



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE MÉDULA  
ÓSEA MODIFICAN LOS PARÁMETROS  
PLETISMOGRÁFICOS EN UN MODELO DE  
ENFERMEDAD PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÓNICA  
(EPOC) EN COBAYOS HEMBRA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Bióloga**

**P R E S E N T A:**

**ATZALLALY TORREBLANCA ROA**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**DRA. VERÓNICA ESTELA CARBAJAL SALINAS**

**Ciudad Universitaria CD.MX., 2018**



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.

**1. Datos del alumno**

Torreblanca  
Roa  
Atzallaly  
5521309746  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
310166175

**2. Datos del tutor**

Dra.  
Verónica Estela  
Carbajal  
Salinas

**3. Datos del sinodal 1**

Dra.  
Patricia  
Segura  
Medina

**4. Datos del sinodal 2**

Dr.  
José Luis  
Arreola  
Ramírez

**5. Datos del sinodal 3**

Dra.  
Blanca  
Ortiz  
Quintero

**6. Datos del sinodal 4**

M. en C.  
Marco Antonio  
Martínez  
Ávila

**7. Datos del trabajo escrito**

Las células madre mesenquimales de médula ósea modifican los parámetros  
pletismográficos en un modelo de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica  
(EPOC) en cobayos hembra

69 p  
2018

## DEDICATORIA

A mis padres Gus y Paty ♥

A ustedes porque su amor y cariño han acompañado cada uno de mis pasos.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco inmensamente a la **Universidad Nacional Autónoma de México** (UNAM) por abrirme sus puertas; en especial a la Facultad de Ciencias y al Colegio de Ciencias y Humanidades plantel Oriente por siempre mantener un ambiente agradable para mi desarrollo personal y profesional.

Al **Instituto Nacional De Enfermedades Respiratorias** “Ismael Cosío Villegas” (INER) perteneciente a la **Secretaría de Salud**, en especial al Departamento de Hiperreactividad Bronquial por brindarme la oportunidad de realizar esta labor y por su adiestramiento en el trabajo de laboratorio, comparto este agradecimiento con el departamento de Fibrosis Pulmonar, en especial al laboratorio de Biología Celular de este instituto donde se me permitió la utilización de su equipo.

Este trabajo de investigación formó parte del proyecto denominado “Eficacia en el uso de las células mesenquimales derivadas de médula ósea para el tratamiento de EPOC en modelo de cobaya, cambios leucocitarios y funcionales pulmonares” registrado por el Comité de Investigación y el Comité de Bioética del INER con el número de protocolo B17-14.

Mi más grande gratitud a mi tutora la **Dra. Verónica Estela Carbajal Salinas** por su infinito apoyo, dirección y amistad, por su enorme paciencia, su tiempo y dedicación, sin duda un gran ejemplo de integridad; de todo corazón muchas gracias.

Al **Dr. José Luis Arreola Ramírez** por su apoyo, las enseñanzas brindadas y por la confianza que depositó en mí.

A la **Dra. Patricia Segura Medina** a quien agradezco su total apoyo para la realización de este trabajo.

Al resto de mis sinodales por su apoyo en la revisión de esta tesis, por sus consejos y su tiempo brindado. **M. en C. Marco Antonio Martínez Ávila** y en especial a la **Dra. Blanca Ortiz Quintero** por su apoyo en la citometría de flujo.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio por su bonita amistad brindada, especialmente a **Erick Ramírez** y **Carlos Villa** por su ayuda en la inducción de EPOC en cobayos y a **Eduardo Jasso**, **Ximena Cortés** y **Carla López** por su apoyo el día de la instilación de las células.

A **Oskar Vázquez** por las ilustraciones proporcionadas para la ejemplificación de aspectos específicos de esta tesis.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Primero que nada agradezco a mis padres **Agustín y Patricia** con quienes comparto este logro, por su inmenso amor y guía que me han dado durante todo este trayecto.

A **Oskar** por apoyarme con tanto amor en todo momento, gracias por ser mi compañero, mi amigo y confidente, gracias por no dejarme rendir nunca y por ayudarme a cumplir mis sueños y metas.

Agradezco especialmente a mis tíos **Ana y Enrique** y a mi prima **Paola** por brindarme su hogar, su apoyo, confianza y cariño; agradezco todos los cuidados que tuvieron hacia mí durante este tiempo.

A mi tía **Ale, Marta y Paz** por todo su apoyo y cariño que compartieron conmigo durante este trayecto. Tía Ale gracias por tu compañía mañanera que siempre fue muy agradable para mí.

A mis tíos **Oscar y Vero** por todo el cariño y apoyo que sentí de ustedes hacia mí durante este tiempo.

Un especial agradecimiento a mi gran amigo **Angel**, por su linda e incondicional amistad, por su apoyo y compañía y por siempre hacerme ver el lado divertido de la vida, eres más de lo que hubiese pedido en un amigo. Jamás te hubiera dejado morir en media hora.

A **Daniel**..... agradezco la comprensión y la enorme amistad que tuvimos, tu apoyo para mí siempre fue indispensable.

A mis amigos de laboratorio **Rosi, Jesús Zúñiga y Jesús Alquicira** por su gran actitud y por hacer siempre un ambiente ameno y agradable para trabajar, por sus consejos, pláticas y convivencia.

Por último, también agradezco la vida de tomada de todos los cobayitos. Life is Life.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”



**La cosa más hermosa que podemos experimentar es el misterio.**

**Es la fuente de toda arte y toda ciencia.**

**Albert Einstein.**

# ÍNDICE

<b>LISTA DE FIGURAS Y CUADROS .....</b>	<b>9</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>12</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>14</b>
EPOC.....	14
Aparato respiratorio.....	19
Pletismografía barométrica y parámetros respiratorios.....	22
El cobayo como modelo en EPOC.....	24
Células madre mesenquimales (MSCs).....	26
Citometría de flujo.....	31
<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>32</b>
<b>HIPÓTESIS:.....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVO GENERAL: .....</b>	<b>34</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES:.....</b>	<b>34</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>35</b>
Animales .....	35
Aislamiento de MSCs de médula ósea de fémur de cobayo.....	35
Cultivo celular .....	36
Estandarización de la técnica de citometría de flujo .....	37
Inducción de EPOC en cobayos hembra con humo de tabaco.....	42



Instilación de MSCs .....	42
Evaluación de la función pulmonar por pletismografía barométrica .....	43
Histología .....	44
Análisis estadístico.....	44
<b>FÁRMACOS.....</b>	<b>45</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
Cultivo de MSCs de médula ósea de fémur de cobayo .....	47
Inmunotipificación de las MSCs de médula ósea del fémur de cobayo en cultivo y recién obtenidas .....	48
Modificación de los parámetros funcionales pulmonares inducido por la instilación de MSCs en cobayos con EPOC .....	51
La instilación de MSCs reduce los cambios morfológicos inducidos por EPOC	54
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Esquema de la respuesta inflamatoria en la EPOC	16
2	Obstrucción en las vías respiratorias pequeñas	17
3	Imágenes representativas de los cambios histopatológicos en EPOC	18
4	Aparato respiratorio humano, división de la vía aérea superior e inferior	19
5	Alvéolos pulmonares y su arreglo respecto a los tejidos circundantes	21
6	Esquema del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento	22
7	Parámetros respiratorios	23
8	Comparación del epitelio traqueal de humanos, cobayos, ratas y ratones	25
9	Diferenciación de las células madre mesenquimales en células de origen mesodérmico	27
10	Morfología de MSCs de médula ósea humana durante el cultivo in vitro	28

11	Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo	32
12	Aislamiento de MSCs de fémur de cobayo	36
13	Ilustración de la separación de la sangre sobre los gradientes comerciales Polymorphprep y Lymphoprep.	39
14	Exposición de cobayos hembra al humo de tabaco en cámaras de cuerpo completo	42
15	Equipo de pletismografía barométrica de libre movimiento	43
16	Morfología de MSCs de médula ósea de fémur de cobayo en cultivo	47
17	Inmunotipificación de MSCs-c de médula ósea de cobayo	49
18	Inmunotipificación de MSCs-o de médula ósea de cobayo	53
19	Efecto de las MSCs en el EPOC inducido por humo de tabaco, evaluación de EF50 y PenH	52
20	Efecto de las MSCs sobre la frecuencia respiratoria de cobayos con EPOC inducido por humo de tabaco	53

21	Períodos y flujos respiratorios de la pletismografía barométrica	54
22	Imágenes representativas de los cambios histopatológicos inducidos por las MSCs sobre la EPOC en un modelo de cobayo.	55

<b>CUADRO</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Parámetros pulmonares de la pletismografía de libre movimiento	24
2	Listado de la dilución de los anticuerpos utilizados en la preparación de las muestras en la inmunotipificación de las MSCs	40
3	Lista de anticuerpos utilizados en la inmunotipificación de las MSCs	46
4	Expresión de los antígeno de superficie en MSCs en cultivo de diferentes especies	57

## ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
CD	Cluster de diferenciación
DMEM	Medio modificado de Eagle de Dulbecco
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
GOLD	Iniciativa global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
IL	Interleucina
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
LT	Linfocito T
LB	Linfocito B
MSCs	Células madre mesenquimales
MSCs-c	Células madre mesenquimales cultivadas
MSCs-o	Células madre mesenquimales recién obtenidas
NK	Natural killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBA	Buffer de fosfatos con azida de sodio
PBS	Buffer de fosfatos

## RESUMEN

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) se caracteriza por una limitación del flujo aéreo persistente debido a anomalías de las vías respiratorias o alveolares causando una disminución en la función pulmonar, uno de los factores de riesgo más importantes es la exposición al humo de tabaco (GOLD 2017). El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios potenciales en la función pulmonar en un modelo de EPOC en cobayo debido a la presencia o ausencia de células madre mesenquimales (MSCs) de médula ósea de cobayo mediante el sistema de pletismografía barométrica de cuerpo completo en libre movimiento.

Se aislaron MSCs de médula ósea de cobayo macho y se cultivaron e inmunotipificaron por citometría flujo. Tres grupos de cobayos hembra fueron formados: grupo control (n = 8); grupo con EPOC (n = 8) y el grupo con EPOC+MSCs (n = 8). La EPOC se indujo por la exposición de humo de tabaco durante 10 semanas. Las MSCs ( $5 \times 10^6$ ) se instilaron al inicio de la segunda semana de exposición al tercer grupo de cobayos (EPOC+MSCs). La pletismografía barométrica se realizó en los tres grupos. Los cambios morfológicos del pulmón en los animales normales, con EPOC y EPOC+MSCs se determinaron con la técnica de histología.

Los resultados indicaron que las células aisladas y cultivadas de médula ósea fueron positivas a los marcadores CD29, CD73, CD90 y CD44; y negativas para CD34 y CD45. Estos resultados nos indicaron que las células en cultivo eran MSCs como previamente se ha reportado (Boxal y Jones 2012; Qian H *et al*, 2012; Ode A *et al*, 2011).

Los valores pletismográficos de los parámetros de obstrucción EF50 y PenH del grupo con EPOC y EPOC+MSCs se incrementaron con respecto al grupo control. La frecuencia respiratoria se incrementó en el grupo de EPOC, sin embargo con la presencia de MSCs ésta fue disminuida. Por otro lado, se observó que el tiempo inspiratorio (Ti) y el tiempo espiratorio (Te) fueron menores por el grupo de EPOC y mayor para el grupo de EPOC+MSCs, pero estos grupos incrementaron los parámetros de flujo como el pico de flujo inspiratorio (PIF) y el pico de flujo espiratorio (PEF). Observamos también que el humo de tabaco induce ruptura alveolar, infiltración celular, engrosamiento de las paredes del bronquiolo y descamación del epitelio; esta modificación se ve revertida por las MSCs.

En conclusión las MSCs revierten favorablemente los parámetros pletismográficos Ti, Te, PIF y la frecuencia en un modelo de EPOC en cobayo y así mismo estas células intervienen en la reparación tisular del parénquima pulmonar. Sin embargo, es necesario realizar un estudio crónico para continuar evaluando las posibles modificaciones en los parámetros pulmonares.

# INTRODUCCIÓN

## EPOC

La Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) constituye un importante reto de salud pública al ser una causa frecuente de morbilidad crónica y mortalidad mundial. La EPOC es en la actualidad la cuarta causa de muerte a nivel mundial, pero se prevé que llegue a ser la tercera causa en el año 2020 (GOLD, 2017). La tasa de mortalidad por EPOC es más alta en hombres que en mujeres y aumenta exponencialmente con la edad (Barnes J, 2015). La obstrucción de la vía aérea en la EPOC suele progresar lentamente, se estima que la prevalencia es aproximadamente del 1% en personas menores a los 40 años sin embargo en ciudades con un mayor número de habitantes mayores a esta edad la prevalencia aumenta a 10% (Halbert R, 2006).

La EPOC es descrita por la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD) como una enfermedad frecuente, prevenible y tratable, que se caracteriza por una limitación persistente del flujo aéreo, que se debe a anomalías de las vías aéreas respiratorias o alveolares causadas generalmente por una exposición importante a partículas o gases nocivos. La limitación crónica del flujo aéreo que es característica del EPOC es producida por una combinación de enfermedades de las vías aéreas pequeñas como la bronquiolitis obstructiva y destrucción de parénquima que deriva en enfisema. Cuyas contribuciones relativas varían de un individuo a otro (GOLD, 2017).

Como principal factor de riesgo para el desarrollo de la EPOC se encuentra el tabaquismo, sin embargo existen otros como la contaminación ambiental, la exposición a humo de leña, factores biológicos como infecciones bacterianas o factores ocupacionales como la inhalación de partículas de elementos químicos o minerales comunes en las minas como el carbón, el sílice y el oro (Hansel y Barnes, 2004). También existen factores genéticos relacionados con una deficiencia de la  $\alpha$ 1-antitripsina que es un inhibidor de proteasas que aunado a la exposición a

partículas tóxicas incrementa el riesgo de desarrollar EPOC debido a la rápida destrucción del tejido pulmonar (Hansel y Barnes, 2004).

La respuesta inicial que produce la inhalación de partículas nocivas consiste en un daño oxidativo, produciendo un desbalance entre proteasas y antiproteasas que desencadena una respuesta inflamatoria, ésta inicialmente se forma de manera innata para después dar paso a la respuesta inmune adaptativa (figura 1).

El fluido de revestimiento del tracto respiratorio forma la primera línea de defensa contra los oxidantes inhalados formando una protección entre las células epiteliales y el ambiente externo, este fluido contiene agentes antioxidantes como el ácido ascórbico, el glutatión y el ácido úrico (Guyton y Hall, 2016). Sin embargo la inhalación de partículas tóxicas por tiempo prolongado induce cambios importantes en la homeostasis del glutatión, produciendo un descenso en su concentración lo que provoca un incremento en la permeabilidad del revestimiento, como consecuencia estas partículas pueden atravesar la barrera protectora y producir un daño en el epitelio y parénquima pulmonar (Puerto-Nevaldo *et al* 2010).

El estrés oxidativo afecta a las vías respiratorias por una serie de mecanismos que incluyen la hipersecreción del moco y aumento de la apoptosis, como consecuencia a esto existe una liberación de autoantígenos, que el sistema inmune innato reconoce a través de receptores específicos, posteriormente se induce una infiltración de neutrófilos y macrófagos que desencadenan una respuesta inflamatoria en el tejido pulmonar (Lambrechet, 2001).

La activación de la inmunidad adaptativa ocurre más tarde con el transcurso de la enfermedad donde existe un aumento del número de linfocitos T (LT), LT citotóxicos CD8+ y LT colaboradores CD4+ en el tejido pulmonar (Guy *et al*, 2011). Este proceso se inicia cuando las células dendríticas inmaduras alertan al sistema inmune adaptativo de la presencia de productos de lesión tisular dirigiéndose a los ganglios linfáticos locales donde presentan los antígenos a los LT (Lambrechet, 2001).



La expresión de ciertas citocinas por las células dendríticas como la interleucina 12 (IL-12) induce a los LT a diferenciarse amplificando así la señal inflamatoria. Los LT CD8+ secretan citocinas como la interleucina 6 (IL-6) e interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que participan en el proceso inflamatorio (Cosio *et al*, 2002). La función efectora de los linfocitos T CD4+ es principalmente mediada por citocinas, que promueven la migración trasendotelial de las células inflamatorias al sitio de la lesión. El reclutamiento y la activación de las células inflamatorias ya sean macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, LT CD4+ y LT CD8+ aumenta a medida que empeora la EPOC (Puerto-Nevado *et al* 2010).

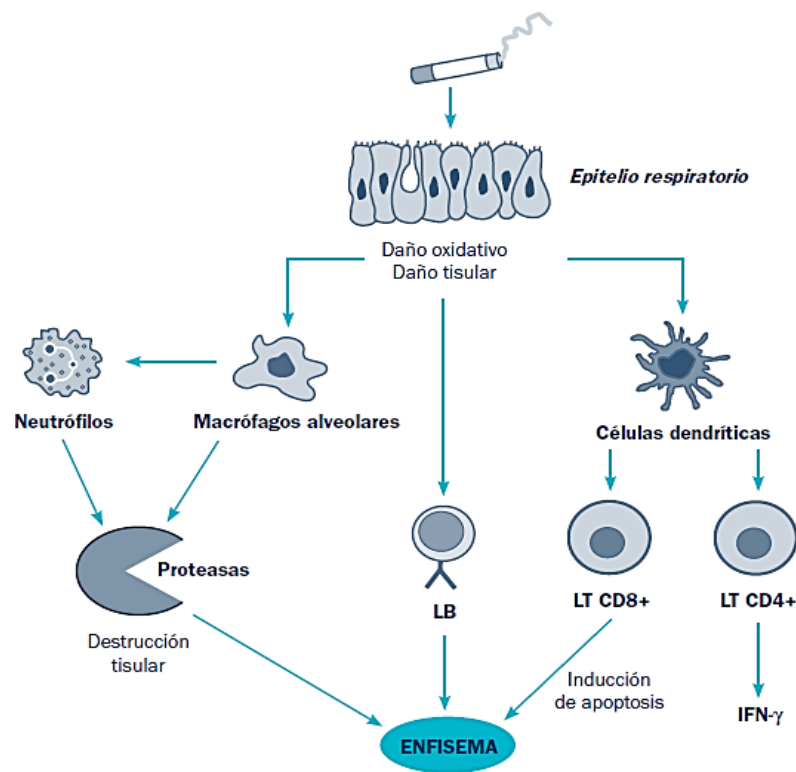


Figura 1. Esquema de la respuesta inflamatoria en la EPOC. Imagen tomada de Puerto-Nevado *et al* 2010.

En cuanto a los linfocitos B (LB) se ha observado que el aumento en el recuento de células B y aumentos en el número y el tamaño de los folículos linfoides ricos en estas células en los pulmones con EPOC que se correlacionan directamente con la gravedad de esta enfermedad. Los estudios de ratones con deficiencia de células B

y pacientes con EPOC han ligado las células B más fuertemente al fenotipo de enfisema. Sin embargo, las células B tienen actividades protectoras durante las exacerbaciones agudas de EPOC mediante la promoción de respuestas inmunitarias adaptativas que contribuyen a la defensa frente a patógenos (Polverino F, 2016).

Debido a estos procesos inflamatorios en la EPOC, se llevan a cabo varios cambios estructurales debido a las principales características patológicas que presenta la enfermedad como la bronquiolitis obstructiva causada por la inflamación acompañada de fibrosis; bronquitis crónica que es causada por una hipersecreción de moco (figura 2) y por último el enfisema que está caracterizado por la destrucción de las paredes alveolares agrandando los espacios aéreos (figura 3), lo que provoca pérdida de la elasticidad y un aumento en la resistencia al flujo del aire (Mirza y Benzo, 2017).

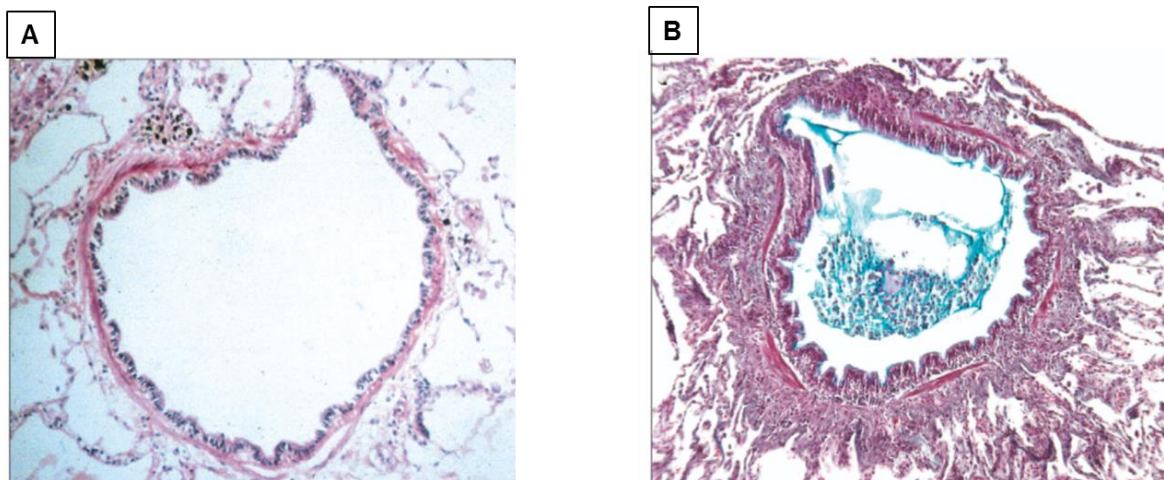


Figura 2. Naturaleza de una obstrucción en las vías respiratorias pequeñas (<2 milímetros de diámetro). Una vía aérea normal (A) se compara con otra vía aérea en la que la pared contiene un proceso inflamatorio activo que llena parcialmente la luz con exudados inflamatorios que contienen moco. Imagen tomada de U.S. Department Of Health and Human Services, 2010.

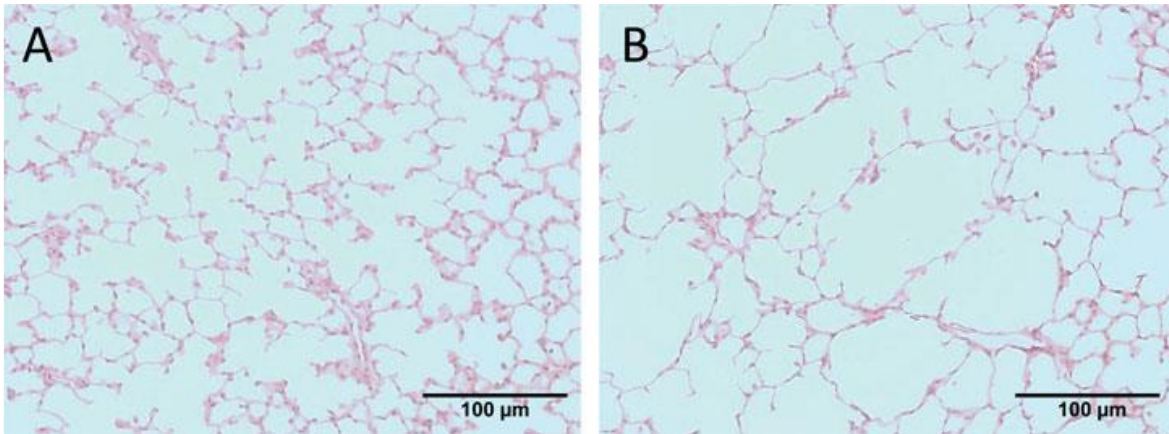


Figura 3. Tinción con hematoxilina y eosina (10 x). Cambios histopatológicos que ocurren en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) en un modelo de cobayo. (A) Se observa la integridad de los alvéolos de cobayos sanos en comparación con la sección (B) donde los alvéolos se encuentran disruptivos después de la inducción de la enfermedad. Imagen tomada de Ramírez-Ramírez et al. (2017).

La primera línea de acción para el manejo de la EPOC es renunciar al consumo de tabaco y/o suprimir la exposición a los gases o partículas nocivas. En cuanto al tratamiento farmacológico se utilizan broncodilatadores que reducen la obstrucción bronquial produciendo la relajación del músculo liso (GOLD, 2017). Por otro lado, los corticosteroides son agentes antiinflamatorios potentes que tienen la capacidad de suprimir la respuesta inflamatoria bloqueando la acumulación de neutrófilos en el pulmón, suprimen la función leucocitaria e inhiben la síntesis de mediadores proteicos y lipídicos que incrementan la quimiotaxis (Giraldo 2008). Sin embargo, el manejo farmacológico de la EPOC no ha sido suficiente para modificar o evitar la progresión de la enfermedad, incluso en un estudio realizado recientemente se demostró que el uso prolongado de corticosteroides a dosis altas se asocia con un aumento en el riesgo de fracturas de cadera y extremidades superiores en pacientes con EPOC (Gonzales *et al*, 2017).

## APARATO RESPIRATORIO

El aparato respiratorio tiene como función captar el oxígeno del aire inspirado y la eliminación del dióxido de carbono producido en el metabolismo celular del organismo (Carbajal, 2006). En lo estructural se divide en dos porciones: 1) vías aéreas superiores que comprenden la nariz, la faringe, laringe y estructuras acompañantes, y 2) vías aéreas inferiores que incluyen la tráquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos (figura 4).

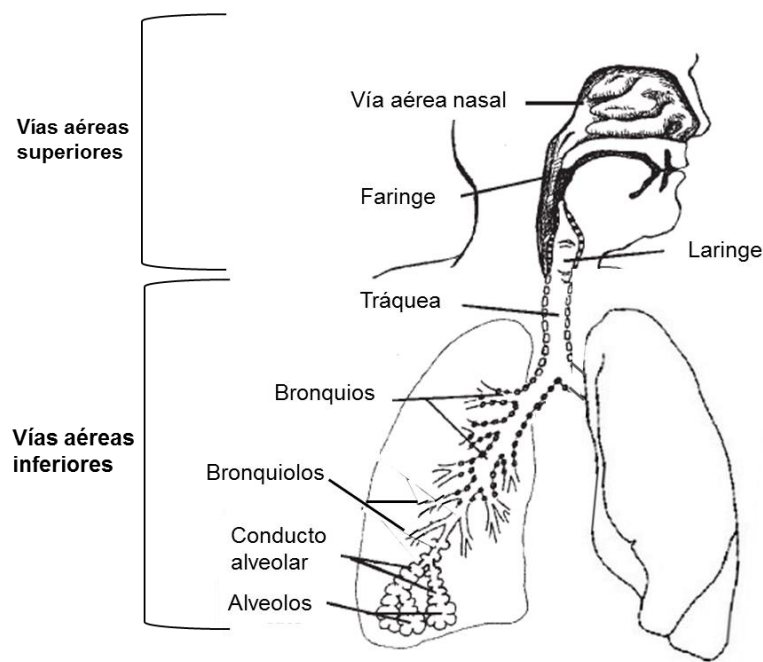


Figura 4. Aparato respiratorio humano, división de la vía aérea superior e inferior. Imagen modificada de U.S. Department Of Health and Human Services, 2010.

La tráquea es un conducto tubular por el que fluye aire, la pared traqueal está integrada por una mucosa cubierta por epitelio cilíndrico pseudoestratificado con células caliciformes y una lámina propia que incluye fibras elásticas y reticulares, este epitelio brinda protección contra el polvo como el revestimiento de la nariz; una submucosa de tejido conectivo formado por glándulas seromucosas; cartílago hialino dispuesto en anillos con forma de C, con músculo liso dispuesto

internamente; y por último se encuentra la capa adventicia que consta de tejido conectivo areolar.

La tráquea se bifurca en los bronquios primarios derecho e izquierdo que se dirigen a los pulmones respectivos, a semejanza de la tráquea, los bronquios primarios poseen anillos incompletos de cartílago y revestimiento de epitelio cilíndrico pseudoestratificado. Después de entrar a los pulmones, los bronquios primarios se subdividen en otros más pequeños, los bronquios secundarios también llamados lobulares, uno por cada lóbulo pulmonar (el pulmón derecho posee tres lóbulos y el izquierdo dos). Los bronquios secundarios dan origen a otros de menor calibre, los bronquios terciarios también llamados segmentarios, que a su vez se ramifican en bronquiolos, estos se dividen repetidas veces.

A medida que aumentan las divisiones, surgen varios cambios estructurales; en primer lugar, el epitelio cambia gradualmente de cilíndrico ciliado pseudoestratificado (en los bronquios) a cúbico simple no ciliado en los bronquiolos terminales; en segundo lugar los anillos cartilaginosos incompletos de los bronquios primarios, se sustituyen también de manera gradual, por placas de cartílago, que están ausentes en las ramas pequeñas; por último, conforme disminuye la cantidad de cartílago aumenta la del músculo liso (Tortora y Grabowski, 2003).

A la altura de los bronquios terminales culmina la porción conductora y se inicia la porción de transición con los bronquiolos respiratorios. A medida que estos últimos penetran en capas cada vez más profundas de los pulmones, su revestimiento epitelial cambia de cúbico simple a escamoso simple, el músculo liso y las fibras elásticas forman una capa más delgada que la que está presente en los bronquiolos terminales (Junquiera y Carneiro, 1987). A su vez los bronquiolos respiratorios se subdividen en varios conductos alveolares, los cuales están rodeados de alvéolos y sacos alveolares. Un alvéolo es una excrescencia con revestimiento de epitelio escamoso simple, el cual está formado principalmente por dos tipos de células: neumocitos tipo I, células delgadas que son el sitio principal del intercambio gaseoso; y los neumocitos tipo II, que son células epiteliales cúbicas cuya superficie libre contiene microvellosidades, secretan líquido alveolar que mantiene húmeda la

superficie entre las células y el aire. Dicho líquido incluye el surfactante, que es una compleja mezcla de fosfolípidos y lipoproteínas que reduce la tensión superficial para evitar la tendencia de los alvéolos al colapso.

En los espacios entre los alvéolos se encuentran macrófagos alveolares que retiran las partículas diminutas de polvo y otros desechos. En este mismo espacio también se encuentran fibroblastos, que producen fibras reticulares y elásticas. Bajo el epitelio alveolar se encuentra una membrana basal elástica. Alrededor de los alvéolos las arterias y las venas se subdividen en una red de capilares sanguíneos (figura 5) que constan de una sola capa de células endoteliales y membrana basal.

A pesar de poseer varias capas la membrana respiratoria es muy delgada para permitir la rápida difusión de los gases respiratorios, pues el intercambio de  $O_2$  y  $CO_2$  entre los espacios alveolares de los pulmones y la sangre ocurre por difusión a través de las paredes alveolar y capilar (Tortora y Grabowski, 2003).

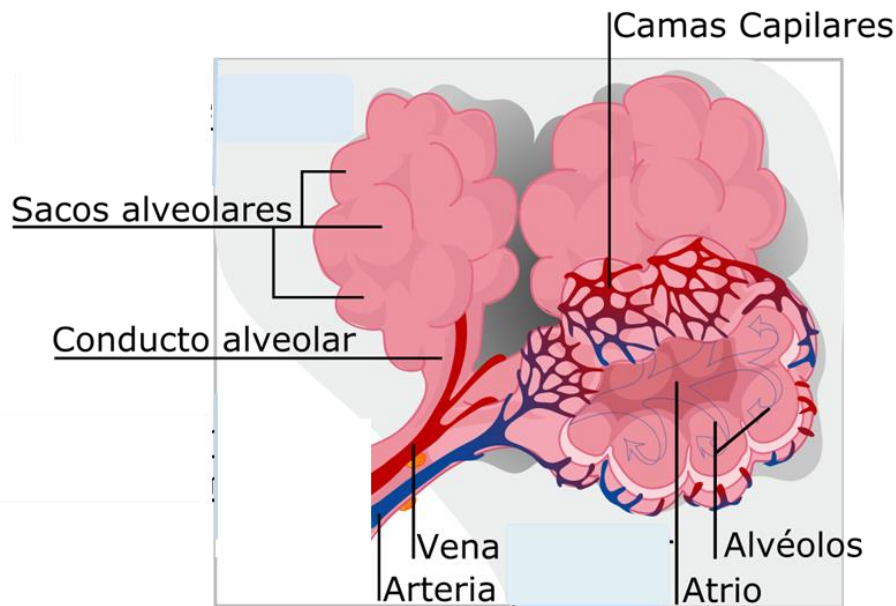


Figura 5. Alvéolos pulmonares y su arreglo respecto a los tejidos circundantes. Imagen tomada de <https://goo.gl/F7Ga2d>.

## PLETISMOGRAFÍA BAROMÉTRICA Y PARÁMETROS RESPIRATORIOS

Existen pruebas invasivas y no invasivas para medir parámetros respiratorios en animales, la pletismografía barométrica es un método no invasivo que se utiliza para medir la función respiratoria indirectamente en animales en libre movimiento. Este es un procedimiento simple que consiste en introducir al animal en una cámara de cuerpo completo con flujo constante de aire que no altera la señal respiratoria (figura 6).

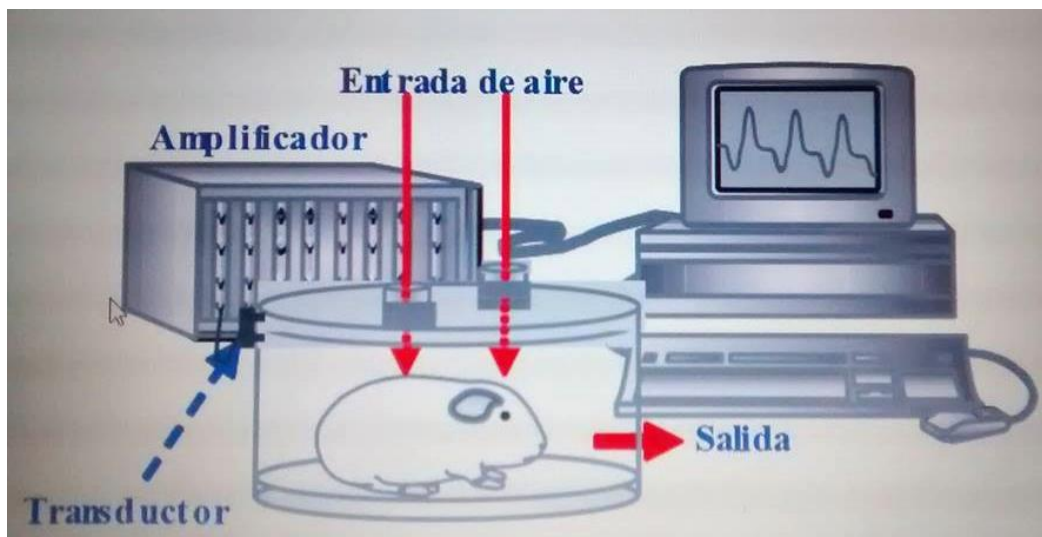


Figura 6. Esquema del equipo de pletismografía barométrica para animales en libre movimiento. Imagen tomada de Rebolgar A (2014).

El equipo arroja diferentes parámetros relacionados a cambios de presión inducidos por la respiración dentro de la cámara, midiendo de manera indirecta la resistencia pulmonar (Vargas MH *et al*, 2010), usando un transductor de presión diferencial se mide la disparidad entre la cámara principal del pletismógrafo donde el animal es colocado y la cámara de referencia con relación a la presión atmosférica del lugar, obteniendo una curva de tiempo-presión de la cual diversos parámetros pueden ser obtenidos incluyendo la frecuencia respiratoria (F), el tiempo inspiratorio (Ti), tiempo espiratorio (Te), así como la presión máxima durante la inspiración y la espiración,

también llamados pico del flujo espiratorio (PIF) y pico del flujo espiratorio (PEF) respectivamente (figura 7; Bohórquez H, 2010; cuadro 1), parámetros usualmente utilizados para medir patrones de obstrucción pulmonar (Ramírez- Ramírez *et al*, 2017). No obstante otras medidas que ha sido propuestas para medir la bronco-obstrucción y la bronco-constricción pulmonar son el EF50 que se define como el flujo medio espiratorio a la mitad del volumen de aire que entra en los pulmones con cada inspiración normal (Hoymann H, 2006), y el parámetro adimensional llamado “enhaced pause” o PenH, índice que se calcula con la señal de presión durante la inspiración y espiración y el tiempo de comparación de la espiración temprana y tardía (Bohórquez H, 2010) también se han referido a este parámetro como una “pausa mejorada” (Villa L, 2017).

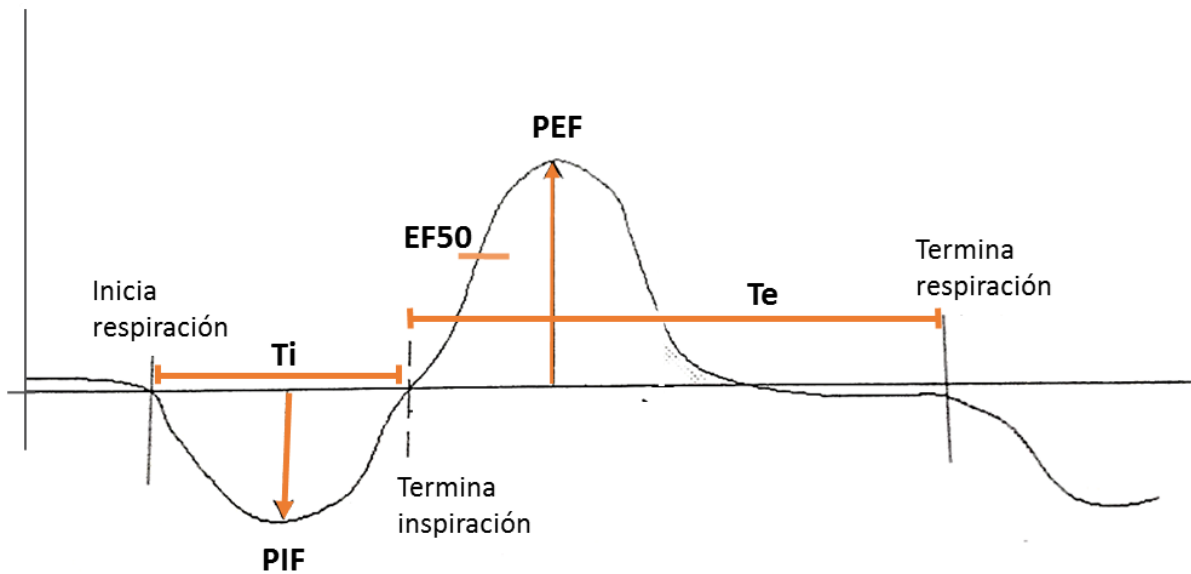


Figura 7. Parámetros respiratorios. Modificado de Manual Buxco.



Cuadro 1. Parámetros pulmonares de pletismografía barométrica de libre movimiento Modificado de Ramírez- Ramírez *et al*, 2017.

Parámetros	Abreviación	Unidades	Definición
Frecuencia respiratoria	F	Rpm (respiración por minuto)	Número de ciclos de respiración completos por minuto
Tiempo de espiración	Te	S	Tiempo necesario para exhalar el volumen corriente (TV)
Tiempo de inspiración	Ti	S	Tiempo necesario para inhalar el volumen corriente (TV)
Flujo inspiratorio máximo	PIF	ml/s	El pico más alto medido durante la fase inspiratoria
Flujo espiratorio máximo	PEF	ml/s	El pico más alto medido durante la fase espiratoria
Flujo espiratorio al 50%	EF50	ml/s	Flujo espiratorio a la mitad del volumen corriente
Pausa mejorada	Penh	Sin unidad	Índice que combina las señales de presión de la caja tanto de inspiración (PIF) como de espiración (PEF), con la comparación de tiempo de vencimiento temprano y tardío (PAU). $Penh = PAU * (PEF / PIF)$

## EL COBAYO COMO MODELO EN EPOC

El cobayo es una especie comúnmente utilizada en estudios preclínicos relacionados con asma y EPOC, esto se debe a la similitud anatómica y fisiológica que existe en la vía aérea entre cobayos y humanos en comparación con otros animales como la rata y el ratón (figura 8); estas similitudes consisten en la presencia de un tejido epitelial pseudoestratificado con células ciliadas, líneas traqueales, bronquios y bronquiolos, nervios aferentes que inervan el epitelio y los espacios subepiteliales, presentan células caliciformes y las glándulas mucosas, además el músculo liso de las vías respiratorias en cobayos es casi idéntico en potencia y eficacia al músculo liso de la vía aérea humana (Canning y Chou, 2008).

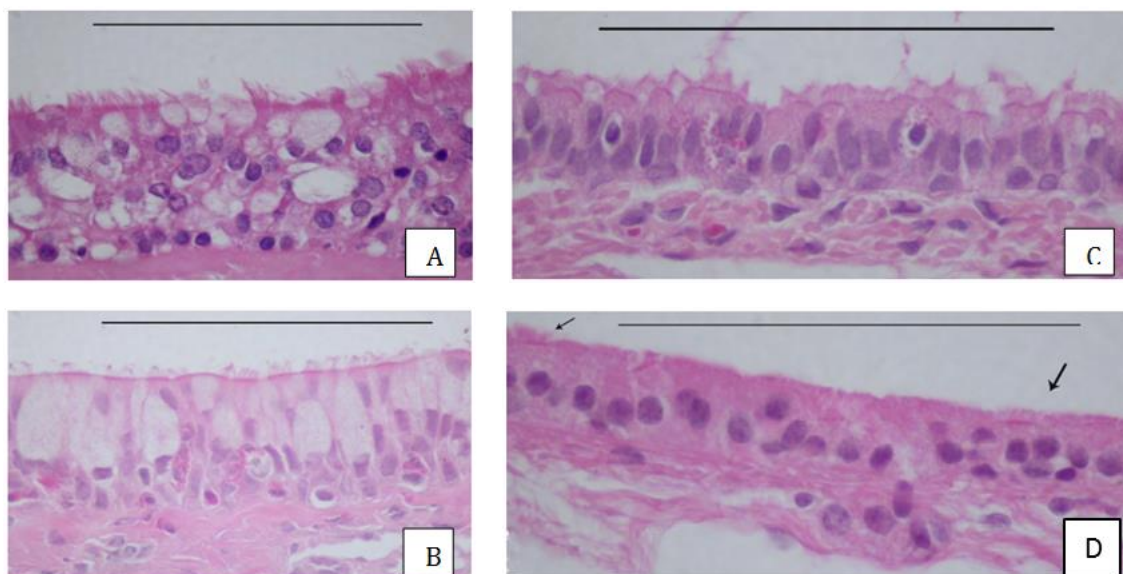


Figura 8. Comparación del epitelio traqueal de humanos (A), cobayos (B), ratas (C) y ratones (D). En el ser humano hay un gran número de células ciliadas y células caliciformes, patrón que también se encuentra en cobayos. La rata tiene escasas células caliciformes, y el ratón no tiene ninguna. Las células ciliadas son comunes en la rata, pero en ratón están presentes sólo en racimos (flechas). Barra 100 µm; Hematoxilina-eosina (H & E). Imagen tomada de Wright JL, *et al*, 2008.

Diversos ensayos revelan que las características patológicas en humanos que se presentan en la EPOC también son similares en cobayos, estas particularidades incluyen la destrucción alveolar, secreción excesiva de moco, grandes cantidades de neutrófilos y aumento de la permeabilidad epitelial (Canning y Chou, 2008).

En el 2009 Montañó y colaboradores desarrollaron un modelo de EPOC inducido por la exposición de humo de leña en cobayos, demostrando un incremento de enzimas elastolíticas, colagenolíticas y gelatinolíticas, así como hipertensión pulmonar e hiperplasia del músculo liso y apoptosis. Por otro lado, Ramírez-Ramírez y colaboradores (2017) en un modelo de EPOC inducido por la exposición a humo de tabaco en cobayo encontraron alteraciones en las vías aéreas como la presencia de enfisema pulmonar y diferencias en los parámetros funcionales respiratorios.

## CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (MSCs)

Las células madre son un grupo de células con capacidad de dar origen a otras con funciones específicas; estas células están presentes en las primeras etapas embrionarias donde poseen la característica de ser pluripotentes, es decir que pueden generar todos los tipos de células que conforman un organismo, mientras que las células madre presentes en la adultez son multipotentes, lo que nos indica que su plasticidad es más restringida (Mata-Miranda *et al*, 2013). Las células madre mesenquimales o por sus siglas en inglés MSCs (mesenchymal stem cells) son un grupo específico de células multipotentes de gran interés con capacidad de auto-renovarse y formar células idénticas a las células de origen. Estas células pueden ser fácilmente aisladas, cultivadas y manipuladas *in vitro*, además presentan una plasticidad amplia y albergan gran potencial en aplicaciones médicas. (Flores-Figueroa *et al*, 2006; Stavely *et al*, 2015; Yang y Jia, 2014; Mirones *et al*, 2011; Hernández, 2012; Akram *et al*, 2016).

Estas células fueron descubiertas en 1970 gracias a los experimentos que realizaba Fredenstein y colaboradores con células madre hematopoyéticas de médula ósea (Afanasyev B. *et al*, 2009) donde observaron la existencia de colonias con características distintas que daban procedencia a células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (figura 9). Fue hasta 1991 que Caplan acuñó el nombre de células madre mesenquimales para referirse a esta estirpe celular (Caplan 1991).

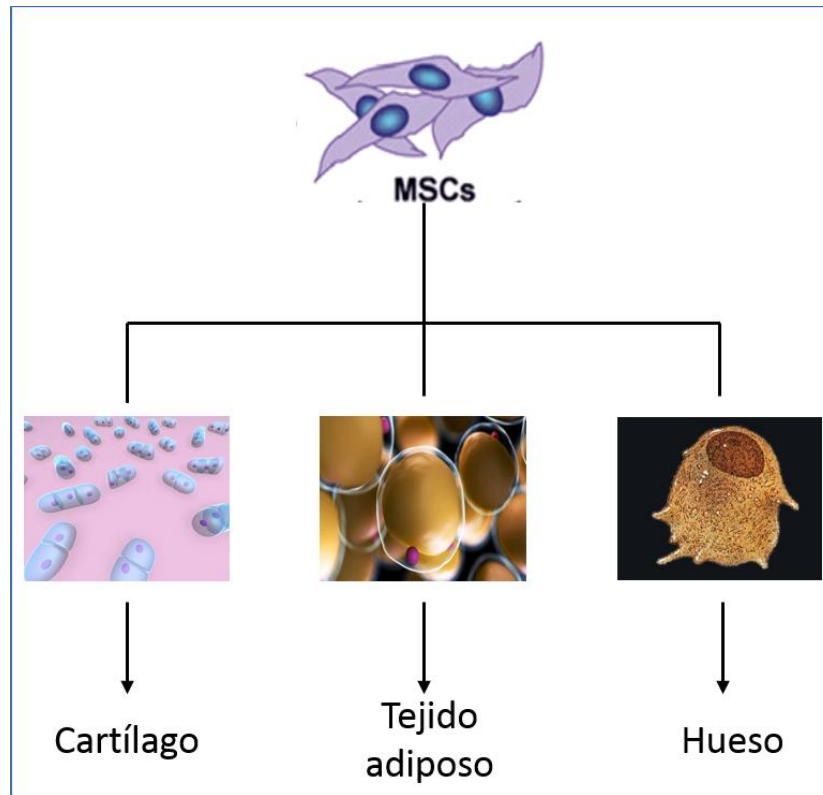


Figura 9. Diferenciación de las células madre mesenquimales en células de origen mesodérmico: condrocitos, adipocitos y osteoblastos. Imagen modificada de Flores-Figueroa, 2006.

Las MSCs se caracterizan morfológicamente por presentar una forma alargada y plana (figura 10), comúnmente se dice que tienen una morfología de tipo fibroblastoide (Kundrotas *et al*, 2016). Mediante tinción de Wright se puede observar la presencia de un núcleo redondo excéntrico, un citoplasma basófilo y desprovisto de granulaciones o inclusiones (Páez G. *et al*, 2007).

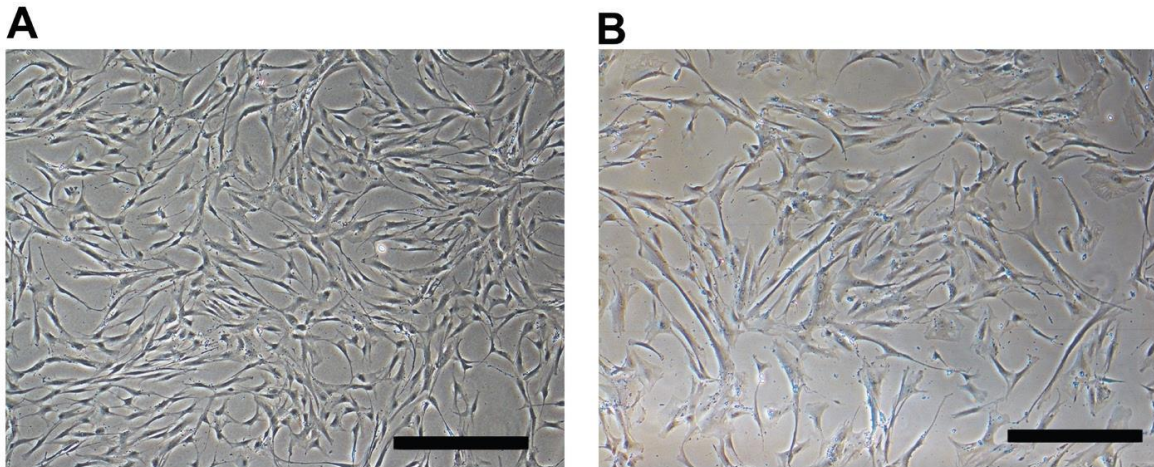


Figura 10: Morfología de MSCs de médula ósea humana durante el cultivo in vitro. **A** Población homogénea típica de células similares a fibroblastos en pasaje 4. **B** población de MSCs en pasaje 7. Amplificación original 40X, las barras de escala representan 500 µm. Imagen tomada de Kundrotas *et al*, 2016.

En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT (International Society Cellular Therapy) propuso tres criterios para definir a las MSCs, el primero dice que estas células tienen que ser adherentes al plástico en cultivo con la presencia de unidades formadoras de colonias (UFC) en los primeros días; el segundo especifica que deben expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105, en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34 y antígenos leucocitarios como CD45; y el tercero menciona que deben tener la capacidad de diferenciarse in vitro bajo condiciones estándar en osteoblastos, adipocitos y condrocitos (Dominici *et al*, 2006).

El marcador CD105 es un receptor implicado en la señalización durante la diferenciación condrogénica de las MSCs; por su parte el CD73 está involucrado en migración, así como en las interacciones estromales de médula ósea y potencialmente en la modulación de la inmunidad adaptativa de estas células; en cuanto a la función del CD90 no se ha definido aún con exactitud, sin embargo se ha propuesto una implicación en las interacciones célula-célula (Boxal y Jones 2012). Existen otros marcadores que han sido utilizados en la inmunotipificación de las MSCs como el CD44 el cual indica la capacidad de adherencia de las células al

plástico en cultivo (Qian H *et al*, 2012); y el CD29 involucrado en la migración de las MSCs (Ode A *et al*, 2011).

Estas células son aisladas de tres fuentes principales, de tejido adiposo, sangre de cordón umbilical y médula ósea, de esta última solo el 0.003% del total de células presentes corresponde a MSCs, aun así está es la principal fuente de obtención, pues cuenta con una mayor población respecto a los demás tejidos (Páez D. *et al*, 2007). Sin embargo, existen muchos otros órganos y tejidos donde se encuentran poblaciones de MSCs como en la piel, hígado, músculo esquelético, páncreas, pulmón, tejido adiposo, placenta, sangre periférica y pulpa dental, la presencia de estas células facilita la reparación tisular y la remodelación de tejidos durante la vida. Las MSCs residentes en los tejidos suelen estar localizadas en un microambiente local específico llamado nicho, necesario para mantener y controlar su diferenciación y maduración (Klimczac y Kozłowska, 2015).

Se habla de una capacidad inmunorreguladora por parte de las MSCs, pues se ha observado que forman parte del microambiente que participa en la regulación, supervivencia y quiescencia de las células madre hematopoyéticas (HSCs); células que dan origen al linaje hematopoyético como glóbulos rojos, plaquetas y células del sistema inmune.

Además, se ha observado una amplia gama de funciones por parte de las MSCs en las interacciones con las células del sistema inmune innato, como la inhibición de la proliferación y producción de citocinas proinflamatorias por parte de neutrófilos y la inhibición de la diferenciación de monocitos en células dendríticas. En cuanto a la acción que ejercen las MSCs sobre las células del sistema inmune adaptativo se ha visto que estas promueven la supervivencia de los LT en estado de reposo, e inducen la detención de la división de los LT activados que se acumulan en las fases G0 / G1 del ciclo celular (Pistoia y Raffaghello, 2017).

En cuanto a los LB las MSCs inhiben su proliferación, capacidad quimiotáctica y su diferenciación en células plasmáticas; incluso se ha observado una participación con las células NK (natural killer) al inhibir su proliferación (Uccelli *et al*, 2006).

Debido a las capacidades quimiotácticas, inmuno-reguladoras y de regeneración tisular las MSCs han sido estudiadas como una estrategia terapéutica para regenerar y restaurar las funciones de órganos y tejidos dañados en diversas enfermedades, incluyendo un gran número de padecimientos pulmonares (Stuckey *et al*, 2014).

En el año 2015 Stavely y colaboradores realizaron un estudio de colitis en cobayo, donde usaron MSCs derivadas de médula ósea y tejido adiposo para tratar la inflamación del colón, ellos encontraron que las MSCs derivadas de tejido adiposo tienen una tasa de proliferación más elevada que las MSCs de médula ósea. También observaron que las MSCs de médula ósea disminuían la inflamación producida por la colitis inducida por TNBS (2,4,6-trinitrobenzene-sulfonate acid) al reducir la infiltración leucocitaria.

Para el caso de las enfermedades pulmonares, la terapia celular con MSCs ha sido estudiada en fibrosis pulmonar con objetivo de detener o revertir el padecimiento al reducir el deterioro (Yang y Jia, 2014); en hipertensión pulmonar donde la instilación de estas células atenuó la presión arterial pulmonar y la resistencia vascular en un modelo murino; y algunas afectaciones que implican procesos inflamatorios como rechazo post trasplante pulmonar y el asma donde las MSCs muestran gran capacidad para disminuir la inflamación y ayudar en la reparación del epitelio (Mirones *et al*, 2011).

En 2005 Rojas M y colaboradores observaron la diferenciación de las MSCs en células alveolares de tipo 1 y tipo 2 en ratones con enfisema inducido, por su parte en el estudio realizado por Song L y colaboradores (2014) con ratas expuestas a humo de tabaco observaron que las MSCs protegieron el tejido pulmonar a través de la supresión de citocinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- $\alpha$ , también observaron que se redujo el número total de células inflamatorias en los lavados bronquio alveolares indicando un decremento en la infiltración de las células inflamatorias en estas estructuras, lo que supone que las MSCs mejoran la inflamación local en pulmones dañados por humo de tabaco.

Se ha señalado que las MSCs tienen notables ventajas sobre las células pluripotentes encontradas en los estadios embrionarios, pues su manipulación resulta más simple; son autólogas, es decir, pueden ser trasplantadas con éxito entre individuos y entre especies pues han demostrado no ocasionar rechazos inmunológicos; no presentan limitantes éticas ni legales; ni tampoco se ha comprobado que produzcan neoplasias (Formación anormal de carácter tumoral, benigno o maligno), lo que contrasta positivamente con las características de las células embrionarias, cuya obtención y expansión son más complejas; tienen potencial para desencadenar una respuesta inmunológica de rechazo; enfrentan problemas éticos y legales y además, producen un alto porcentaje de tumores en los animales de experimentación (Hernández, 2012 ).

Este panorama general, nos muestra que nos encontramos ante un tipo celular, que puede ser considerado como agente terapéutico ya que estas células ofrecen un enorme potencial para la regeneración del tejido lesionado y la reparación de los estados patológicos en las enfermedades pulmonares hasta ahora incurables (Akram *et al*, 2016; Mirones *et al*, 2011).

## **CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células en suspensión, se produce una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. La suspensión de células en solución isotónica se hace pasar una a una a través de un pequeño orificio formando un flujo continuo. Sobre esta corriente de células se hace incidir un haz de luz láser (figura 11), cuya dispersión y reflexión son analizadas en duración, intensidad y espectro, los datos obtenidos son almacenados para su análisis posterior.



Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad para medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma, complejidad y cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo (Drago S, 2004), tal es el caso de los cluster de diferenciación (CD) que son moléculas de superficie celular, estas moléculas se usan comúnmente como marcadores celulares, permitiendo la identificación y aislamiento de poblaciones, subconjuntos y etapas de diferenciación celular (Engel P, *et al*, 2015).

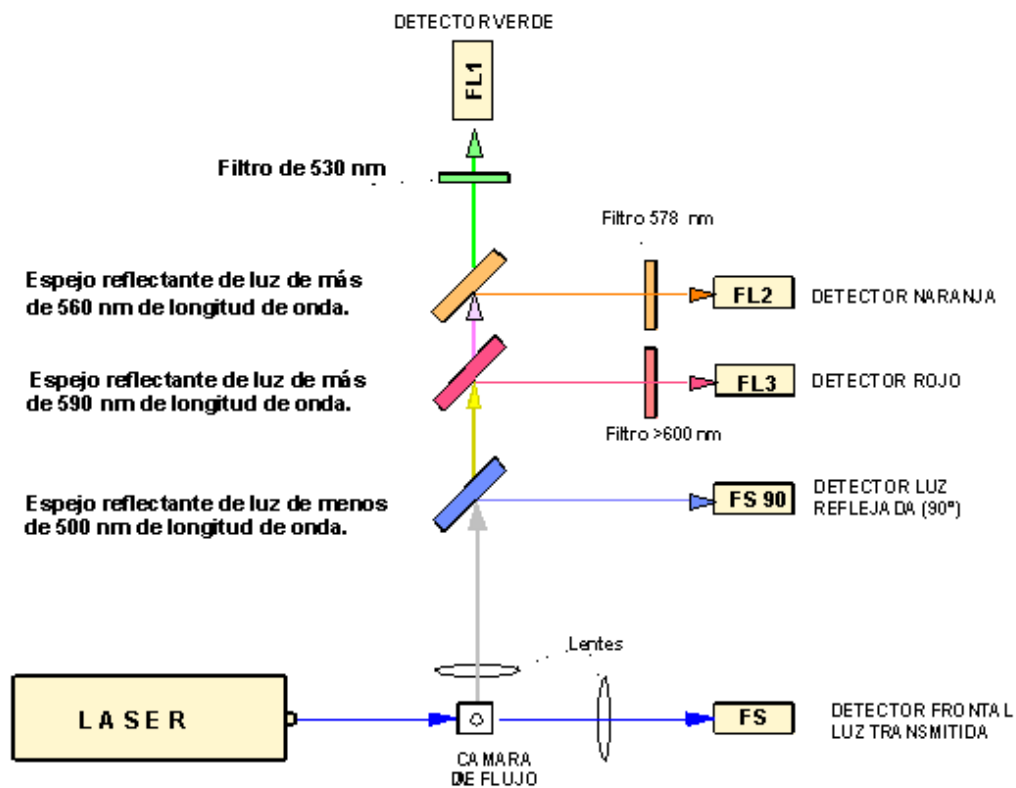


Figura 11. Esquema del funcionamiento de un citómetro de flujo. Imagen tomada de <http://bit.ly/2fYhkn>.

## JUSTIFICACIÓN

La EPOC es un problema grave de salud a nivel mundial, registros de la Organización Mundial de la salud (OMS) indican que en los últimos dos años murieron más tres millones de personas en todo el mundo por esta causa y para el caso particular de México el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) menciona que esta enfermedad es la cuarta causa de muerte entre las mujeres mexicanas y la quinta entre los hombres y se estima que en 2020 está podría colocarse como el tercer factor de mortandad en el país.

En la actualidad muchos de los tratamientos utilizados en EPOC son insuficientes pues solo brindan un bienestar momentáneo en los pacientes, no hay una reversión del daño ni detención del mismo, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas clínicas. En los últimos años diversos estudios han demostrado que la terapia celular con MSCs logra tener un efecto positivo en el tratamiento de un gran número de enfermedades incluyendo afecciones pulmonares. En vista de que la terapia celular con las MSCs pudiera estar jugando un papel fundamental en revertir o modificar los parámetros fisiológicos respiratorios en pacientes que presentan EPOC, resulta interesante poder explorar si uno o varios de estos parámetros son modificados. La identificación de tales alteraciones inducidas por las MSCs es de gran importancia para el mejor entendimiento de la fisiopatología de la EPOC y asimismo tener una alternativa para su tratamiento.

## **HIPÓTESIS:**

Las MSCs provenientes de médula ósea de cobayo son capaces de modificar favorablemente los parámetros funcionales respiratorios de cobayos hembra con EPOC inducido por humo de tabaco.

## **OBJETIVO GENERAL:**

- Demostrar que las MSCs obtenidas de médula ósea de cobayo revierten favorablemente los parámetros respiratorios a través de pletismografía barométrica.

## **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- Obtener médula ósea del fémur de cobayo macho.
- Realizar cultivos celulares de la médula ósea fresca de cobayo macho con el fin de obtener MSCs.
- Estandarizar la técnica de citometría de flujo para la inmunotipificación de los diferentes cluster de diferenciación (CD29, CD73, CD90, CD44, CD34 y CD45) que se expresan en las MSCs de médula ósea en fresco y en cultivo de cobayo macho.
- Inducir la enfermedad de EPOC en los cobayos hembra con la exposición a humo de tabaco.
- Instilar las MSCs a los cobayos hembra a las 2 semanas de inducción de la EPOC.
- Medir por pletismografía barométrica las diferencias entre los parámetros respiratorios en los cobayos hembra control, con EPOC y con EPOC+MSCs instiladas al inicio y al final del estudio.
- Comparar cambios morfológicos del pulmón de cobayo hembra inducidos por las MSCs en la EPOC.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

### **ANIMALES**

Se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos y hembras de la cepa Hartley de 6 semanas edad con un peso aproximado de 300g, los cuales se mantuvieron en condiciones controladas en el bioterio: aire acondicionado filtrado,  $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ , con un 50-70% de humedad, en cama estéril, con acceso libre a agua y alimento y con un ciclo de luz y oscuridad de 12-12 horas. El protocolo (B17-14) fue aprobado por el Comité de Investigación, el Comité de Bioética e Investigación y el Comité de Bioseguridad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas”.

### **AISLAMIENTO DE MSCS DE MÉDULA ÓSEA DE FÉMUR DE COBAYO**

Se sacrificó al cobayo con una sobredosis de pentobarbital sódico y se exanguinó. En condiciones estériles, se realizó una incisión en la piel del cobayo y se separaron los músculos de la pierna para exponer el fémur, el cual se seccionó tanto del extremo distal como el proximal. El fémur obtenido se disecó y limpio del exceso de tejido muscular y conectivo además del cartílago.

El fémur se cortó de forma longitudinal y se extrajo la médula ósea por aspiración con una jeringa de 10 mL con aguja de 20Gx 32 mm (figura 12). La médula ósea se colocó en un tubo Falcon de 50 mL y se resuspendió gentilmente en 50 mL de buffer de fosfatos a pH 7.4 (PBS). La suspensión celular se filtró a través de una malla de nylon de 70  $\mu\text{m}$ , posteriormente se centrifugaron a 1360 rpm durante 10 minutos a  $22^{\circ}\text{C}$ . El botón celular se resuspendió gentilmente en 5 mL de PBS.

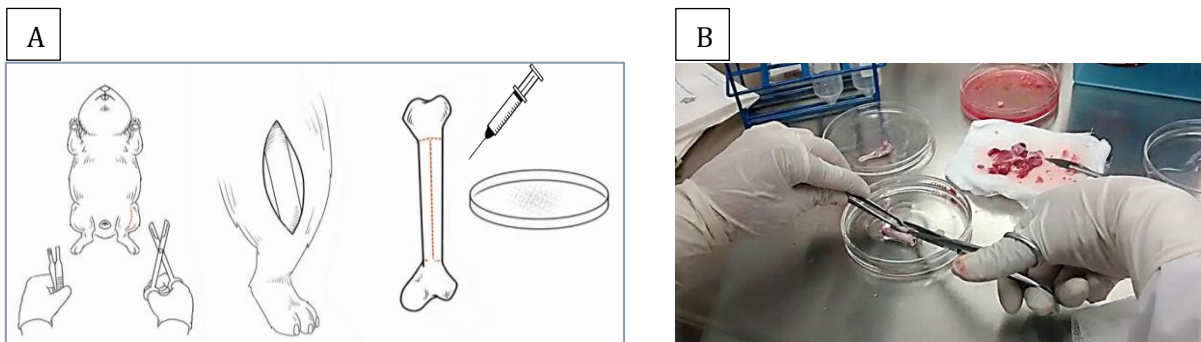


Figura 12. Aislamiento de MSCs de fémur de cobayo. A) ilustración del procedimiento de extracción del fémur y de la médula ósea de cobayo; B) fotografía del proceso de corte del fémur.

En un tubo eppendorf se colocaron 40  $\mu\text{L}$  de azul de tripano al 0.4 % (Gibco® N°cat 15250-061) y se les añadió 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y se agitó gentilmente. Después de 2 minutos, con una pipeta se colocó 10  $\mu\text{L}$  de esta mezcla en una cámara de Neubauer (Lumicyte® LBC), para realizar el conteo de las células vivas y muertas. Se obtuvo el conteo celular total utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Conteo celular total} = \# \text{ células vivas} + \# \text{ células muertas} \times 50\,000 / \text{mL de células}$$

Posteriormente el resultado se multiplicó por 5, ya que se tenían 5 mL.

## CULTIVO CELULAR

En una caja T-75 se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular ( $24 \times 10^6$  células), posteriormente se agregó 12 mL de medio de cultivo (DMEM, Biowest® N°cat L0066-500) preparado previamente con Suero Fetal de Bovino 10% (FBS, Gibco® N°cat 16000044) y antibiótico-antimicótico 1% (Biowest® N°cat L0010, de la siguiente composición: (g/L) cloruro de sodio 8.5, anfotericina B 0.03, penicilina G sódica 6.03 y sulfato de estreptomina 10), la caja se colocó a 37°C con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95%  $\text{O}_2$ , en una atmósfera de humedad. Después de 24 horas, se retiró el medio y se lavó la caja T-75 2 veces con DMEM sin FBS y se añadió medio fresco. Las

células adheridas a la caja se dejaron crecer hasta que alcanzaron el 80 % de confluencia.

**Tripsinización de las células:** A las células en confluencia se les añadió 3 mL de tripsina/EDTA de la siguiente composición: EDTA dihidrato disodio 0.25; Cloruro de potasio 0.20; Fosfato de potasio monobásico anhidro 0.2; Cloruro de sodio 7.95; Fosfato sódico Dibásico anhidro 1.15; D-glucosa anhidra 1.0 g/l (Biowest® n° cat L0940-500). Se agitó la caja gentilmente para desprender las células, esto se realizó durante 3-5 min. Después se agregaron 7 mL de DMEM+FBS para inactivar a la tripsina. Se recuperaron las células y se centrifugaron a 1800 rpm durante 10 minutos a 22°C. Se retiró el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 mL de DMEM+FBS. Posteriormente se realizó el conteo celular como se describió previamente.

**Pasajes:** Se realizaron 2 pasajes más, en cada pasaje se sembraron inicialmente  $5 \times 10^6$  células, las cuales alcanzaron el 80% de confluencia al tercer día de cultivo. Las células obtenidas del tercer pasaje se utilizaron para la inmunotipificación por citometría de flujo (500 000 células / muestra) y para la instilación de animales con EPOC ( $5 \times 10^6$  células/ mL de DMEM).

## **ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE CITOMETRÍA DE FLUJO**

La técnica de citometría se estandarizó con células mononucleares de humanos y de cobayo obtenidos de sangre periférica, con la finalidad de estandarizar la dilución óptima de los anticuerpos CD29, CD34, CD73, CD44, CD45 y CD90 que se utilizaron para la inmunotipificación de las células madre mesenquimales .

**Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica:** Las muestras de sangre periférica venosa fueron obtenidas de sujetos sanos voluntarios y de sangre periférica por punción cardiaca obtenida de cobayo. Para la toma de muestra, se utilizó un tubo Vacutainer con heparina (Becton Dickinson® n°cat 367874).

La sangre de humano se colocó sobre un gradiente comercial (Polymorphprep): que contiene 13.8% diatrizoato sódico (p/v) y 8.0% de polisacárido (w/v) (Axis-Shield®) dilución 1:1 (v/v). La fracción de células mononucleares se separó al centrifugar la muestra de sangre a 1800 rpm durante 35 min a 20°C (figura 13 A).

En el caso de la sangre de cobayo, la sangre se diluyó con solución salina fisiológica (SSF) 1:1 (v/v), después se colocó sobre un gradiente comercial (Lymphoprep: que contiene 9.1% (p/v) diatrizoato sódico y 5.7% (p/v) de polisacárido de Axis-Shield®, n°cat 1114547) dilución 1:1 (v/v). La fracción celular de células mononucleares se separó al centrifugar la muestra de sangre a 2720 rpm durante 20 min a 20°C (figura 13 B).

Para ambos casos la fracción de mononucleares resultante se colocó en tubos eppendorf, se agregó 1mL de una solución buffer de fosfatos que contiene ázida de sodio (PBA: PBS 1%, Albúmina 0.2% y ázida de sodio 0.1%) frío a cada uno y se resuspendió gentilmente, posteriormente se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 min a 20°C, se decantó el sobrenadante y al botón celular se le agregó nuevamente 1mL de PBA y se resuspendió gentilmente para realizar el conteo celular.

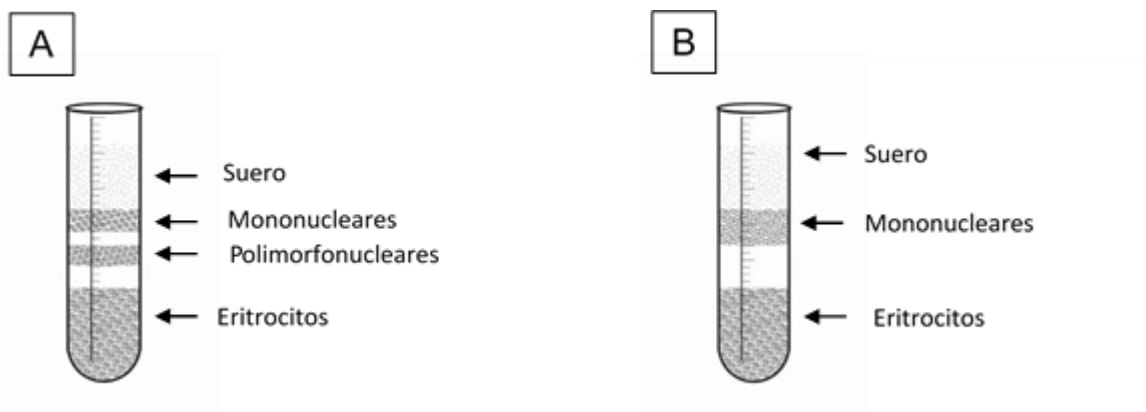


Figura 13. Ilustración de la separación de la sangre sobre los gradientes comerciales Polymorphprep en humano (A) y Lymphoprep en cobayo (B).

**Aislamiento de células de la médula ósea:** Para la citometría de células mesenquimales en fresco se realizó el procedimiento previamente descrito y posteriormente se procedió a eliminar los eritrocitos de la muestra. El botón celular se resuspendió en 20 mL de una solución de lisis (600 mg NaHCO<sub>3</sub>, 4.15g NH<sub>4</sub>Cl, 18 mg EDTA en 500 mL H<sub>2</sub>O) y se refrigeró durante 10 min. El tubo se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min a 22°C (este procedimiento se realizó dos veces). El sobrenadante fue descartado, el botón se resuspendió gentilmente en 5 mL de PBA, se centrifugó el tubo a 1800 rpm durante 10 min a 22°C, el sobrenadante fue eliminado y al botón se le añadió 1 ml de PBA; se tomó 200 µL de esta suspensión celular y se le agregó 800 µL de PBA, se resuspendió gentilmente y se realizó el conteo celular.

**Preparación de las muestras:** Se incubaron 5 x 10<sup>5</sup> células obtenidas del cultivo de MSCs y en su caso de las células recién obtenidas con cada uno de los siguientes anticuerpos: AlexaF-anti-CD29, PerCpCy5.5-anti-CD34, APC/Cy7-anti-CD73, PE/Cy7-anti-CD90, anti-CD44 y anti-CD45 (ver cuadro 2 y 3) durante 30 minutos a 4°C protegidos de la luz. Posteriormente, las células se lavaron con PBA y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min a 4°C. Las células con los anticuerpos AlexaF-anti-CD29, PerCpCy5.5-anti-CD34, APC/Cy7-anti-CD73, PE/Cy7-anti-CD90 se fijaron con 100 µL de paraformaldehído (PFA) al 1% a 4°C. En el caso de las células con los anticuerpos anti-CD44 y anti-CD45 se incubaron con un anticuerpo secundario goat-anti-Rabbit conjugado con APC y con un anticuerpo PE-goat-anti-Mouse respectivamente, durante 30 minutos a 4°C en obscuridad. Las células se lavaron 2 veces y se fijaron con 100 µL de paraformaldehído (PFA) al 1% y se almacenaron a 4°C hasta su análisis. 30 000 eventos fueron colectados sobre un citómetro (FAScanto, Becton&Dickinson, Flankin Lakes, NJ, USA) y los datos fueron analizados usando un software para citometría FlowJo (versión 8.8.7, TriStar, Ashlan, OR, USA).



Cuadro 2. Listado de la dilución de los anticuerpos utilizados en la preparación de las muestras en la inmunotipificación de las MSCs

Células	Anticuerpo	Dilución
Monocitos	Tubo control	-
	AlexaF- anti CD29	1 $\mu$ L, 2 y 5 $\mu$ L
	PerCpCy5.5 CD34	1 $\mu$ L, 2 $\mu$ L y 5 $\mu$ L
	CD44 + APC goat-anti Rabbit	1:1000, 1:3000 y 1:5000
	CD45 + PE- goat-anti Mouse	1:1000, 1:3000 y 1:5000
	APC/Cy7- antiCD73	1 $\mu$ L, 2 $\mu$ L y 5 $\mu$ L

Células cultivadas	Tubo control	-
	AlexaF- anti CD29	2 $\mu$ L
	PerCpCy5.5 CD34	2 $\mu$ L
	CD44 + APC goat-anti Rabbit	1:500
	CD45 + PE- goat-anti Mouse	1:1000, 1:3000 y 1:5000
	APC/Cy7- antiCD73	2 $\mu$ L
	PE/Cy7- anti CD90	1 $\mu$ L, 2 $\mu$ L y 5 $\mu$ L

Células recién extraídas de médula ósea	Tubo control	-
	AlexaF- anti CD29	2 µL
	PerCpCy5.5 CD34	2 µL
	CD44 + APC goat-anti Rabbit	1:500
	CD45 + PE- goat-anti Mouse	1:3000
	APC/Cy7- antiCD73	2 µL
	PE/Cy7- anti CD90	5 µL
	AlexaF- Isotype Ctrl	2 µL
	PE-goat-anti Mouse	2.5 µL
	PE/Cy7 - Isotype Ctrl	2.5 µL
	PerCpCy5.5 - Isotype Ctrl	2 µL
	APC- goat- anti Rabbit	0.1 µL
	APC/Cy7 - Isotype Ctrl	2 µL

## INDUCCIÓN DE EPOC EN COBAYOS HEMBRA CON HUMO DE TABACO

Se utilizó un total de 24 cobayos hembra de 4 a 6 semanas de edad, las cuales fueron asignadas de manera aleatoria a tres grupos: el primero, grupo control (n = 8) que se mantuvieron en condiciones normales de bioterio; el segundo, grupo con EPOC (n = 8) y el tercero, grupo con EPOC+MSCs (n = 8) fueron expuestos al humo de 20 cigarrillos por día, durante 5 días a la semana por un período de 10 semanas. Los cigarrillos que se usaron son comercialmente disponibles (Marlboro Red Label, Philip Morris Internacional®). Con el fin de facilitar su quema, los cigarrillos con el filtro eliminado, se deshidratarán durante dos días en un horno a 37 ° C.

Los animales del segundo y tercer grupo fueron colocados en una cámara de exposición de cuerpo completo (figura 14) y fueron expuestos al humo de 5 cigarrillos en una fila durante ~30 min, seguido de una exposición aire del ambiente durante los siguientes 30 min. Este procedimiento se repitió cuatro veces al día. Una vez terminado el proceso los cobayos fueron regresados a sus jaulas en el bioterio hasta la siguiente sesión de exposición.



Figura 14. Exposición de cobayos hembra al humo de tabaco en cámaras de cuerpo completo.

## INSTILACIÓN DE MSCs

Las MSCs fueron instiladas al tercer grupo de cobayos hembra en el octavo día después del inicio del ciclo de exposición al humo de tabaco de 10 semanas. Estos

fueron anestesiados con pentobarbital sódico y posteriormente se les realizó una incisión en la piel a la altura de la tráquea con la finalidad de exponer la misma donde se instiló en la luz traqueal un total de  $5 \times 10^6$  de MSCs previamente cultivadas e inmunotipificadas en un mL de DMEM sin suero, posteriormente se cerró la incisión y se esperó a la recuperación de los animales para después ser llevados de nuevo al bioterio y continuar con el proceso de exposición al humo de tabaco.

### **EVALUACIÓN DE LA FUNCIÓN PULMONAR POR PLETISMOGRAFÍA BAROMÉTRICA**

En el día primero antes de iniciar la exposición al humo de tabaco y al final del ciclo de exposición en el día 70 del estudio, cada animal fue colocado dentro de una cámara pletismográfica de libre movimiento como se observa en la figura 15 (Buxco Research System, Wilmington, NC, EE.UU.), donde los ciclos de respiración de los animales en libre movimiento y en reposo se registró cada 2 segundos durante 90 minutos con el software proporcionado por el fabricante (FinePointe V2.1.0.9, Buxco), y los datos se almacenaron en una hoja de Excel para su análisis posterior.



Figura 15. Equipo de pletismografía barométrica de libre movimiento A) Cobayos dentro de cámaras pletismográficas de libre movimiento; B) pantalla del pletismógrafo donde aparecen los registros de la respiración tomados cada dos segundos.

## HISTOLOGÍA

Al término de la pletismografía barométrica del día 70, los cobayos fueron sacrificados por una sobredosis de pentobarbital sódico y exanguinados por punción cardiaca. Se obtuvo el pulmón derecho y se fijó in situ con PFA al 4% (pH 7.4; Selman *et al*, 2003). Posteriormente el tejido fue embebido en parafina y se realizaron cortes de 6  $\mu\text{m}$ , los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina. Las imágenes fueron capturadas y digitalizadas utilizando una cámara Zeiss AxioCam MRc5 (Oberkochen, Alemania).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a la amplia variabilidad de la función respiratoria y como preparación para el análisis estadístico, la mediana de cada período de 5 minutos se calculó para cada animal, el uso del valor de la mediana nos permitió descartar la influencia de valores extremos ocasionales. Todas las mediciones de 5 minutos de cada cobayo se promediaron para obtener el valor representativo de cada uno, después la media  $\pm$  error estándar se calculó para cada grupo, seguido de una prueba de Kolmogorov - Smirnov para corroborar que los tres grupos contaban con una distribución normal. Posteriormente, se graficaron solo los datos de los últimos 30 minutos en todas las mediciones, esto para evitar tomar en cuenta los cambios espontáneos en el patrón respiratorio durante la pletismografía barométrica producidos por el estrés en los cobayos comunes durante los primeros 60 minutos de acuerdo a trabajos previos por nuestro grupo de trabajo (Ramírez – Ramírez *et al*, 2017).

Finalmente se utilizó el software INERSTAT-a v1.7 b, mediante el cual se determinó la diferencia entre los grupos por análisis de varianza (ANOVA), seguido de una prueba de Tukey, Dunnett y/o una T de student para la comparación entre los grupos. Se consideró que existía diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de significancia fue de una  $p < 0.01$  o de una  $p < 0.05$ .

## FÁRMACOS

Pentobarbital sódico; buffer de fosfatos pH 7.4 (PBS, Sigma N°cat 1001616563); azul de tripano al 0.4 % (Gibco® N°cat 15250-061), DMEM (Biowest® N°cat L0066-500); Suero Fetal de Bovino 10% (FBS, Gibco® N°cat 16000044); antibiótico-antimicótico 1% (Biowest® N°cat L0010, de la siguiente composición: (g/L) cloruro de sodio 8.5, anfotericina B 0.03, penicilina G sódica 6.03 y sulfato de estreptomina 10); tripsina/EDTA (Biowest® n° cat L0940-500); Polymorphprep; Solución Salina Fisiológica (SSF, Pisa N°cat 1030608); Lymphoprep, buffer de fosfatos que contiene azida de sodio (PBA, que contiene: PBS 1%, albúmina 0.2% y ázida de sodio 0.1%; solución de lisis (600 mg NaHCO<sub>3</sub>, 4.15g NH<sub>4</sub>Cl, 18 mg EDTA en 500 mL H<sub>2</sub>O) y paraformaldehído (PFA, al 1% Electron Microscopy Sciences N°cat 19208).

Cuadro 3. Lista de anticuerpos utilizados en la inmunotipificación de MSCs

<b>Anticuerpo</b>	<b>Reactividad</b>	<b>Marca</b>	<b>Número de catalogo</b>
Alexa Fluor 488-anti CD29	Humano	Biolegend	303016
Alexa Fluor 488 Mouse IgG1 Isotype Ctrl	Humano	Biolegend	400129
Anti CD44	Humano	Abcam	Ab157107
Anti CD45	Cobayo	Abcam	Ab23713
APC/ Cy7-anti CD73	Humano	Biolegend	344022
APC/ Cy7 Mouse IgG1 Isotype Ctrl	Humano	Biolegend	400128
APC- conjugated goat anti-rabbit IgG	Humano	Abcam	Ab130805
PE/ Cy7-anti CD90	Humano	Biolegend	328124
PE/ Cy7 Mouse IgG1 Isotype Ctrl	Humano	Biolegend	400126
Phycoerytherin- Goat anti Mouse IgG1	Cobayo	Abcam	Ab99912
PerCP/Cy5.5 -anti CD34	Humano	Biolegend	343522
Rabbit Polyclonal IgG Isotype Ctrl	Humano	Abcam	Ab171870

## RESULTADOS

### CULTIVO DE MSCs DE MÉDULA ÓSEA DE FÉMUR DE COBAYO

Las MSCs de médula ósea del cobayo formaron colonias que se observaron a partir del tercer día de cultivo (figura 16 A), posteriormente estas colonias fueron creciendo hasta formar una monocapa que se extendía ampliamente en el espacio conforme aumentaba la confluencia. La morfología de estas células es de tipo fibroblastoide; en los primeros 2 pasajes poseen una apariencia triangular en la zona del núcleo y prolongaciones medianas (figura 16 A y B). Sin embargo, la morfología de MSCs en el pasaje 3 es de forma espigada y con prolongaciones más extensas (figura 16 C y D).

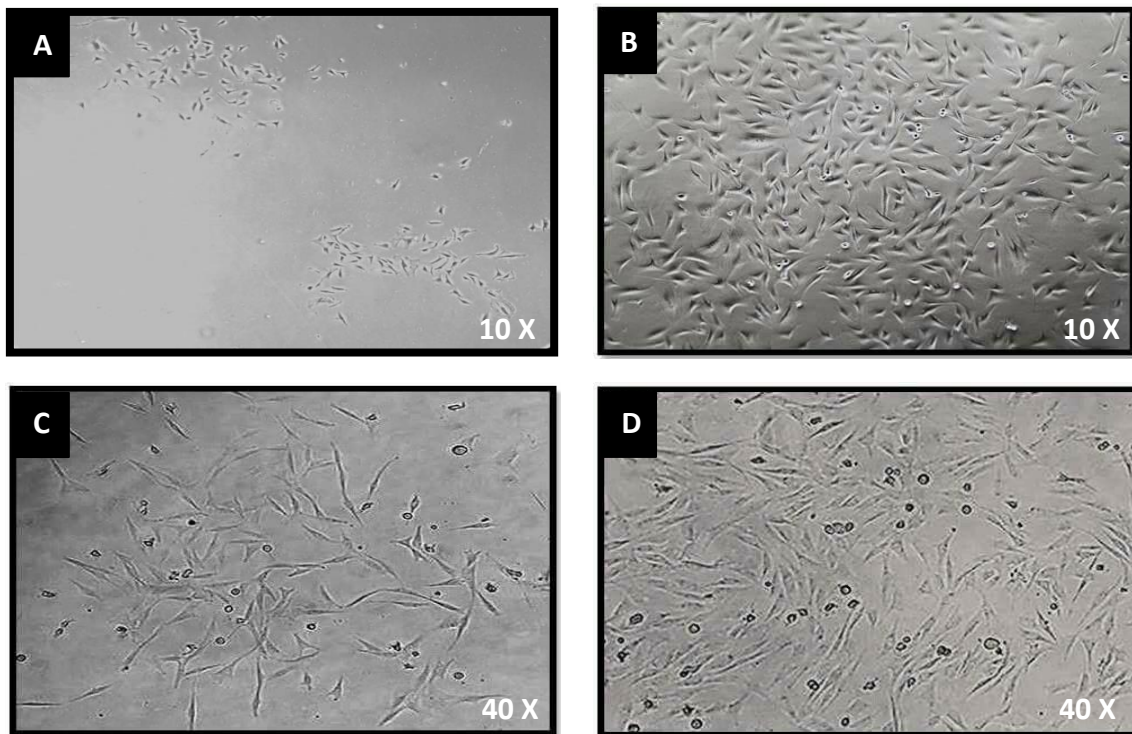


Figura 16. Morfología de MSCs de médula ósea de fémur de cobayo en cultivo. A) En el tercer día de cultivo del pasaje 1 se observan Unidades formadoras de colonias (UFC, 10x). B) Confluencia del 80% de las MSCs en el pasaje 2 (10x). C y D) Las células presentan una forma espigada con prolongación de su citoplasma en el pasaje 3 (40X).



## **INMUNOTIPIFICACIÓN DE LAS MSCs DE MÉDULA ÓSEA DEL FÉMUR DE COBAYO EN CULTIVO Y RECIÉN OBTENIDAS**

Para determinar el inmunofenotipo de las MSCs de médula ósea del fémur de cobayo en cultivo (MSCs-c) se seleccionaron todas las células que fueron viables; posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo con los siguientes marcadores mesenquimales CD29, CD73, CD44 y CD90, y con los marcadores hematopoyéticos CD34 CD45. En éstas células se observó la expresión positiva de los marcadores CD29 (89.5%) CD73 (43.4%), CD90 (21%) y CD44 (24.7%) y no se observó la expresión de CD34 y CD45 (figura 17).

En el caso de las células mesenquimales recién obtenidas (MSCs-o) se seleccionaron todas las células que no expresaron el marcador CD45. Posteriormente, fueron analizadas por citometría de flujo con los mismos marcadores mesenquimales previamente descritos. En este caso, se observó que las células recién obtenidas expresaron CD29 (36.7%), CD44 (44.8%), CD34 (34.2%) y CD45 (44.6%) y no expresaron los marcadores CD73 y CD90 (figura 18).

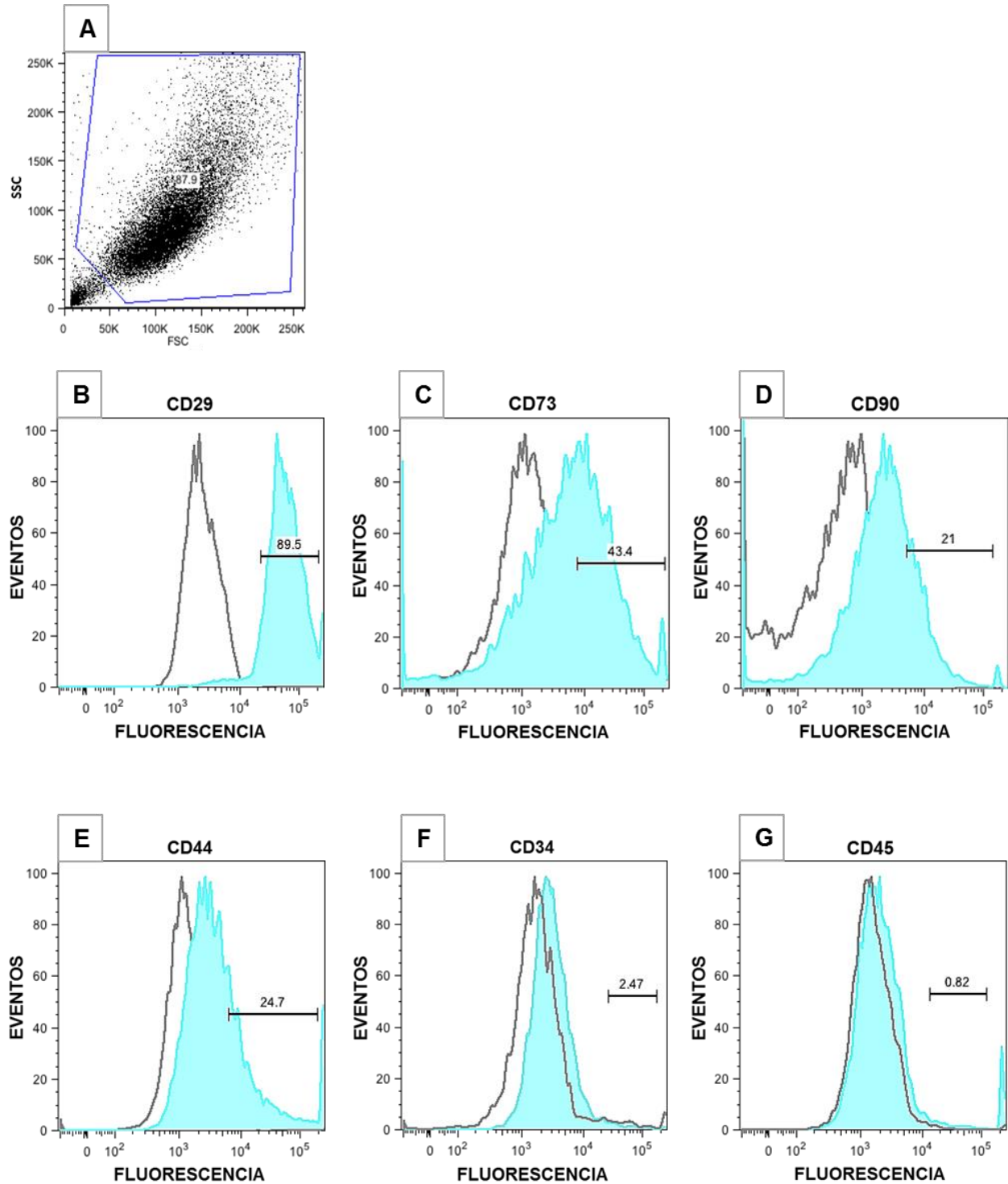


Figura 17. Inmunotipificación de MSCs-c del pasaje 3 de médula ósea de cobayo. A) Selección de células viables para el análisis de citometría. B, C, D y E) Análisis de la expresión de los marcadores positivos a MSCs CD29, CD73, CD90 y CD44, respectivamente. F y G) para los marcadores negativos a MSCs CD34 y CD45, respectivamente. Los histogramas en azul muestran las MSCs marcadas con el anticuerpo contra el antígeno de superficie. El histograma vacío muestra el control de isotipo.

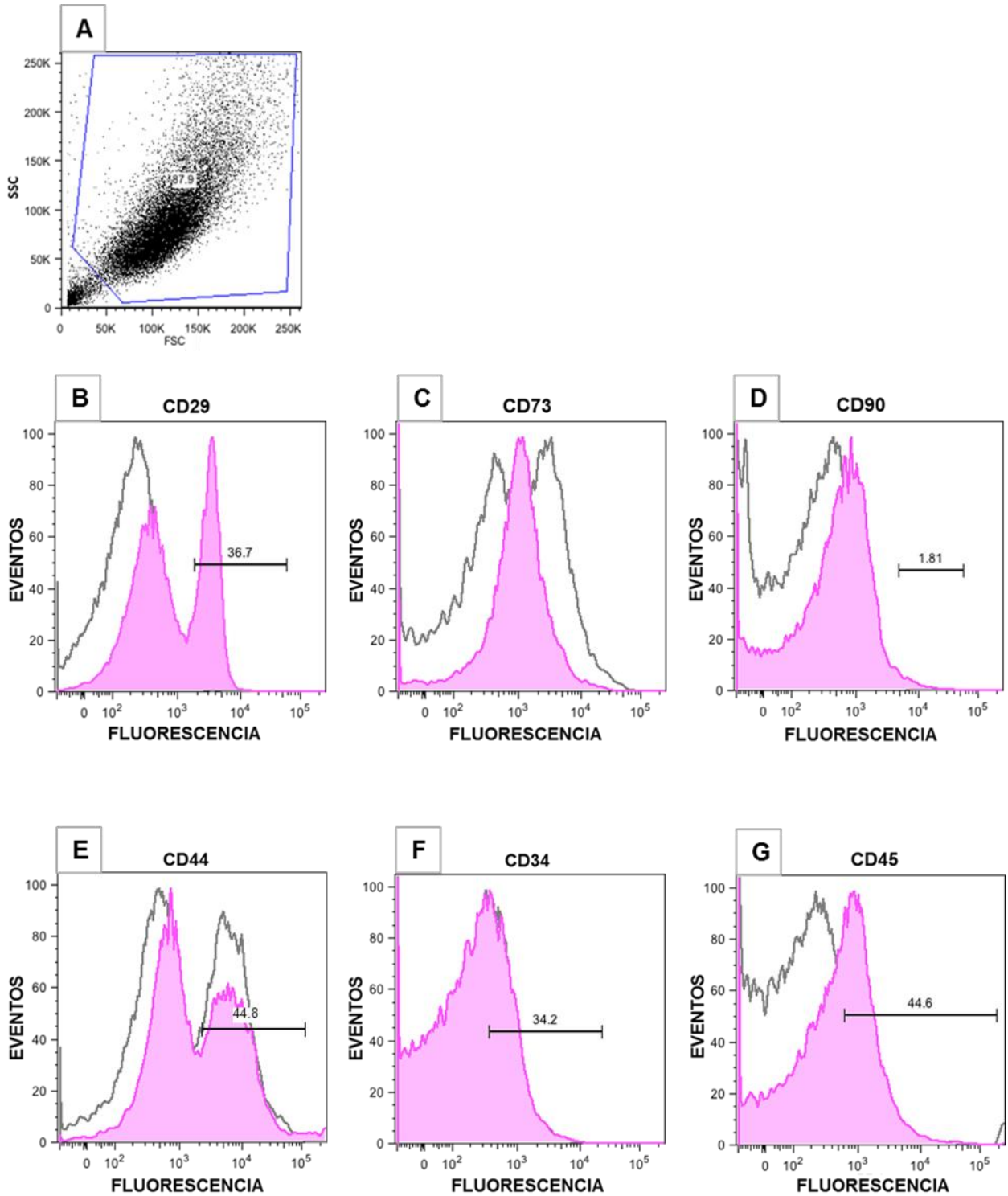


Figura 18. Inmunotipificación de MSCs-o de médula ósea de cobayo. A) Selección de células viables para el análisis de citometría. B, C, D y E) Análisis de la expresión de los marcadores positivos a MSCs: CD29, CD73, CD90 y CD44, respectivamente. F y G) para los marcadores negativos a MSCs: CD34 y CD45, respectivamente en la médula ósea de cobayo. Los histogramas en rosa muestran las MSCs marcadas con el anticuerpo contra el antígeno de superficie. El histograma vacío muestra el control de isotipo.

## **MODIFICACIÓN DE LOS PARÁMETROS FUNCIONALES PULMONARES INDUCIDO POR LA INSTILACIÓN DE MSCs EN COBAYOS CON EPOC**

Para poder determinar si las MSCs revierten favorablemente los parámetros funcionales pulmonares inducidos por el EPOC, se evaluó la función pulmonar por pletismografía barométrica de libre movimiento en los diferentes grupos de cobayos: el grupo control, el grupo que desarrolló EPOC al ser expuestos con humo de tabaco y al grupo que desarrolló EPOC y fueron instilados con las MSCs (EPOC + MSCs) previamente inmunotípificadas. Se realizaron 2 mediciones pletismográficas en cada uno de los grupos, la primera al inicio del experimento (M1) y la segunda al final de las 10 semanas de la exposición al humo de tabaco (M2).

Uno de los parámetros utilizados para medir la resistencia pulmonar es el EF50 que es un índice de broncoobstrucción de la vía aérea, esta obstrucción es provocada principalmente por un exceso de moco e inflamación. Otro parámetro utilizado es el PenH, el cual nos indica el grado de broncoconstricción pulmonar donde se ve implicada la contracción del músculo liso de la vía aérea. Se encontró que al comparar la segunda medición pletismográfica (M2) entre los grupos; el grupo con EPOC y EPOC+MSCs indujeron un incremento en el EF50 y PenH y fueron estadísticamente significativos con respecto al grupo control ( $p < 0.01$ ). Al comparar la M1 con M2 de cada grupo, observamos que EPOC y EPOC+MSCs incrementan significativamente el EF50 y PenH (Figura 19 A y B,  $p < 0.01$ ).

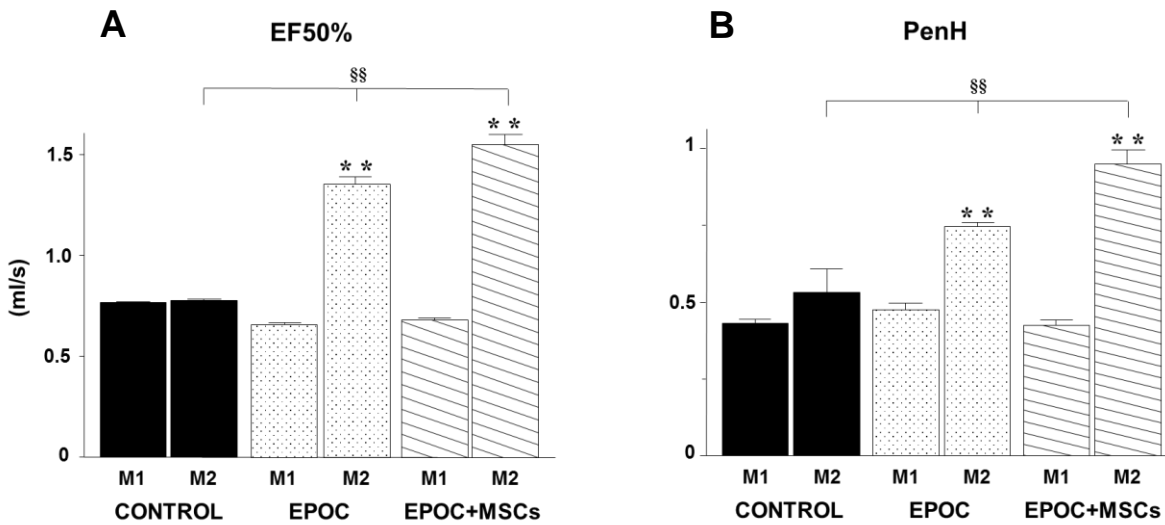


Figura 19. Efecto de las MSCs en el EPOC inducido por humo de tabaco, evaluación de EF50 y PenH. A) EF50 y B) PenH, se incrementaron significativamente en los cobayos con EPOC y EPOC+MSCs con respecto a su control (M1 vs M2, \*\* $p < 0.01$ ,  $n = 8$ ), de igual manera al comparar la segunda medición pletorespirométrica (M2) entre todos los grupos fue significativa (§§  $p < 0.01$ ,  $n = 8$ ).

Nuestros hallazgos previos nos indican que el humo de tabaco induce una obstrucción de la vía aérea y que esta obstrucción también era evidente en los animales tratados con MSCs. Por lo cual se decidió evaluar si la frecuencia respiratoria (F), el tiempo inspiratorio (Ti), el pico de flujo inspiratorio (PIF), el tiempo espiratorio (Te) y el pico de flujo espiratorio (PEF) eran modificados.

Cuando evaluamos la frecuencia respiratoria encontramos que al comparar M1 con M2 de cada grupo, los animales con EPOC incrementaron significativamente esta respuesta ( $p < 0.01$ ). Sin embargo, en el grupo de cobayos con EPOC + MSCs no se observó ninguna diferencia. En cuanto al grupo control hubo una disminución en la frecuencia que fue significativa ( $p < 0.01$ , Figura 20).

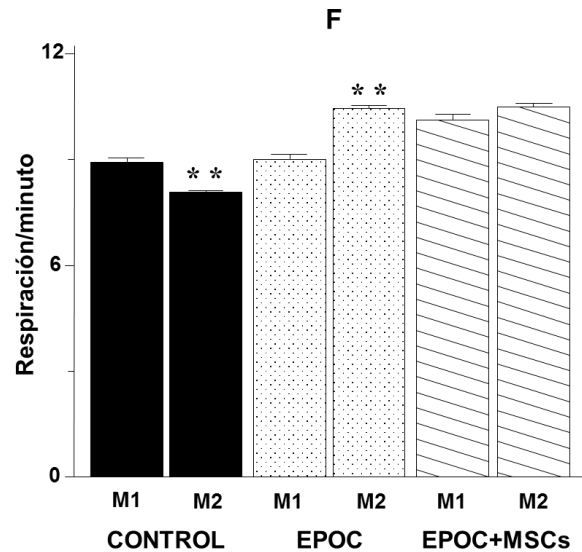


Figura 20. Efecto de las MSCs sobre la frecuencia respiratoria de cobayos con EPOC inducido por humo de tabaco (n=8). Se observó un diferencia significativa en el grupo de cobayos control y en el grupo con EPOC (M1 vs M2, \*\*p<0.01).

Cuando se evaluó el  $T_i$  observamos que al comparar M1 con M2 de cada grupo, el grupo con EPOC no tuvo diferencia significativa, en cambio el grupo de EPOC + MSCs incrementó el  $T_i$  significativamente (\*\* p<0.01). Cuando se comparó la M2 de cada grupo con el grupo control encontramos que EPOC disminuyó el  $T_i$  significativamente ( $\neq$  p<0.05), en el caso del grupo EPOC+MSCs lo incrementó ( $\neq$  p<0.01, figura 21A). Con respecto a  $T_e$  a diferencia de  $T_i$ , observamos que al comparar M1 con M2 de cada grupo, el grupo con EPOC tuvo diferencia significativa (\*\* p<0.01), en cambio no hubo diferencias significativas ni en el grupo de EPOC+MSCs, ni en el grupo control (figura 21 B). Al evaluar el M1 con el M2 del PIF y el PEF, se observó que el grupo de EPOC y EPOC +MSCs incrementan a éstos significativamente (\*\* p<0.01); nuevamente cuando se comparó la M2 de cada grupo con el grupo control encontramos que EPOC y EPOC +MSCs los incrementan significativamente ( $\neq$  p<0.01, Figura 21 C Y D).

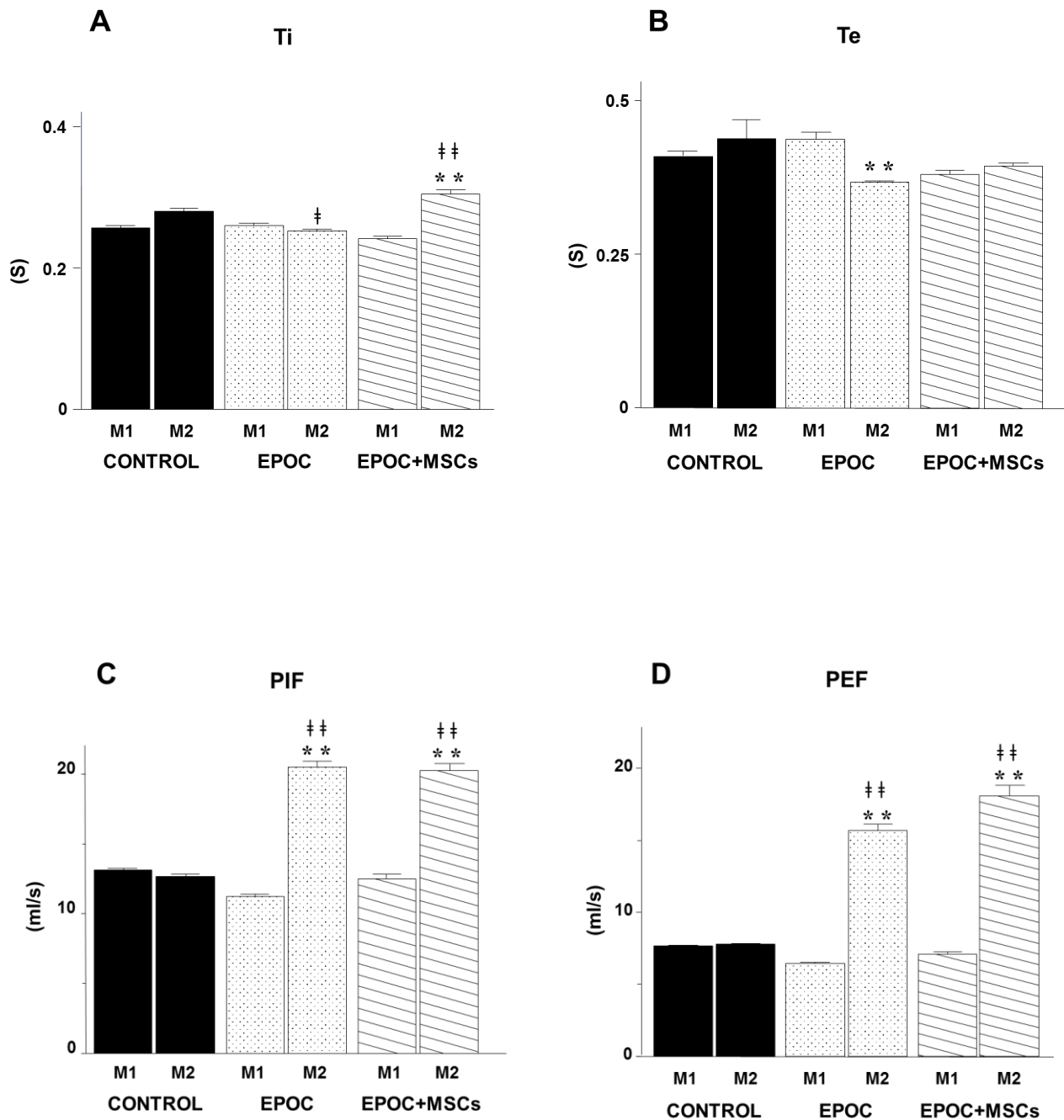


Figura 21. Períodos y flujos respiratorios de la pletismografía barométrica. A y B) Ti y Te: períodos respiratorios (s). C y D) PIF Y PEF: Flujos respiratorios (ml/s). \*\* P<0.01, †† p<0.01, n=8.

## LA INSTILACIÓN DE MSCs REDUCE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR EPOC

Para determinar a nivel morfológico el efecto de las MSCs sobre la EPOC, se analizaron cortes histológicos tanto del grupo control, como el de EPOC y el de EPOC+MSCs. En el corte histológico del grupo control se observó la integridad de la pared alveolar y bronquiolos sin engrosamiento muscular (figura 22 A); en el grupo de EPOC por el contrario del grupo control se encontró ruptura alveolar, infiltrado celular, engrosamiento de las paredes del bronquiolo y descamación del epitelio (figura 22 B). Sin embargo, la instilación de las MSCs redujo estos cambios, dando como resultado un menor infiltrado celular en las estructuras peribronquiales, alveolares y regeneración de la pared alveolar (figura 22 C).

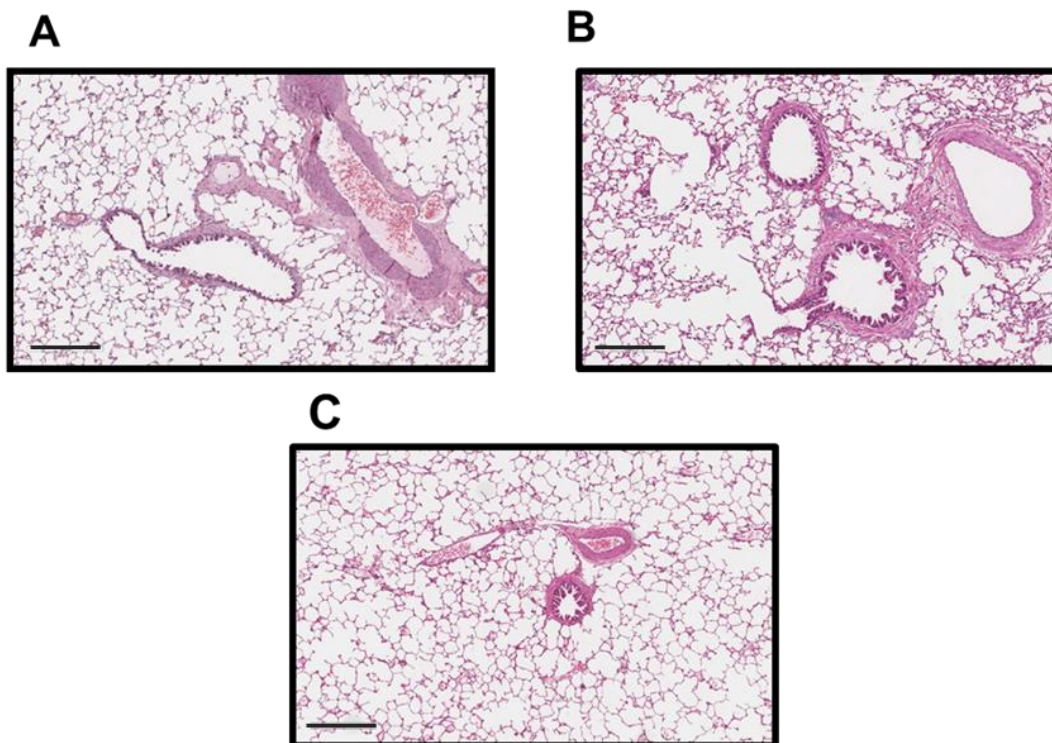


Figura 22. Imágenes representativas de los cambios histopatológicos inducidos por las MSCs sobre la EPOC en un modelo de cobayo. La tinción con hematoxilina y eosina de las secciones de pulmón demostró que la exposición al humo del cigarrillo induce lesiones enfisematosas, infiltrado celular y engrosamiento en la pared de los bronquios en el grupo de estudio de EPOC (B), en comparación con el grupo de control (A). Las MSCs promueven una recuperación del parénquima pulmonar al inducir la reparación de las paredes alveolares y reducir la cantidad de infiltración celular (C). La barra — representa 300  $\mu$ m.



## DISCUSIÓN

Se ha descrito que unas de las características de las MSCs es su capacidad de formar colonias (UFC; Samad N. *et al.* 2007; Rodríguez-Pardo *et al.* 2010). En el presente estudio se realizó la caracterización de las MSCs extraídas de médula ósea de cobayo evaluando esta capacidad, aunado a la morfología, su proliferación y sus características inmunofenotípicas. Las células de médula ósea de cobayo presentaron adherencia al plástico desde los primeros días de cultivo, además, se observó la presencia de UFCs y proliferación. En cuanto a su morfología las células mostraron una apariencia triangular en la zona del núcleo y con pequeñas prolongaciones en los primeros dos pasajes, posteriormente las prolongaciones se alargaron y la parte del núcleo se aplano aún más tomando una apariencia de huso o de fibroblasto, células con las que usualmente se comparan como lo mencionan trabajos previos en MSCs extraídas de médula ósea de humano (Kundrotas *et al.*, 2016) y en MSCs de médula ósea de murinos (Samad N. *et al.* 2007); sin embargo la diferencia morfológica entre las MSCs y los fibroblastos es su tamaño, pues existen antecedentes en la literatura de ensayos con microscopía invertida y tinción de Wrigth donde se observó que las MSCs en suspensión son de un tamaño superior a los fibroblastos (Páez *et al.*, 2007).

Samad N *et al.* (2007), demostraron que en los cultivos de MSCs de médula ósea en modelo murino mantenían sus características hasta el pasaje 3 y dependiendo del medio ambiente al que estuvieran expuestas aumentaba su capacidad para diferenciarse hasta el pasaje 10. Para realizar la inmunotipificación en este estudio, se utilizaron las células en cultivo de médula del tercer pasaje para evitar su diferenciación y senescencia.

Estas células fueron positivas a los marcadores mesenquimales CD44, CD29 y CD73 (Páez *et al.*, 2007; Carrasco *et al.*, 2010). No obstante la expresión de estos, sin la presencia de CD90 serían insuficientes para comprobar la identidad de las MSCs (Boxal y Jones, 2012). El CD90 muestra una expresión de casi un 90% en MSCs aisladas de médula ósea humana (Song L *et al.*, 2014), sin embargo, aunque la expresión de este marcador fue positiva en las aisladas de médula ósea de

cobayo esta fue menor al 50% debido a las diferencias que se presentan las MSCs entre especies (Boxal y Jones, 2012; Cuadro 4), la baja expresión de CD90 para MSCs de médula ósea de cobayo también fue reportada por Stavely y colaboradores en 2015 así como por Tura-Ceide y colaboradores en 2017.

Con las características morfológicas, la adherencia al plástico en cultivo, la presencia de UFCs, la expresión de los marcadores mesenquimales aunado a la ausencia de antígenos hematopoyéticos CD34 y CD45, pudimos corroborar la identidad de las MSCs aisladas de médula ósea de cobayo.

Cuadro 4. Expresión de los antígenos de superficie en MSCs en cultivo de diferentes especies. Modificado de Boxal y Jones, 2012.

Marcador	Humano	Ratón	Rata	Conejo	Cerdo	Perro	Oveja	Caballo
CD29	++	++	++	++	++	++	++	++
CD34	-	-		+-	-	-	-	-
CD44	++	++	+		++	+	++	+-
CD45	-	-	+-		-	-	-	-
CD73	++	+-	++		++	-	-	-
CD90	++	++	++		++	+-	-	++

Los símbolos muestran los niveles de expresión en de los marcadores en distintas especies: -: sin expresión; + -: <5% de expresión; +: 5-50% de expresión; ++: 50- 100% de expresión; los espacios en blanco indican que no hay trabajos previos que reporten el uso del marcador.

Por otro lado encontramos que en las células recién obtenidas de médula ósea, la ausencia o en su caso baja expresión de los marcadores de MSCs y la fuerte expresión de los marcadores hematopoyéticos en la inmunotipificación nos sugirió que era necesario la realización de un cultivo celular de estas para asegurar tener una población confiable de MSCs; estos resultados confirman lo reportado en la literatura donde se menciona que solo el 0.003% del total de células presentes en la médula ósea corresponde a MSCs (Páez D. *et al*, 2007).

La pletismografía barométrica es una valiosa herramienta para el estudio de las funciones pulmonares de animales en libre movimiento, en trabajos anteriores en nuestro equipo de trabajo, se han estratificado los parámetros pletismógrafos en tres grupos diferentes para facilitar su análisis: periodos respiratorios, donde encontramos a  $f$ ,  $T_i$  y  $T_e$ ; volúmenes respiratorios y flujos, entre los que se encuentran PIF, PEF y EF50; y por último, los índices respiratorios como el PenH (Villa, 2017).

En este sentido, observamos cambios en los períodos respiratorios de los cobayos con EPOC, debido a que la frecuencia respiratoria fue aumentada mientras que  $T_i$  y  $T_e$  disminuyeron respecto al grupo control. Vijayaraghavav *et al* (1993 y 1994); describen un patrón anormal en la función pulmonar a nivel alveolar en animales de laboratorio, que se caracteriza por el acortamiento de  $T_i$  y  $T_e$ , con un aumento en  $f$ , esta anomalía se atribuye al rompimiento del epitelio alveolar y al proceso inflamatorio producido en la patología de esta enfermedad. Así mismo este patrón respiratorio anormal en nuestro modelo de EPOC corresponde con lo observado en pacientes con esta enfermedad (Ramirez- Ramirez *et al*, 2017). Sin embargo la utilización de las MSCs en los cobayos con EPOC mejora estos parámetros aumentando los tiempos inspiratorios y espiratorios y manteniendo la frecuencia respiratoria respecto a su control.

Del mismo modo, los valores de los flujos aéreos PIF y PEF aumentaron en el grupo de EPOC como consecuencia a la creciente frecuencia respiratoria (Ramirez- Ramirez *et al*, 2017), esto también puede ser atribuido al aumento de la distensibilidad producida en la EPOC como resultado de la destrucción de las fibras

elásticas en las paredes alveolares (Tortora y Grabowski, 2003) impidiendo el flujo normal del aire por las vías aéreas. En el caso del grupo de EPOC+MSCs el incremento de Ti indujo un incrementó en PIF. Y por su parte el incremento de PEF en este grupo se debe principalmente a la obstrucción de la vía aérea observada por un aumento en el EF50 y PenH.

En los trabajos previos en nuestro grupo de trabajo no se encontró un aumento del índice PenH (Ramirez-Ramirez *et al*, 2017), sin embargo este ha sido descrito por otros autores con valores crecientes después de 5 semanas de exposición al humo de tabaco en modelo de cobayo (Domínguez *et al*, 2014). La utilización de las MSCs en cobayos con EPOC no produjo modificación alguna en estos parámetros, lo que sugiere la persistencia de ciertas características patológicas producidas durante la EPOC en estructuras adyacentes al epitelio alveolar.

Por otra parte los análisis histológicos han sido frecuentemente utilizados en el estudio de enfermedades como una herramienta para conocer las lesiones y alteraciones celulares, así como sus consecuencias estructurales y funcionales en los tejidos dañados. En el presente estudio, el corte histológico del grupo control se observó la integridad de la pared alveolar y bronquiolos sin engrosamiento muscular; en contraste en la histología de los cobayos con EPOC se presentaron una serie de afectaciones al tejido como la ruptura alveolar, infiltrado celular, engrosamiento de las paredes del bronquiolo y descamación del epitelio, estos resultados son correspondientes con los trabajos realizados por diversos autores que reportan la fisopatología de esta enfermedad (Mirza y Benzo, 2017; Department Of Health and Human Services, 2010; Ramirez-Ramirez *et al*, 2017). Sin embargo, la instilación de las MSCs redujo notablemente estos cambios, dando como resultado un menor infiltrado celular en las estructuras peribronquiales, alveolares y regeneración de la pared alveolar, estos resultados pueden ser atribuidos a las propiedades inmunorreguladoras y regeneradoras de las MSCs (Pistoia y Raffaghello, 2017; Uccelli *et al*, 2006; Stuckey *et al*, 2014).

Estos datos nos sugieren que es necesario realizar un estudio crónico para continuar evaluando las posibles modificaciones en los parámetros respiratorios.

## CONCLUSIONES

- Las células aisladas de médula ósea en cultivo fueron identificadas como MSCs al ser positivas con los marcadores CD29, CD73, CD90 y CD44 y negativas para CD34 y CD45.
- Las MSCs en el tratamiento de la EPOC, modifican favorablemente los siguientes parámetros pletismográficos: F; Ti; Te; PIF.
- Las MSCs instiladas no disminuyeron los parámetros de bronco-obstrucción y bronco-constricción en cobayos con EPOC.
- La instilación de las MSCs reduce los cambios histopatológicos producidos por la EPOC al promover la recuperación del tejido pulmonar.
- Las MSCs instiladas reducen la infiltración celular inducida por EPOC.
- Es necesario realizar un tratamiento a largo plazo en el EPOC con las MSCs, para poder evaluar si el PEF, EF50 y PenH se ven modificados.

## PERSPECTIVAS

- Llevar un tratamiento de largo plazo con las MSCs en la EPOC para determinar si los valores de EF50 y PenH se ven modificados favorablemente.
- Determinar la localización de las MSCs instiladas mediante un marcaje cromosómico (Técnica de Fish).
- Realizar cortes histológicos de las vías aéreas superiores en los grupos de EPOC y EPOC+MSCs para determinar el efecto de estas células.
- Determinar la acción inmunorreguladora de las MSCs instiladas por medio de la medición de citocinas pro-inflamatorias involucradas en EPOC como la IL-1, el TNF- $\alpha$ .
- Verificar la diferenciación de las MSCs en células epiteliales alveolares por técnicas de inmunohistoquímica.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1) Akram Khondoker M; Patel Neil; Spiteri Monica A; Forsyth Nicholas R. (2016) Lung Regeneration: Endogenous and Exogenous Stem Cell Mediated Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17: 2-27.
- 2) Afanasyev Boris V; Elstner Elena y. Zander Axel R, (2009), A.J. Friedenstein, founder the mesenchymal stem cell concept, *Cellular Therapy and Transplantation (CTT)*. Vol. 1 (3): 34-38.
- 3) Barnes Peter J; Burney Peter G. J; Silverman Edwin K; Celli Bartolome R; *et al.* (2015). Chronic obstructive pulmonary disease. Airway Disease Section, National Heart and Lung Institute, Imperial College, London. *Nature reviews disease primers*, 1: 1-21.
- 4) Bohórquez Hernández, Arlette. (2010). Caracterización de la hiperreactividad usando pletismografía barométrica en animales anestesiados y en libre movimiento. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx; México.
- 5) Boxall S.A; Jones E. (2012). Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. *Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International*, 2012: 1-12
- 6) Canning B J; Chou Y. (2008) Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 21: 702–720.
- 7) Caplan, A. I. (1991), mesenchymal stem cells, *Jornal of Orthopeadic Reserarch*. Vol. 9 (5): 641-645.

- 8) Carbajal Salinas Verónica E. (2006). Participación de la cinasa de proteína C y la cinasa de tirosina en la hiperreactividad producida por el leucotrieno D4 a la histamina en tiras de musculo liso traqueal de bovino. (Tesis de doctorado). Instituto Politécnico Nacional. México DF.
- 9) Carrasco Y; Ríos D; Castillo A. (2010). Células Mesenquimales Estromales. Revista Horizonte Médico, 10 (2): 32-36.
- 10) Cosio MG; Majo J; Cosio M. (2002). Inflammation of the Airways and Lung Parenchyma in COPD. Role of T Cells. Chest journal, 121 (5): 160S-165S.
- 11) Drago S; Zamora C, Gómez A; *et al.* (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. 17 (1): 42-55.
- 12) Dominguez F. D; Ferrer E; Puig P. R; Carreno C; Prats N; Aparici M; Musri M.M; Gavaldá A; Peinado V.I; Miralpeix M; Barberá J.A. (2014). Effects of acridinium bromide in a cigarette smoke-exposed guinea pig model of chronicobstructive pulmonary disease. Am J Respir Cell Mol Biol, 50: 337-346.
- 13) Dominici M; Le Blanc I; Mueller I, Slaper Cortenbach F; CMarini F; Krause R; Deans A; Keating D. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy, 8(4): 315-317.
- 14) Engel P, Boumesell L, Balderas R, Bensussan A; *et al.* (2015). CD Nomenclature 2015: Human Leukocyte Differentiation Antigen Workshops as a Driving Force in Immunology. The Journal of Immunology, 195: 4555-4563
- 15) Flores- Figueroa Eugenia; Montesinos Juan José y Mayani Hector, (2006), Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica, Revista de Investigación clínica. Vol. 58 (5): 498-511



- 16) Giraldo Estrada H. (2008). Medicamentos para el manejo actual de la EPOC. En Diagnóstico y tratamiento integral. Con énfasis en la rehabilitación pulmonar (103-112). Bogotá, Colombia: Médica Panamericana. 3° edición.
- 17) Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease, Guía de bolsillo para el diagnóstico, manejo y prevención de la EPOC, 2017.
- 18) Gonzalez AV; Coulombe; Ernsr P; Suissa S. (2017). Long-term use of inhaled corticosteroids in COPD and the risk of fracture. *Journal Chest*, S0012-3692(17)31243-6.
- 19) Guy G B; Guy F J, Bracke K R. (2011). New insights into the immunology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Lancet*, 378: 1015–1026.
- 20) Guyton y Hall. (2016). Respiración. En *Fisiología Médica* (477-484). University of Mississippi. U.S.A: Elzevir. 13° edición.
- 21) Hansel Trevor T. Y Barnes Peter J. (2004), Introduction: definitions, burden and causation. En *An Atlas of Chronic Obstructive Pulmonary Disease COPD* (9-15). New York U.S.A: Pathernon publishing.
- 22) Halbert R., Natoli J., Gano A., Badamgarav E., Buist A. y Mannino D. (2006). Global burden of COPD: systematic review and meta-analysis. *European Respiratory Journal*, 28: 523-532.
- 23) Heinz-Gerd Hoymann. (2006). New developments in lung function measurements in rodents. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57: S2, 5–11.
- 24) Hernández Ramírez P. (2011). Medicina regenerativa y aplicaciones de las células madre: una nueva revolución en medicina. *Revista Cubana de Medicina*, 50 (4): 338-340.

- 25) Junqueira L.C; Carneiro. (1987). Aparato Respiratorio. En Histología Básica (361-380). Barcelona España: Salvat.
- 26) Klimczac A; Kozłowska U; (2015). Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International, 2016: 1-11.
- 27) Kundrotas G; Gasperskaja; Splapsyte G; *et al.* (2016) Identity, proliferation capacity, genomic stability and novel senescence markers of mesenchymal stem cells isolated from low volume of human bone marrow. *Oncotarget*, 7 (10): 10788- 10802.
- 28) Lambrecht BN; Prins JB, Hoogsteden CH. (2001). Lung dendritic cells and host immunity to infection. *Eur Respir J*, 18 (4): 692-704.
- 29) Mata-Miranda M; Vázquez-Zapién G; Sánchez-Monroy V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y Reproducción Humana*, 27 (3): 194-199.
- 30) Mirones-Aguilar I; Mariñas-Pardo L. (2011). Presente y futuro de las terapias con células madre mesenquimales en patología pulmonar. *Pneuma Revista de la Sociedade Galega de Patoloxía Respiratoria, Pneumoloxía e Cirurxía Torácica*, 7 (2): 42-43.
- 31) Mirza S; Benzo R. (2017). Chronic Obstructive Pulmonary Disease Phenotypes: Implications for Care. *Concise Review For Clinicians*, 92 (7):1104-1112.
- 32) Montaña R. M; Cisneros L; Pedraza C; Ramos A. (2009). Presencia de estrés oxidativo en un modelo de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica inducido con exposición a humo de leña en cobayos. *Revista Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 22: 272- 279.

- 33) Ode A; Kopf J; Kurtz A; Schmidt-Bleek K; Schrade P; Kolar P; Buttgerit F; Lehmann K; Hutmacher DW; Duda GN, Kasper G. (2011). CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *Eur Cell Mater*, 6(22): 26-42.
- 34) Páez Guerrero D; Arévalo Romero J; Rodríguez Pardo V.M. (2007). Evaluación de las características morfológicas e inmunofenotipo de las células madre mesenquimales en cultivo obtenidas a partir de sangre de cordón umbilical y médula ósea. *NOVA*, 5 (8): 114-125.
- 35) Pistoia V; Raffaghello L. (2017). Mesenchymal stromal cells and autoimmunity. *International Immunol*, 29(2):49-58.
- 36) Polverino F; Seys J L, Bracke KR, Owen CA. (2016). B cells in chronic obstructive pulmonary disease: moving to center stage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 311 (4): L687-L695.
- 37) Puerto-Nevado; Pérez-Rial S; Girón-Martínez y Peces-Barba G. (2010). Papel de la inflamación en la etiopatogenia de la EPOC. *Archivos de Bronconeumología*. 46 (11): 2-7.
- 38) Qian H; Le Blanc K; Sigvardsson. (2012). Primary Mesenchymal Stem and Progenitor Cells from Bone Marrow Lack Expression of CD44 Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 287 (31): 25795-25807.
- 39) Rebollar Allala, Dina Claudia. 2014. El bloqueo de la hidrólisis de ATP amplifica el broncoespasmo inducido por el reto antigénico en cobayos: papel protector de las ectonucleotidasas. (tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México UNAM. México D.F.
- 40) Rodríguez-Pardo; Fuentes-Lacouture; Aristizabal-Castellanos y Vernot-Hernandez. (2010). Aislamiento y caracterización de células “stem”

mesenquimales de médula ósea humana según criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular. *Universitas Scientiarum*. 15 (3): 224-239.

- 41) Rojas M; Xu J; Woods C; Mora A; Spears W; Roman J; Brigham K. (2005). Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells in Repair of the Injured Lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 33: 145–152.
- 42) Selman M; Cisneros-Lira J; Gaxiola M; Ramirez R; Kudlacz EM; Mitchell PG, et al. (2003) Matrix metalloproteinases inhibition attenuates tobacco smoke-induced emphysema in guinea pigs. *Chest*, 123: 1633–1641.
- 43) Samad N; Masoud S; Reza H; Hosseni; Mohammad M; Amir A; Reza I. (2007). An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Biol*. 51: 723-729.
- 44) Sinclair Kenneth; Yerkovich Stephanie; Chambers Daniel C. (2013) Mesenchymal stem cells and the lung, *Respirology*, 18 (3): 397 – 411.
- 45) Song L; Guan X; Chen X; Cui; Han F; Guo X; Xu W. (2014). Mesenchymal Stem Cells Reduce Cigarette Smoke-Induced Inflammation and Airflow Obstruction in Rats via TGF- $\beta$ 1 Signaling. *Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. 11: 582-590.
- 46) Stavely R; Robinson A.M; Miller S; Boyd R; Skkal S; Nurgali K. (2015). Allogeneic guinea pig mesenchymal stem cells ameliorate neurological changes in experimental colitis. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1): 263-284.
- 47) Stuckey D.W; Shah K. (2014), Stem cell-based therapies for cancer treatment: Separating hope from hype. *Nat Rev Cancer*, 14: 683–691.
- 48) Tortora G.J; Grabowski S.R. (2003). *Principios de Anatomía y Fisiología*. (783-893). México, Oxford University Press. 9° edición.

- 49) Uccelli A; Moretta L; Pistoia V. (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Highlights Eur. Journal Immunol.*36:2566–2573.
- 50) U.S. Department of Health and Human Services. (2010). *How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health.
- 51) Vargas Mario H; Sommer Bettina; Bazán-Perkins Blanca; Montaña Luis M. (2010). Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in guinea pigs. *Vet Res Commun*, 34: 589–596.
- 52) Vestbo J; Hurd S; Alvar A; *et al.* (2013). Global Strategy for diagnosis, Management, and prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. GOLD executive summary. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 184 (4): 347–365.
- 53) Vijayaraghavan R; Schaper M; Thompson R; Stock M.F; Alarie Y. (1993). Characteristic modifications of the breathing pattern of mice to evaluate the effects of airborne chemicals on the respiratory tract. *Arch Toxicol*, 67: 478-490.
- 54) Vijayaraghavan R; Schaper M; Thompson R; Stock M.F; Boylstein L.A; Luo J.E; Alarie Y. (1994) Computer assisted recognition and quantitation of the effects of airborne chemicals acting at different areas of the respiratory tract in mice. *Arch Toxicol*, 68: 490-499.

- 55) Villa López, Carlos. (2017). Estudio de la función pulmonar con pletismografía barométrica en un modelo de enfermedad pulmonar obstructiva crónica en cobayo (*Cavia porcellus*). (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Mx; México.
- 56) Wright JL, Cosio M, Churg A. (2008). Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295: L1–L15.
- 57) Yang J; Jia Z. (2014). Cell-based therapy in lung regenerative medicine. *Regenerative Medicine Research*, 11 (2):1-7.