



EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LOS CULTIVOS DE CONDROCITOS MEDIANTE MICROANÁLISIS POR ENERGÍA DISPERSIVA DE RAYOS X

R. Ibáñez, A. Fernández Montoya, A. Montalvo, M. González Andrades, M. Alaminos, A. Campos.

Grupo de Ingeniería Tisular, Departamento de Histología, Universidad de Granada.

Centro Regional de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Granada.

El reciente avance de las técnicas relacionadas con el cultivo celular y tisular ha posibilitado la generación de cultivos primarios de condrocitos para su eventual uso terapéutico. Sin embargo, y aunque es bien sabido que las células mantenidas en cultivo tienden a perder viabilidad durante los sucesivos subcultivos, existen muy pocos métodos que permitan evaluar la viabilidad de estas células de forma fiable y previamente a su implante en pacientes afectados de patología articular. A este respecto, la determinación del índice K/Na mediante microanálisis celular por energía dispersiva de rayos X es una de las técnicas más sensibles y específicas a la hora de analizar la viabilidad de una población celular.

Objetivo. El objetivo de este trabajo es evaluar la viabilidad de los condrocitos mantenidos en cultivo durante varios pases y determinar el momento en el que la viabilidad es adecuada para su utilización en protocolos de ingeniería tisular.

Metodología. En primer lugar, en este trabajo se establecieron cultivos primarios de condrocitos procedentes de la superficie articular del cóndilo de la mandíbula de ratas Wistar de laboratorio. Para ello, y tras sacrificar a los animales, se obtuvieron fragmentos de cartílago articular hialino del cóndilo mandibular, los cuales se trataron con colagenasa I durante 6 h para provocar la digestión de la matriz extracelular y aislar los condrocitos. Posteriormente, se recogieron las células mediante centrifugación, cultivándose en medio DMEM enriquecido con diversos factores de crecimiento. Una vez subconfluentes, los cultivos de condrocitos se subcultivaron hasta el 6º pase utilizando para ello tripsina-EDTA a 37°C durante 10 minutos. En cada subcultivo, se analizó la viabilidad celular mediante tinción con azul tripán y mediante microscopía electrónica analítica (microanálisis por energía dispersiva de rayos X).

Resultados. Los resultados del ensayo con azul tripán mostraron porcentajes de supervivencia celular muy similares entre los distintos pases analizados, apreciándose un leve descenso en los últimos pases. Concretamente, los porcentajes de supervivencia celular en los pases 1 a 6 fueron del 99'2, 95'1, 97'4, 98'6, 89'4 y 87'3% respectivamente. Sin embargo, el microanálisis por energía dispersiva de rayos X mostró diferencias significativas entre los diferentes subcultivos, con índices K/Na de 0'07, 2'69, 15'61, 4'65, 2'46 y 1'48 para los 6 primeros pases celulares, respectivamente.

Conclusiones. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la viabilidad de los condrocitos mantenidos en cultivo depende directamente del subcultivo al cual pertenecen las células, siendo máxima para el tercer subcultivo y disminuyendo significativamente a partir del cuarto. Todo ello sugiere que sólo las células correspondientes a los pases segundo a cuarto, especialmente el tercero, deberían ser usadas en ingeniería tisular.

Financiado por P06-CTS-2191.