

## **Identificación de Moléculas Inductoras de Proliferación Celular en el Cultivo de Condrocitos de rata Wistar.**

**Casas-Mejía O<sup>1,2</sup>, Tapia Ramírez J<sup>3</sup>, Almonte-Becerril M<sup>1</sup>, Vázquez Tort M<sup>3</sup>, Kouri JB<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, <sup>3</sup>Departamento de Genética y Biología Molecular; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco 07360. México D.F.  
garyhouses@hotmail.com.<sup>2</sup>

La osteoartritis (OA) es la enfermedad crónico-degenerativa más frecuente y de mayor prevalencia e impacto social y económico en el mundo [1]. Afecta las articulaciones provocando la degradación del cartílago articular; el cartílago está constituido por un solo grupo celular llamado condrocitos, embebidos en una matriz extracelular (constituida principalmente de colágena y proteoglicanos) que ellos mismos sintetizan y dan mantenimiento[2].

Las lesiones en el cartílago articular continúan siendo un reto para la medicina moderna, ya que en el adulto, el cartílago tiene muy escasa capacidad de reparación espontánea, debido a que los condrocitos son células altamente diferenciadas, además las lesiones cartilaginosas en las articulaciones son altamente incapacitantes [3].

Existen diversos procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de las lesiones focales del cartílago articular, entre los que se encuentran la artroplastia por abrasión, la microfractura, la mosaicoplastia, los aloinjertos, osteocondrales y recientemente el trasplante de condrocitos autólogos. [4] Sin embargo, los resultados clínicos no han sido del todo satisfactorios, debido a que el proceso de rehabilitación es muy largo.

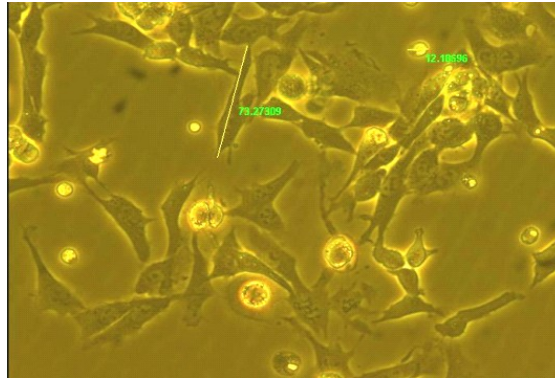
Por otra parte, la ingeniería de tejidos, también conocida como medicina regenerativa tiene la finalidad de mejorar o reemplazar parcial o totalmente funciones biológicas (por ejemplo hueso, cartílago, válvula cardiaca, vejiga, etc.) a través de diversas metodologías especializadas. La ingeniería de tejidos, usa fundamentalmente células cultivadas y/o modificadas genéticamente en el laboratorio como material de ingeniería. Así mismo, los cultivos celulares in Vitro son una herramienta en la investigación, que permiten elucidar los mecanismos involucrados en las fisiopatologías de las enfermedades [5].

En la actualidad, se ha trabajado en el diseño de tratamientos menos invasivos para la reparación del cartílago dañado en enfermedades tales como la OA, aunque a la fecha, ninguno ha sido 100% eficaz, debido a diversos problemas de compatibilidad, infecciones, entre otros. Por lo que el uso de herramientas de ingeniería de tejido y cultivo de células para la obtención de nuevas alternativas terapéuticas, ya sea por el uso de moléculas involucradas en la reparación o proliferación celular, son una opción para el diseño a largo plazo de tratamientos que no requieren una cirugía tan agresiva y que permitirían prevenir e incluso reparar el tejido dañado, evitando así la discapacidad total del paciente y mejorando su calidad de vida.

En base a lo anterior mostrado, el objetivo del presente estudio es el determinar las moléculas presentes en el sobrenadante del medio de cultivo procedente de una monocapa de condrocitos, que puedan estar involucradas en la proliferación celular. Evaluando el crecimiento de estas células en cultivos en monocapa y las diversas moléculas liberadas en el medio que inducen la proliferación celular.

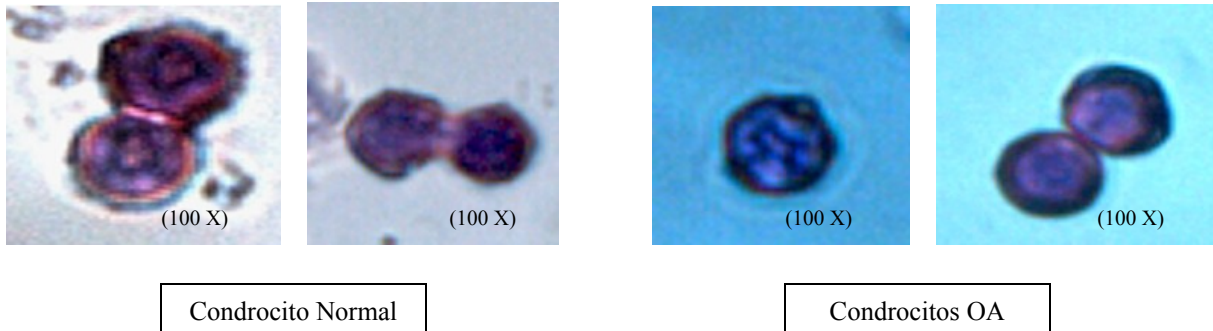
Para llevar a cabo este proyecto, se realizó un cultivo en monocapa de condrocitos de cartílago articular de rata Wistar (130-150g de peso), en medio DMEM y suplementado con suero fetal Bovino al 10% (SFB), sembrando 280 000 cels/caja y cambiando el medio cada que el pH virara. Una vez que llego al 100% de confluencia la monocapa

fue tripsinizada (Trisina- EDTA 2.5%), se determino la viabilidad; posteriormente se re-sembró bajo las mismas condiciones hasta completar 4 pases.



**Figura 1** Condrocitos cultivados en monocapa en medio DMEM suplementado con SFB al 10%, cuarto pase.

Posteriormente, el sobrenadante obtenido de la monocapa del primer pase fue usado como medio para cultivar condrocitos normales y con OA experimental de rata Wistar [6] para determinar la proliferación celular usando citometría de flujo por tinción con Carboxifluorescein succinil Ester (CFSE), e identificar por tinción habitual de Hematoxilina-Eosina (H-E) la presencia de índices mitóticos en condrocitos OA.



**Fig 2.** Muestra condrocitos normales y OA en división celular, procedentes del cultivo en medio enriquecido.

Finalmente con el uso de herramientas de biología molecular, se realizara la separación de proteínas a través de membranas de diálisis, en los sobrenadantes de los diferentes pases; posteriormente por espectrometría de masas, se identificarán los diversos factores de crecimiento que puedan estar involucrados en la proliferación celular.

Los resultados preliminares muestran que los condrocitos OA y normales embebidos en perlas de alginato y cultivados en medio enriquecido proveniente de la monocapa de condrocitos, incrementaron la proliferación celular; y por microscopía óptica se identificaron mayor número de condrocitos en división en comparación con el cultivo control (Medio DMEM solo). Además, como resultados observados por nuestro grupo de trabajo el estudio de las células en monocapa [7] reveló un incremento en la expresión de factores tales como TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  y IGF- $\beta$  en los condrocitos provenientes de la monocapa de los diferentes pases.

**Bibliografía:**

- [1] Quintero M., J. of Rheumatology (2001)
- [2] Kühn K, D'Lima D, Hashimoto S and Lotz M, Osteoarthritis and cartilage 12 (2004) 1-16.
- [3] Pavia Mota E, Larios González MG, Briceño-Cortes G, Archivos en Medicina Familiar, 7 (2005) 93-98.
- [4] Peterson L. Insall & Scott. Rodilla. Madrid: Marbán (2004) 341-56
- [5] Broom N, [J Anat](#) 6 (2001) 683-98
- [6] Abbud Lozoya K and Kouri Flores JB. Pathology Research and Practice 196 (2000) 729-745.
- [7]. Vázquez Tort M., Tesis de Maestría (2006).

**Agradecimientos:**

Agradecemos a la M. en C. Matilde Vázquez Tort y al Dr. José Tapia, del Departamento de Genética y Biología Molecular por su colaboración y asesoría para la realización de este trabajo. Asimismo, a los auxiliares: Bióloga Magdalena Miranda, M en C. Raymundo Cruz, y estudiantes de posgrado: M. en C. Elena González, M en C. Mariel Rojas Ortega que integran el grupo de trabajo en osteoartritis, bajo la dirección del Dr. Juan B. Kouri Flores.