencial de gradiente con el uso de Ficoll es del 95%, con una viabilidad mayor del 90% (Manual de reactivos de Amersham Biosciences). Estas células que se aíslan son células hematopoyéticas, no hematopoyéticas, células precursoras y linfocitos, teniendo la capacidad de proliferar y diferenciarse (Azizi, 1998).



Las células mesenquimatosas tienen la propiedad de adherirse al plástico, lo que nos permite eliminar del aislado semipurificado las otras células mononucleares que no requerimos. Estas células mesenquimatosas proliferan fácilmente y se diferencian, en comparación de células obtenidas de cordón umbilical, que además tienen una menor supervivencia (Mareishi, et. al., 2001).

Se ha descrito que la capacidad de adherencia de las células mesenquimatosas en plástico se presenta fácilmente (Colter, et. al., 2000; Javazon, et. al., 2001). Sin embargo, al inicio de nuestro trabajo no logramos la adhesión de las células. Por comunicación personal con el Dr. Michel Chopp, nos refirió que rutinariamente manejan en su laboratorio cajas de plástico para cultivo tratadas para una óptima adhesión de las células mesenquimatosas. Estas cajas están hechas de poliestireno, el cual presenta una mejor superficie para la adhesión de estas células (Laluppa, et. al., 1997). Este plástico contiene en su superficie componentes nitrogenados cargados positivamente lo que permite la adsorción en el poliestireno de fibronectina y vitronectina que se encuentran en el suero con el que se enriquece al medio de cultivo, facilitando la adhesión de la células mesenquimatosas al plástico (Steele, et. al., 1993; Steele, et. al., 1993; Steele, et. al., 1995; Mc Farland, et. al., 1999). Por lo que se trabajó con cajas de cultivo de plástico especial de poliestireno y áreas de cultivo de 9.5 cm<sup>2</sup>. Las células mesenquimatosas de la muestra de médula ósea-sangre lograron adherirse y proliferar con buena supervivencia por nueve días, suficiente y necesaria para su aplicación en trasplantes a modelos animales con lesión medular (Hofstetter, et. al., 2002).

El medio de cultivo que se utilizó para el manejo de las células mesenquimatosas fueron escogidos por su capacidad demostrada de mantener viables las células, sin influir en su estado de inmadurez. El medio de cultivo L-15 Leibovitz es un medio enriquecido que se utiliza ordinariamente para el apoyo en el crecimiento de algunas líneas celulares (Manual de Invitrogen; Sasaki, et. al., 2001). Aquí, este medio de cultivo fue usado para mantener temporalmente y transportar la muestra de médula ósea-sangre. El medio de cultivo de Iscove que es una modificación del medio de Dulbecco (IMDM) ha sido utilizado para mantener precursores de eritrocitos y macrófagos, sin la necesidad de enriquecer el medio (Manual de Sigma). También ha sido utilizado para mantener células mesenquimatosas en buenas condiciones (Chopp, et. al., 2000). Ambos medios de cultivo L15 e IMDM contienen rojo de fenol, empleado habitualmente para un mejor control de las condiciones de pH del medio (Murhy, et. al., 1978; Girard, et. al., 2001).

En el cultivo de las células mesenquimatosas se utilizó suero fetal bovino no inactivado en una proporción del 10%, pudiendo emplearse hasta una concentración del 20%, con la finalidad de enriquecer nuestro medio de cultivo. Se empleó suero no inactivado que permite una mayor proliferación celular en comparación con el inactivado y sin daño en la integridad celular (Art to science, 1996). La presencia de diversos elementos en el suero como factores de crecimiento, hormonas y vitaminas, influyen directamente en las características y metabolismo de las células, sobre todo si se utiliza para cultivo de células inmaduras como es nuestro caso. La

ausencia de suero en el medio de cultivo afecta importantemente a la proliferación celular (Hälg, M. et. al., 2003).

La cuantificación y la viabilidad de las células mesenquimatosas se realizó usando azul de tripano y la cámara de Neubauer. Utilizamos este método por ser una técnica sencilla, accesible y confiable. Si las células son viables el colorante no atraviesa la membrana celular y el citoplasma no se tiñe sino que presenta una tonalidad verdosa; de lo contrario, una célula muerta permite el paso del colorante, por lo que al microscopio de luz la célula presenta una coloración azul.

El número de células mesenquimatosas que se obtuvo fue bajo si lo comparamos con el de otros autores (Chopp, et. al., 2000 ha logrado aislar  $2.5 \times 10^5 / 4 \mu\text{l}$  y Hofstetter, et. al., 2002 con 30,000 / $\mu\text{l}$ ) a pesar de que se trabajó en condiciones similares a las descritas en estos artículos. Inclusive está reportado que la proliferación de estas células de origen murino es mejor que la de células de humano (Javazon, et. al., 2001). En el futuro intentaremos optimizar nuestra técnica.

Existe controversia para establecer cuál es la expresión de marcadores característica de las células mesenquimatosas. Se han descrito muchos marcadores, pero en general la expresión que se ha encontrado más comúnmente en este tipo de células es para CD-10, CD-13 y Thy-1 (CD-90) (Gordon, 1994; Prockop, et. al., 1997; Horwitz, et. al., 2000. Jiang, et. al., 2002; Vogel, et. al., 2003). Por medio de citometría de flujo, las células mesenquimatosas de médula ósea de rata que se aislaron en este trabajo fueron positivas para CD-10, CD-13 y CD-61. Éste último

también se considera marcador para células mesenquimatosas (Vogel, et. al., 2003). Es importante mencionar que se usaron anticuerpos monoclonales anti-humano. En conclusión las células aisladas son células mesenquimatosas según su inmunofenotipo y su propiedad de adherirse al plástico.

## 11. CONCLUSIÓN

Se logró obtener médula ósea de rata con una técnica que establecimos y que nos permitió mantener al modelo animal vivo, en buenas condiciones de salud y sin alterar su marcha; por ello es factible utilizar posteriormente a la misma rata en estudios de trasplante autólogo como manejo de una lesión medular por contusión empleando células mesenquimatosas. La cantidad de médula ósea-sangre que se obtuvo fue adecuada, lo que permitió obtener una preparación de células mononucleares con técnica de diferencial de gradiente (uso de Ficoll).

El cultivo de células mononucleares de médula ósea se realizó en cajas de plástico tratadas para la separación de células por adhesión diferencial. Éstas se mantuvieron viables en cultivo por un mínimo de 9 días lo que permitió la separación de las células mesenquimatosas, sin afectarse su fenotipo, aunque con una baja en la proliferación.

La cuantificación celular se realizó con la técnica de azul de tripano en una cámara de Neubauer, la cual nos permite además establecer la viabilidad de nuestras células.

El desprendimiento de las células mesenquimatosas de la caja de cultivo fue con un descamador estéril. Este procedimiento mecánico permitió mantener las células en buen estado sin la necesidad de usar algún método enzimático.

Mediante la citometría de flujo logramos identificar inmunofenotípicamente a nuestras células y asumir que manejamos células mesenquimatosas.

En una segunda etapa de investigación emplearemos una preparación autóloga de células mesenquimatosas como la descrita para el manejo de ratas con lesión medular por contusión.

Por lo que estas células representan una base importante para el desarrollo de terapias, en la reconstitución de enfermedades o lesiones en sistema nerviosos central (Vogel, et. al., 2003).



here are two ways to live your life.  
One is as though nothing is a miracle.  
The other is as though everything is a miracle.

Albert Einstein (1879–1955)

## 12. REFERENCIAS

- Azizi SA, Stokes D, Augelli BJ, DiGirolamo C, Prockof DJ. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cell implanted in the brain of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (1998) 3908-3913.
- *Art to science* 15(1996) 1-5.
- Campbell A. Monoclonal antibody technology. The production and characterization of rodent and human hybridomas. Burdon RH, van Knippenberg PH (Eds.) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*. Vol. 13. Elsevier, Amsterdam, 1984.
- Chopp M, Zhang XH, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 11 (2000) 3001-3005.
- Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. *Ann N Y Acad Sci* 770 (1995) 70-78.
- Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansions of recycling stem cells in culture of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Nat Acad Sci USA* 97(2000) 3213-3218.
- Davidsohn I, Henry JB. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio, Todd-Sanford. 5ª. Ed. SALVAT, Madrid, 1972: 151-152.
- Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414 (2001) 92-97.

- Eglitis MA, Dawson D, Park KW, Mouradian MM. Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain. *Neuroreport* 10 (1999) 1289-1292.
- Ferrari G, Cusella-DeAngelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279 (1998.) 1528-1530.
- Franco-Bourland RE. Vasopressinergic, oxytocinergic and somatostatinergic neuronal activity after adrenalectomy and immobilization stress. *Neurochem Res* 23 (1998) 695-701.
- Friedenstein AJ, Gorskaja U, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4 (1976) 267-274.
- Girard P, Jordan M, Tsao M, Wurm F. Small scale bioreactor system for process development and optimization. *Biochem Eng J* 7(2001) 117-119.
- Gordon MY, Riley GP, Greaves MF. Plastic-adherent progenitor cells in human bone marrow. *Exp Hematol* 15 (1987) 772-778.
- Gordon MY. Plastic-adherent cells in human bone marrow generate long-term hematopoiesis in Vitro. *Leukemia* 8 (1994) 865-870.
- Hålg M, Wick P, Tobler U, Schug J, Bruinink A. Effects of culture conditions on human bone (marrow) cell performance. Poster presented en International Symposium Interface Biology of Implants. Alemania. 2003.
- Hamilton BB, Deutsch A, Russell C, Fiedler RC, Granger CV. Relation of disability costs to function: spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 80 (1999) 385-391.
- Hofstetter CP, Schwarz EJ, Hess D, Widenfalk J, Manira A, Prockop DJ, Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injury spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(2002) 2199-2204.



- Horwitz EM, Keating A. Nonhematopoietic mesenchymal stem cell: What are they? *Cytotherapy* 2(2000) 387-388.
- Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ. Rat marrow stromal cells are sensitive to plating density and expand more rapidly from single cell derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 19 (2001) 219-225.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz Gonzalez XR, Reyes M, Lervik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418 (2002) 41-49.
- Kirshblum SC, O'Connor KC. Predicting neurologic recovery in traumatic cervical spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 79 (1998) 1456-1466.
- Kopen GC, Prockop DJ, Phinney DG. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 10711-10716.
- Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, Wang X, Finegold M, Weissman IL, Grompe M. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med* 11 (2000) 1229-1234.
- Laluppa J A, McAdams T A, Papoutsakis ET, Miller WM. Culture materials affect ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Mater Res* 36(1997) 347-359.
- Landry PS, Marino AA, Sadasivan KK, Albright JA. Bone Injury response. *Clin Ortho Rel Res* 332 (1996) 260-273.

- Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: Bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 86 (2001) 1099-1100.
- McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, Choi DW. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nature Med* 5(1999) 1410-1412.
- McFarland CD, Mayer S, Scotchford C, Dalton BA, Steele JG, Downes S. Attachment of cultured human bone cells to novel polymers. *J Biomed Mater Res* 44 (1999) 1-11.
- McLaren A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature* 414 (2001) 129-131.
- Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cel Dev Biol* 11 (1995) 1135-1171.
- Murphy JR, Bacha P, Teng M. Determination of corynebacterium diphtheriae toxigenicity by a colorimetric tissue culture assays. *J Clin Microbiol* 7 (1978) 91-96.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakonluc I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Ginard BN, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410 (2001) 701-705.
- Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276 (1997) 71-74.

- Prockop, D. J. Adult stem cells gradually come age. *Nature Biotechnol* 20 (2002) 791-792.
- Randall TD, Weissman IL. Characterization of a Population of Cells in the Bone Marrow that phenotypically Mimics Hematopoietic Stem Cells: Resting Stem Cells or Mystery Population?. *Stem Cells* 16 (1998) 38-48.
- Rabchevsky AG, Fugaccia I, Turner AF, Blades DA, Mattson MP, Scheff SW. Basic fibroblast growth factor (bFGF) enhances functional recovery following severe spinal cord injury to the rat. *Exp Neurol*, 164 (2000) 280-291.
- Sasaki M, Honmou O, Akiyama Y, Ueda T, Hashi K, Kocsis JD. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. *Glia* 35 (2001) 26-34.
- Steele, JG, McFarland C, Dalton BA, Johnson G, Evans MD, Howlett CR, Underwood PA. Attachment of human bone cells to tissue culture polystyrene and to unmodified polystyrene: the effect of surface chemistry upon initial cell attachment. *J Biomater Sci Polym Ed* 5 (1993) 245-257.
- Steele JG, Dalton BA, Johnson G, Underwood PA. Polystyrene chemistry affects vitronectin activity: an explanation for cell attachment to tissue culture polystyrene but not to unmodified polystyrene. *J Biomed Mater Res* 27 (1993) 927-940.
- Steele JG, Dalton BA, Johnson G, Underwood PA . Adsorption of fibronectin and vitronectin onto Primaria and tissue culture polystyrene and relationship to the mechanism of initial attachment of human vein endothelial cells and BHK-21 fibroblasts. *Biomaterial* 16 (1995) 1057-1067.
- Sussman Mark. Hearts and bones. *Nature* 410 (2001) 640-641.

- Vogel G. Can stem cells suffice? *Science* 292 (2001) 1820-1822.
- Vogel W, Grünebach F, Messam C, Kanz L, Brugger W, Bühring H. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *J Hematology/Haematologica* 88(200) 126-133.
- Weissman IL. Stem Cell: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100 (2000) 157-168.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61 (2000) 364-370.
- Zigova T, Sanberg PR. Neural stem cells for brain repair. *Sci & Med* (1999) 18-27.

## 13. APÉNDICE

**I. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (resumen).**

### 4.5.3. Salud animal.

a) Todas las instituciones donde se alojen animales de laboratorio con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas y enseñanza, deberán implantar programas sanitarios para la prevención de enfermedades.

b) Las cajas y jaulas se mantendrán limpias, secas y en condiciones ambientales aceptables.

c) Todos los días se observarán los animales para detectar cambios de comportamiento, enfermedades, heridas o muerte.

d) El agua suministrada a los animales debe ser potable y a libre acceso.

### 4.6. Identificación y registro.

Toda operación de un bioterio debe contar con registros diversos para el adecuado control de sus poblaciones animales, ya sean colonias de producción o bien de animales bajo experimentación. Estos sistemas incluyen desde tarjetas de jaula individuales o colectivas, hasta hojas clínicas o impresos de computadora que auxilien al veterinario o investigador en dicha tarea.

Todos los métodos utilizados deben ser selectivos para cada especie animal o circunstancia, de aplicación rápida y de ser posible indoloros. De resultar invasivos, capaces de inducir molestias considerables al sujeto, deberán emplearse sustancias o fármacos sedantes o anestésicos a juicio veterinario.

Las marcas o diseños elegidos en cada caso deben ser acordes a la Norma, para su fácil identificación, en los programas de producción y uso de los animales de laboratorio.

Los métodos aceptables son los siguientes:

Las tarjetas.- Se colocan en las jaulas o cajas y los datos que en ella figuran corresponden a la identificación que llevan los animales que contienen. Se pueden asentar datos sobre la procedencia, método de reproducción, inoculaciones, cirugías a que han sido sometidos y el responsable de proyecto de investigación.

Marcas naturales.- Se consideran las características fenotípicas, siempre y cuando sean fácilmente detectables y sin posible confusión. Deben estar perfectamente identificadas en las fichas, mediante dibujos o señales particulares.

Colorantes o tinturas.- Sólo se recomiendan en casos de identificaciones temporales, en un tiempo no mayor de 20 días y usar colorantes que no sean tóxicos para los animales.

Perforaciones y muescas.- Estas se aplican en las orejas de ratas, ratones y porcinos principalmente, de acuerdo a un código preestablecido.

#### 4.7. Alimento.

El alimento para todas las especies debe cumplir con las siguientes características.

- a) Debe estar libre de aditivos, drogas, hormonas, antibióticos, pesticidas y contaminantes.
- b) Debe estar dentro de su periodo de caducidad.
- c) Almacenado en bodegas o cuartos desinfectados, secos y ventilados, sobre tarimas o en contenedores.

#### 5.1.1. Confinamiento o encierro primario.

El equipo para alojar a los animales debe estar diseñado para facilitar el bienestar del animal, satisfacer las necesidades de la investigación y reducir o eliminar las variables experimentales, por lo cual el equipo para confinar al animal o encierro primario debe:

- a). Proporcionar el espacio adecuado que permita movimientos y adopciones de las posturas normales de la especie.
- b). Ser cerrado a prueba de escape y proteger al animal de amenazas externas.
- c). Ser adecuado en ventilación y conforme a las necesidades biológicas de la especie.
- d). Ser resistente al lavado y desinfección frecuente.

### 5.1.2. Salud animal.

Los roedores deben estar libres de las enfermedades zoonóticas y parásitos externos, a menos que el procedimiento experimental aprobado por el Comité indique lo contrario. En este caso, el bioterio debe contar con las medidas sanitarias y de control que asegure el control absoluto de los animales en experimentación (escape, contacto con roedores silvestres, eliminación de cadáveres u otros), así como protección del personal en contacto con los animales, sus partes o sus desechos.

El personal del bioterio debe someterse al menos una vez al año a un examen de salud.

### 5.1.3. Manejo.

#### 5.1.3.1. Alimentación y provisión de agua.

a) El alimento debe proporcionarse a libre acceso o en forma restringida dependiendo de las necesidades de la cepa y de los procedimientos experimentales.

El alimento debe ser palatable, de una fórmula nutricional constante y certificado en cuanto a su composición. En el cuadro número 3 se describe la composición general de un alimento para roedores de laboratorio en base seca para cubrir las necesidades de crecimiento, gestación, lactación y mantenimiento.



Se podrá proporcionar alimentos frescos a los animales, siempre y cuando el Comité lo apruebe.

b) El agua debe ser potable y suministrarse a libre acceso durante toda la vida del animal.

Los procedimientos que requieran de privación de líquidos deben justificarse plenamente ante el Comité.

En caso de que el procedimiento experimental lo justifique y que sea aprobado por el Comité, se podrá hacer las modificaciones pertinentes a la dieta y forma de suministrar los alimentos.

Animal	Proteína cruda %	Grasa cruda %	Fibra cruda %	Consumo diario de agua
Rata	12-24	4-11	3-6	20-45 ml

#### 5.1.6. Manipulación a inmovilización.

Las técnicas de sujeción, manipulación e inmovilización que se realicen en el bioterio deben estar acordes con los principios humanitarios internacionales aceptados, aprobados por el Comité y supervisadas por el Médico Veterinario responsable.

#### 6.1.4. Control del medio ambiente.

El medio ambiente debe ser objeto de máxima atención para el animal de laboratorio, a fin de evitar que aun pequeñas variaciones de éste afecten negativamente la respuesta experimental.

##### 6.1.4.1. Temperatura.

Las instalaciones de animales de laboratorio ya sean para reproducción o experimentación, deben mantener una temperatura estable dentro de los cuartos, misma que oscilará entre 18° C y 26° C.

##### 6.1.4.2. Humedad relativa.

Las instalaciones que alojan animales de laboratorio, deben proveer una humedad relativa entre el 40 y 70%.

##### 6.1.4.3. Ventilación.

Las instalaciones para animales de laboratorio deben poseer un sistema de ventilación eficaz, que permita un recambio de aire ambiental que cubra un rango mínimo de 15 a 18 recambios de aire por hora. El sistema debe funcionar ininterrumpidamente las 24 horas del día, a fin de favorecer una definición ambiental aceptable que no afecte negativamente la salud animal y la respuesta experimental.

#### 6.1.4.4. Iluminación.

Las instalaciones del bioterio estarán iluminadas mediante luz artificial tipo luz de día usando lámparas fluorescentes. El control de los ciclos de luz se efectuará por medio del uso de relojes interruptores automáticos, ajustados de acuerdo con las necesidades de los animales en cuestión. La intensidad lumínica no debe exceder de 1,345 lúmenes para el desarrollo de tareas generales de limpieza, observación y registro dentro de los locales. Sin embargo, debe considerarse la recomendación de mantener 300 lúmenes de intensidad lumínica, para áreas de alojamiento de roedores.

#### 6.1.4.5. Ruido.

Las instalaciones dedicadas al alojamiento de animales de laboratorio deben contar con dispositivos de contención y control de ruido en equipos rodables, carros de servicio y en áreas que generan ruidos excesivos, ya sean de lavado o bien de especies como perros y primates no humanos. La intensidad de ruido no debe ser mayor a 85 dB. El control anterior debe ser alcanzado mediante buenas prácticas de cuidado animal y la orientación del personal de apoyo.

#### 6.1.4.4. Iluminación.

Las instalaciones del bioterio estarán iluminadas mediante luz artificial tipo luz de día usando lámparas fluorescentes. El control de los ciclos de luz se efectuará por medio del uso de relojes interruptores automáticos, ajustados de acuerdo con las necesidades de los animales en cuestión. La intensidad lumínica no debe exceder de 1,345 lúmenes para el desarrollo de tareas generales de limpieza, observación y registro dentro de los locales. Sin embargo, debe considerarse la recomendación de mantener 300 lúmenes de intensidad lumínica, para áreas de alojamiento de roedores.

#### 6.1.4.5. Ruido.

Las instalaciones dedicadas al alojamiento de animales de laboratorio deben contar con dispositivos de contención y control de ruido en equipos rodables, carros de servicio y en áreas que generan ruidos excesivos, ya sean de lavado o bien de especies como perros y primates no humanos. La intensidad de ruido no debe ser mayor a 85 dB. El control anterior debe ser alcanzado mediante buenas prácticas de cuidado animal y la orientación del personal de apoyo.