

**Informe de avances de Investigación**

**Facultad de Veterinaria – Sede Cañuelas**

**Relación de Información requerida para plataforma CONEAU**

**Fichas de Investigación**

*Título de del proyecto:*

Refinamiento de métodos mínimamente invasivos para la obtención de células madre mesenquimales equinas.

*Objetivo general*

Optimizar la obtención de células madre mesenquimales equinas a partir de tejido sanguíneo y tejido adiposo.

*Objetivos específicos:*

- Aislar células madre mesenquimales equinas derivadas de la sangre periférica (ePBMSC) empleando electro acupuntura para estimular la médula ósea e incrementar la cosecha de células.
- Optimizar el aislamiento de células madre sanguíneas empleando tubos BD Vacutainer CPT.
- Obtener células madre mesenquimales equinas derivadas del tejido adiposo (eAMSC) empleando la técnica de mini liposucción (MELA) como método alternativo a la lipectomía.
- Comparar el rendimiento de células madre mesenquimales derivadas de la sangre vs. del tejido adiposo.

*Hipótesis*

Es posible obtener células madre mesenquimales equinas en cantidad suficiente para tratamientos regenerativos a partir de sangre periférica de equinos estimulados mediante electroacupuntura, empleando la metodología BD Vacutainer CPT, así como también de tejido adiposo obtenido por MELA.

*Introducción*

Las terapias celulares son herramientas muy valiosas en el campo de la medicina regenerativa en humanos y animales. Dentro de las terapias celulares se destaca el

uso de células madre mesenquimales y en equinos particularmente ha sido documentada su utilización principalmente en trastornos ortopédicos en animales deportivos. Las células madre mesenquimales son células adultas que pueden encontrarse en diversos tejidos, pero los más comúnmente utilizados son la médula ósea y el tejido adiposo. En ambos casos, los procedimientos de obtención son invasivos con ventajas y desventajas cada uno de ellos. En lo que respecta al rendimiento celular, el tejido adiposo blanco es por excelencia el más adecuado. Sin embargo, para obtener este tejido es necesario realizar una cirugía menor. Recientemente, la técnica de mini liposucción (MELA) ofrece una excelente alternativa que conlleva menos complicaciones postquirúrgicas, así como mínimas alteraciones anatómicas en equinos deportivos.

Además del tejido adiposo y de la médula ósea, se han aislado células madre mesenquimales de cordón umbilical, sangre de cordón, sangre periférica, entre otros. Diversos estudios han demostrado que es posible aislar células madre a partir de la sangre, siendo un recurso muy valioso y de fácil obtención para desarrollar terapias regenerativas. Sin embargo, la mayoría de los ensayos clínicos se basan en el uso de células de la médula ósea y del tejido adiposo. En cuanto a la cantidad de células que pueden obtenerse de la sangre periférica es mucho menor que el tejido adiposo pero dadas las características de la especie equina, es posible tomar grandes muestras de sangre y refinando la metodología de aislamiento podría ser una fuente muy útil de células madre adultas. Se ha demostrado que mediante fármacos es posible aumentar la liberación de células desde la médula ósea hacia la sangre, pero en equinos no sería factible su uso clínico dado el elevado costo del tratamiento y el riesgo de doping. Por esto, se desarrollaron alternativas como la electroacupuntura que ha demostrado ser efectiva no solo en equinos sino en humanos y murinos. Por lo expuesto, es necesario optimizar la obtención de células madre mesenquimales equinas no solo para obtenerlas en cantidad suficiente con fines terapéuticos sino para minimizar el daño en los pacientes donantes, en la búsqueda de procedimientos mínimamente invasivos de obtención de células.

### *Metodología*

**Animales:** se utilizarán equinos del campus experimental de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de UCES – Cañuelas y pacientes donantes que pudieran concurrir al hospital de grandes animales (con el consentimiento del propietario del animal). Los procedimientos serán realizados exclusivamente por veterinarios en colaboración con estudiantes de la carrera de Veterinaria, cumpliendo las normas que garantizan el uso seguro y ético de animales de experimentación, velando por su bienestar.

**Estimulación de la médula ósea mediante electroacupuntura:** se realizarán sesiones de 40 min, según protocolos publicados, 2 a 4 horas previo a la toma de muestra de sangre. Como control se realizarán recuentos de leucocitos previo y posterior a la sesión y se evaluarán las células en extendidos del *buffy coat* y de la sangre entera.

**Obtención de células madre mesenquimales equinas de sangre periférica (ePBMSC):** se tomarán muestras de 60 ml de sangre de la vena yugular, pudiendo realizarse una sedación leve con medetomidina y butorfanol para facilitar la maniobra. La sangre

será colocada en tubos BD Vacutainer CPT y centrifugada, luego las células mononucleares serán lavadas y sembradas en frascos de cultivo adecuados a la densidad de siembra.

Obtención de células madre mesenquimales equinas derivadas del tejido adiposo (eAMSC): se realizará la técnica de mini liposucción (MELA) en equinos bajo sedación con medetomidina y butorfanol, empleando una cánula de instilación de solución anestésica y otra de aspiración del tejido adiposo subcutáneo de la región glútea. Se administrará una dosis profiláctica de antibiótico y antiinflamatorio. El tejido adiposo obtenido será sometido a digestión enzimática y la fracción estromal vascular obtenida será sembrada en frascos de cultivo adecuados a la densidad de siembra. Condiciones de cultivo: medio DMEM bajo en glucosa suplementado con antibióticos y 20% de suero fetal bovino. Las células se mantendrán en una incubadora de cultivo durante la evaluación del crecimiento *in vitro*. Finalmente, se criopreservarán para futuros ensayos y/o usos clínicos.

Evaluación del crecimiento *in vitro* de las células madre mesenquimales: se evaluará el rendimiento de obtención de células en ambos casos (sangre y tejido adiposo), teniendo en cuenta el tiempo de duplicación en los diferentes pasajes celulares.

*Director de la actividad:* Dr. Vet. Alejandro Maruri, Jefe de Trabajos Prácticos de Histología y Embriología, Veterinaria, UCES.

La actividad se llevará a cabo en el campus experimental de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, el Hospital de grandes animales y el laboratorio del Hospital de pequeños animales, UCES, Cañuelas.

Carreras de grado y posgrados con los que se vincula el proyecto: se vincula con temáticas de Histología y Embriología, biotecnología y ciencias básicas y aplicadas de la Carrera de Veterinaria.

Investigadores que participan del proyecto:  
Mg. Vet. María Fernanda Tello, Titular, Veterinaria UCES.  
Dr. Hugo Scipioni, Decano Facultad de Veterinaria UCES.

Alumnos participantes: de la materia Histología y Embriología y los alumnos que están en condiciones de realizar el trabajo final

Duración del proyecto:  
Fecha de inicio: agosto 2022  
Fecha de finalización: agosto de 2023.

De los resultados de la investigación realizada se espera obtener publicaciones a congresos y al menos un artículo científico en revista con referato. Asimismo, los resultados del proyecto podrían formar parte de una tesis de grado o posgrado.