



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**PADRONIZACIÓN DE PROTOCOLO DE CARACTERIZACIÓN
CROMOSÓMICA DE CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES
MSCs DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO CANINO cAD-MSC
PARA LA VERIFICACIÓN DE ESTABILIDAD GENÉTICA *IN
VITRO*.**

CECILIA BOBADILLA OCAMPO

Foz do Iguaçu
2022.



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**PADRONIZACIÓN DE PROTOCOLO DE CARACTERIZACIÓN
CROMOSÓMICA DE CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES
MSCs DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO CANINO CAD-MSC
PARA LA VERIFICACIÓN DE ESTABILIDAD GENÉTICA *IN
VITRO.***

CECILIA BOBADILLA OCAMPO

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latino-Americano de Ciências da vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial para la obtención del título de Bacharel em Biotecnología.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis Maria Ruiz.

Foz do Iguaçu
2022

CECILIA BOBADILLA OCAMPO

**PADRONIZACIÓN DE PROTOCOLO DE CARACTERIZACIÓN
CROMOSÓMICA DE CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES
MSCs DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO CANINO CAD-MSC
PARA LA VERIFICACIÓN DE ESTABILIDAD GENÉTICA *IN
VITRO.***

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latino-Americano de Ciências da vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial para la obtención del título de Bacharel em Biotecnología.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz.
UNILA

Profa. Dra. Jessica Moraes Malheiros.
UNILA

Profa. Dra. Tathianne Pastana de Sousa Poltronieri
UNILA

Foz do Iguaçu 8 de agosto de 2022.

TERMINO DE SUMISIÓN DE TRABAJOS ACADÉMICOS.

Nombre completo de la autora: Cecilia Bobadilla Ocampo.

Curso: Biotecnología.

	Tipo de Documento
(X) graduación	(.....) artículo
(.....) especialización	(X) trabajo de conclusión de curso
(.....) maestría	(.....) monografía
(.....) doctorado	(.....) disertación
	(.....) tesis
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuales
	(.....) _____

Título del trabajo académico: Padronización de Protocolo de Caracterización cromosómica de Células madres mesenquimales MSCA derivadas de tejido adiposo canino cAD-MSC para la verificación de la estabilidad genética *in vitro*.

Nombre del Orientador: Prof. Dr. Jorge Luis María Ruiz.

Fecha da Defensa: __08__ / __08__ / 2022__

Licencia no - exclusiva de Distribución.

El referido autor(a):

a) Declara que el documento entregado es su trabajo original, y que tiene el derecho de conceder los derechos consentidos en esta licencia. Declara también que la entrega del documento no infringe, tanto donde es posible saber, los derechos de cualquier otra persona o entidad.

b) Si el documento entregado contiene material del cual no posee los derechos del autor, declara que obtuvo autorización del titular de los derechos del autor para otorgar a la UNILA Universidade Federal da Integração Latino-Americana los derechos requeridos por esta licencia y que ese material cuyo derecho son de terceros esta claramente identificado y reconocido en el texto o contenido del documento entregado.

Si el documento entregado esta basado en trabajo financiado o apoyado por otra institución que no sea la Universidad Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumplió cualquier obligación exigida por el respectivo contrato o acuerdo.

En la calidad de titular de los derechos del contenido mencionado, el autor autoriza a la Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar la obra, gratuitamente y de acuerdo con a licencia pública [Creative Commons Licença 3.0 Unported](#).

Foz do Iguaçu 8 de agosto de 2022.

Firma del responsable.

AGRADECIMIENTO.

En el proceso de elaboración de este trabajo recibí apoyo y colaboración de varias personas a lo largo del trayecto del desenvolvimiento de este trabajo.

Por lo tanto agradezco primeramente a mi orientador el profesor Dr. Jorge Luis María Ruiz; por la paciencia y el acompañamiento.

Me gustaría agradecer también a la Bióloga Maria Antonella Silva Lezcano por ceder la imagen de su trabajo en cariotipo.

A Luis Beltrán por la ayuda con las células madre caninas; en la parte experimental del procedimiento.

A Leticia Alcaraz compañera de curso; quien fue de mucha ayuda en la recomendación de la herramientas de imágenes.

DEDICATORIA.

A mi familia y amigos por el apoyo; mi mama, y a la memoria de padre y muy especialmente a mis hermanos a quienes amo muchísimo.

RESUMEN

OCAMPO, Cecilia Bobadilla. **PADRONIZACIÓN DE PROTOCOLO DE CARACTERIZACIÓN CROMOSÓMICA DE CÉLULAS MADRES MESENQUIMALES MSCs DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO CANINO cAD-MSC PARA LA VERIFICACIÓN DE ESTABILIDAD GENÉTICA *IN VITRO*.**

77 Paginas. Trabajo de Conclusión de Curso II. (graduación en Biotecnología) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

Las células madre adultas *Adult stem cells* – ASC tienen un alto potencial de uso de la medicina regenerativa; tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria, dada su capacidad de reparar lesiones y regenerar tejidos dañados; entre las ASC para uso clínico las células madre adiposas ASCs (*Adipogenic stem cells*) tienen mayor potencial de uso por ser una fuente abundante y de extracción relativamente menos invasiva; no obstante su aplicación clínica debe estar primeramente respaldada por estudios de rutina que verifiquen su estabilidad genética y su seguridad para futuras aplicaciones clínica, por un lado los métodos convencionales de elaboración de cariotípo son muy laboriosas y demoradas, por otro lado las herramientas digitales de cariotipage en su mayoría exigen una licencia de uso pagada. El presente trabajo tuvo como objetivo padronizar un protocolo de caracterización cromosómica de células madres derivadas de tejido adiposo canino cAD- MSC

Para ello fueron adquiridos muestras de cAD- MSC procedente de una cirugía de castración; fueron aisladas y cultivadas *in vitro*, tratadas con colchicina, desagregadas, pre-tratadas y teñidas con Giemsa, microfografiadas, y procesadas; también se utilizaron cromosomas humanos para replicar el procedimiento y comparar la funcionalidad del procedimiento. Los resultados demostraron que los complementos de caracterización son eficientes en las cromosomas humanos; tanto en la caracterización numérica como morfológica; no obstante las imágenes de los cromosomas de las cAD- MSC, no pudieron ser procesadas en función a la falta de un método de segmentación mas adecuadas a la cantidad de cromosomas que presentan, y a la necesidad de mejoras en el método de tinción, tanto en la concentración como en el tiempo de exposición al mismo.

Palabras Claves: Células madre adultas caninas; medicina generativa, caracterización de cromosomas.

RESUMO

OCAMPO, Cecilia Bobadilla. **PADRONIZAÇÃO DE PROTOCOLO PARA CARACTERIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE MSCs DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO CAD-MSC PARA A VERIFICAÇÃO DA ESTABILIDADE GENÉTICA *IN VITRO***. 77 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II. (Graduação em Biotecnologia) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2022.

As células-tronco adultas ou ASC apresentam um alto potencial para uso em medicina regenerativa; tanto na medicina humana como na medicina veterinária, dada a sua capacidade de reparar lesões e regenerar tecidos danificados; as ASC para uso clínico, as ASCs ou Células-tronco adipogênicas têm maior potencial de uso por serem uma fonte abundante e relativamente menos invasiva para sua extração; no entanto, sua aplicação clínica deve primeiro ser verificada por estudos de catiotipo que verifiquem sua estabilidade genética e, portanto, sua segurança para futuras aplicações clínicas, por um lado, os métodos convencionais de cariotipagem são muito trabalhosos e demorados, e por outro lado, a maioria das ferramentas de cariotipagem digital exigem uma licença de usuário paga. O objetivo deste trabalho foi padronizar um protocolo para a caracterização cromossômica de células-tronco derivadas de tecido adiposo canino (cAD-MSC). Para isso, foram adquiridas amostras de cAD-MSC provenientes de cirurgia de castração; foram isolados e cultivados *in vitro*, tratados com colchicina, desagregados, pré-tratados e coradas com Giemsa, microfotografadas e processados; também foram usados cromossomos humanos para replicar o procedimento e comparar a funcionalidade do procedimento. Os resultados demonstraram que o plugins de caracterização são eficientes em cromossomos humanos; tanto na caracterização numérica como morfológica; No entanto, as imagens dos cromossomos cAD-MSC não puderam ser processadas devido à falta de um método de segmentação mais adequado ao número de cromossomos que apresentam, e à necessidade de melhorias no método de coloração, tanto na concentração quanto no tempo de exposição ao mesmo.

Palavras-Chave: Células-tronco adultas caninas; medicina generativa, caracterização de cromossomos.

INDICE DE ILUSTRACIONES.

Ilustración 1: Criterios mínimos que caracterizan a las MSCs.....	5
Ilustración 2: alternativa terapéuticas.....	8
Ilustración 3: Aplicación terapeutica de ASCs alogénica.....	9
Ilustración 4: Constitución morfológica de los cromosomas del <i>Canis lupus familiaris</i>	12
Ilustración 5: fujograma del procedimiento de un cariotipaje automatizado...	14
Ilustración 6: Imagen de la Confluencia del cultivo celular 5 días después del cultivo.....	21
Ilustración 7: Imágenes correspondientes al procedimientos de tripsinización y centrifugación.....	22
Ilustración 8: Lavado, secado de laminas y tinción con Giemsa.....	23
Ilustración 9: microscopio óptico utilizado para la adquisición de imágenes..	24
Ilustración 10: pre- procesamieto de imagen de cromosomas de linfocito humanos.....	27
Ilustración 11: selección de imagen previa al método de segmentación.....	28
Ilustración 12: selección del método de segmentación.....	29
Ilustración 13: Umbralización o (Threshold) con fondo (background) rojo.....	30
Ilustración 14: Segmentación de fondo rojo, conversión a un escala de gris de 16 bit , e inversión de LUT.....	30
Ilustración 15: Ventana del complemento ChromosomeJ previa a la extracción de la información numérica.....	32
Ilustración 16: Etapas de procedimiento final de uso del complemento ChromosomeJ.....	33
Ilustración 17: Proceso de extracción de características cromosómicas con LEVAN.....	34
Ilustración 18: Resultado de la extracción de información numérica del plugin ChromosomeJ.....	35
Ilustración 19: Resultado de la etapa de extracción de informaciones mediante el complemento LEVAN.....	36
Ilustración 20: Imagen de metafase seleccionada del tratamiento 2 para la segmentación.....	38
Ilustración 21: Imágenes resultados del tratamiento T3 con colchicina antes y después de la segmentación.....	39
Ilustración 22: Imágenes de una de las metafases resultados del tratamiento T4 con colchicina antes y después de la segmentación.....	40

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tiempos de exposición de la solución colchicina para optimizar la formación de los cromosomas mitóticos.....	22
Tabla 2: Tabla de Tiempos de Tratamiento (T) de la solución colchicina para la formación de los cromosomas mitóticos, * denotando el tiempo que exposición correspondiente a T2.....	61
Tabla 3: Tabla de Tiempos de Tratamiento (T) de la solución colchicina para la formación de los cromosomas mitóticos, * denotando el tiempo que exposición correspondiente a T3.....	66
Tabla 4: Tabla de Tiempos de Tratamiento (T) de la solución colchicina para la formación de los cromosomas mitóticos, * denotando el tiempo que exposición correspondiente a T4.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS.

AD-MSCs: Células madres mesenquimales derivadas de tejido adiposo-
Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue.

ADSCs: células madres adipogénicas -del inglés adipogenic Stem cells

ASC: células madre adultas -del inglés - adults Stem cells.

ASCs: células madre de tejido adiposo, del inglés adipogenic Stem cells.

CASCs: células madre adiposas - del inglés - canine adipogenic Stem cells.

CFU-F: colonias formadoras de fibroblastos.

MSCs: células madre mesenquimales caninas- del inglés-canine
mesenchymal stem cells

ESCs: células madre embrionarias del inglés - embryonic stem cell.

hMSC- MSC: células madre mesenquimales multipotente humanas

ISCT: Sociedad Internacional para la terapia celular- del inglés - International
Society for Cellular Therapy.

cAD-MSC: Células madres mesenquimales derivadas de tejido adiposo
canino- del inglés- Mesenchymal stem cells derived from canine adipose
tissue.

Sc-AD-MSC: Células madres mesenquimales derivadas de tejido adiposo
subcutáneo- del inglés - Mesenchymal stem cells derived from subcutaneous
adipose tissue.

SVF: fracciones vasculares del estroma- del inglés- StromaVascular Fraction.

Vs-AD-MSC: Células madres mesenquimales derivadas de tejido adiposo
visceral- del inglés- Mesenchymal stem cells derived from visceral adipose
tissue.

SUMARIO

1 .INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 CÉLULAS MADRES.....	3
2.1.2 Clasificación de células madres:.....	3
2.2 CÉLULAS MADRES SOMÁTICAS ADULTAS (ASC).....	4
2.3 LAS MSCS O CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES:.....	4
2.3.1 Características de MSCs.....	5
2.4 APLICACIONES DE LAS MSCs EN LA TERAPIA AVANZADA.....	6
2.5 VENTAJAS DE USO DE CÉLULAS MADRE ADIPOSAS ADSCs EN LA MEDICINA REGENERATIVA.....	7
2.6 IMPLICACIONES Y ASPECTOS NECESARIOS PARA LA APLICACIÓN DE LAS ADSC EN LA TERAPIA AVANZADA.....	9
2.6.1 Normativas regulatorias Internacionales de uso de células en la terapia y la investigación.....	10
2.7 ASPECTOS CITOGENÉTICOS.....	11
2.8 CITOGENÉTICA EN EL DIAGNOSTICO CLÍNICO.....	13
2.8.1 CARIOTIPO CONVENCIONAL.....	13
2.9 PROCESAMIENTO SEMI - AUTOMATIZADO DE CARIÓTIPOS:.....	13
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	18
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
5. MATERIALES Y MÉTODO.....	19
5.1 ASPECTOS ÉTICOS RELACIONADOS AL USO DEL MATERIAL BIOLÓGICO E IMÁGENES PARA FINES DE INVESTIGACIÓN.....	19
5.1.2 ADQUISICIÓN DE MUESTRA DE TEJIDO ADIPOSO CANINO.	19
5.2 AISLAMIENTO ENZIMÁTICO DE LAS CÉLULAS MADRE ADIPOSAS.....	20
5.3 EXPANSIÓN CELULAR DE cAD-MSCs.....	20
5.4 CONTEO Y CULTIVO DE cAD-MSCs.....	21
5.5 TRATAMIENTO PREPARATORIO CELULAR PREVIO AL MONTAJE DE CARIÓTIPO.....	21

5.5.1 TRATAMIENTO CON SOLUCIÓN COLCHICÍNA.....	21
5.5.2 DESAGREGACIÓN ENZIMÁTICA.....	22
5.6 PREPARACIÓN DE LAS cAD-MSCs Y TINCIÓN CROMOSÓMICA.	23
5.7 MICROSCOPIA:.....	24
5.8 Descarga e Instalación del <i>Software</i> ImageJ versión Fiji.....	24
5.9 PROCESAMIENTO AUTOMATIZADOS DE ELABORACIÓN DE CARIOTIPO.....	25
8. CONSIDERACIONES FINALES.....	44
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
10. ANEXO.....	56

1 .INTRODUCCIÓN.

Las células madre son células no especializadas capaces de diferenciarse en cualquier célula de un organismo; tienen la capacidad de autorrenovación en el organismo (MEIRELLES *et al.*, 2006;)

Pueden ser clasificadas según su origen desde Células madre embrionarias hasta células madres adultas o (ASCs). Estas últimas han sido las más utilizadas en estudios clínicos por no presentar dilemas éticos para su empleo. Dentro de las ASCs, la preferencia es sobre las células tronco mesenquimales (MSCs) adiposas preferentemente utilizadas por su abundancia y en función a la facilidad de adquisición de las mismas (BIRBRAIR *et al.*, 2017; ANKRUM *et al.*, 2014).

Durante la preparación *in vitro* de células madres, la inestabilidad genética aumenta a lo largo de un cultivo, por lo que es importante analizar la composición genética en cada pasaje y verificar las posibles alteraciones genéticas que pueden haber adquirido estas células durante un cultivo celular constante. En el contexto de la medicina avanzada. la estabilidad cromosómica se traduce en seguridad genética en términos de aplicaciones clínicas en la medicina regenerativa (KIRKLAND *et al.*, 1992 ;PARCA *et al.*, 2018).

Varios estudios han indagado la seguridad de las células madres derivadas de tejido adiposo canino cAD-MSC para su posterior aplicación en la medicina avanzada; a través de la verificación de la estabilidad de sus cromosomas en cultivo (BORGONOVO *et al.*, 2014; LUO *et al.*, 2021).

No obstante estos no son métodos convencionales, requieren reactivos caros y un sistema sofisticados de microscopia para su observación; además de licencias pagadas de *softwares*, de personas con profundo conocimiento en el área, para interpretar y analizar el cariótipo. (BREEN *et al.*, 2008). además de que la mayoría de los estudios de visualización de cromosomas y montaje de cariogramas se emplean herramientas de visualización que requieren pago de licencia de uso de las mismas (KHAN , *et al.*, 2005).

Siendo así, existe la necesidad de elaborar protocolos de técnicas de observación de cromosomas; de fácil empleo; con elementos y herramientas de uso regular en el laboratorio de cultivos celular; por lo que surge la necesidad de aplicar métodos de fácil aplicación, reactivos mas baratos y de uso convencional en el laboratorio de genética, en los procesos de verificación de la seguridad de las células.

El presente trabajo tiene por objetivo padronizar los proceso involucrados en la en el preparo de cariótipos de células madre caninas, para la caracterización de los cromosomas a través de la microfografía de las células en metáfase, y generación de cariótipos automatizando las etapas de segmentación y caracterización cromosómica.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÉLULAS MADRES.

Las células madres (CM) son la base de todo organismo vivo pues estas construyen y mantienen nuestro cuerpo durante toda la vida en organismos multicelulares, estas células se mantienen en un estado indiferenciado y autorrenovable; donde mecanismos celulares y moleculares son los responsables de la regulación actúan como reservas de células para producir, mantener, reparar o incluso regenerar muchos tejidos (BIRBRAIR *et al.*, 2017; LAPLANE *et al.*, 2019; CLEVERS *et al.*, 2019).

El término célula madre aparece por primera vez en la literatura científica en 1868, en una publicación escrita por Ernst Haeckel, pero la evidencia científica que provó su existencia fue presentada en 1960 cuando Till y McCulloch describieron la existencia de precursores clonogénicos en la médula ósea (TILL *et al.*, 1961 ; MAYANI *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2019).

2.1.2 Clasificación de células madres:

1. Según su capacidad de diferenciación: pueden ser clasificadas como: totipotentes; pluripotentes y multipotentes (BORGONOVO *et al.*, 2014).

Las *Células Madres (CM) totipotentes* es capaces de dividirse y diferenciarse en células de todo el organismo; por ejemplo, el cigoto; que puede formar las tres capas germinales y anexos extraembrionarios como la placenta; las *CM pluripotentes* forman células de todas las capas germinales del blastocisto como endodermo; ectodermo y mesodermo; derivan de la masa celular interna de los embriones antes de la implantación (YAMANAKA *et al.*, 2020). Las *CM multipotentes* tienen un espectro de diferenciación más estrecho que el resto de Células Madres y se especializan en células discretas de linajes celulares específicos (WORKU *et al.*, 2021).

2. Según su origen pueden ser:

1) células madre embrionarias (ESC): derivadas de la capa interna del blastocisto; capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular; 2) células madre pluripotentes inducidas (iPSCs): generadas *in vitro*, a partir de células somáticas diferenciadas, a partir de células fácilmente accesibles; creadas *in*

in vitro; por el uso de factores de transcripción que permiten la sobre expresión de los genes (Oct-3/4, Sox2, KLF4 y c-Myc) que le confiere la capacidad de mantener propiedades de in diferenciación similares a las células madre embrionarias. 3) células madre adultas o específicas de tejido ASCs: tienen un potencial de diferenciación más restringido y permanecen en la mayoría de los tejidos animales adultos; tienen la capacidad de autorrenovación para la reparación de daño tisular (ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019; LAPLANE *et al.*, 2019).

2.2 CÉLULAS MADRES SOMÁTICAS ADULTAS (ASC).

Las células madre somáticas o adultas residen en prácticamente todos los tejidos posnatales y tejidos adultos, constituidas de una población muy heterogénea, incluyendo las paredes de los vasos, auxiliando en la reparación celular reemplazando las células que se pierden cada día, en respuesta señales tisulares o celulares, promoviendo procesos fisiológicos reparación y reposición celular dada a través de divisiones asimétricas que tiene lugar en un micro-ambientes especializado llamados nichos, donde la troncalidad de las células es dada mediante factores intrínseco de regulación (MEIRELLES *et al.*, 2006, POST *et al.*, 2019 ; WANG *et al.*, 2019).

2.3 LAS MSCS O CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES:

Las células madre mesenquimales pertenecen a los órganos y tejidos de origen mesodermico, que se encuentran presentes en las fracciones estromales de varios órganos, como el tejido adiposo, cordón umbilical y la pulpa dentaria, la médula ósea entre otros (MERUANE *et al.*, 2010; NOMBELA-ARRRIETA *et al.*, 2011; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019).

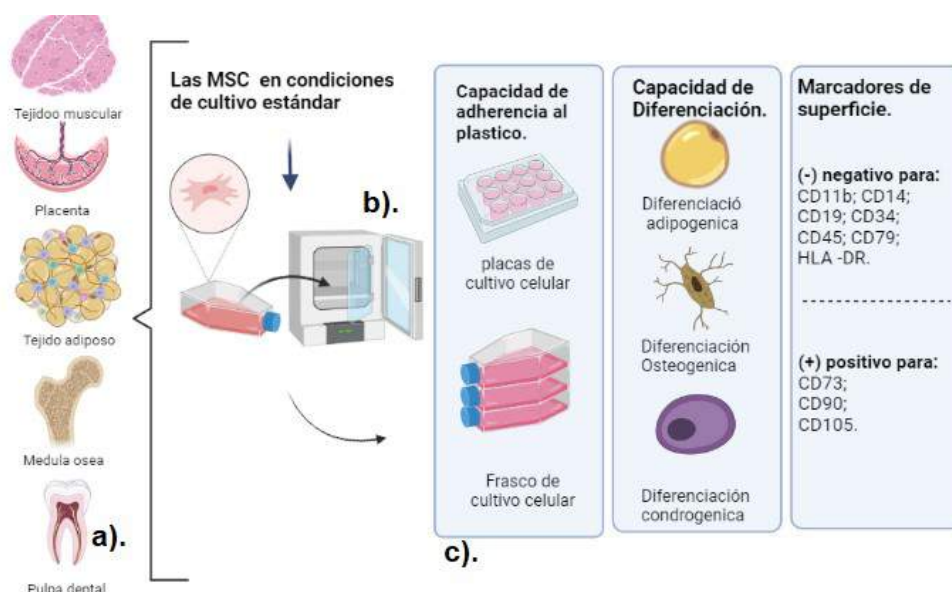
Las MSCs fueron identificadas por primera vez por FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974 y sus colabores en la Médula ósea (MO) de un ratón, descritas como células clonogénicas adherentes, formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-F); capaces de generar otros tejidos *in vitro* tales como tejido óseo; tejido adiposo; tejido cartilaginoso y de formar células reticulares; sugiriendo la existencia de células madre multipotentes no

exclusivamente hematopoyéticas cuya potencialidad quedo en evidencia cuando células multipotente humanas (hMSC) derivadas de médula ósea adulta también evidenciaron capacidad de diferenciarse en linajes de tejidos mesenquimales como adipócitos, condrocíticos, osteócitos, miocitos, entre otros en medios acondicionados, lo que le otorgo el termino MSCs de ahí en adelante (CAPLAN *et al.*, 1991; PITTENGER *et al.*, 1999; RICORDI *et al.*, 2013).

2.3.1 Características de MSCs.

De acuerdo con el Comité de Células Madre Mesenquimales y la Sociedad, Internacional tisular y de Terapia Celular ISCT del inglés (*International Society for Cellular Therapy*) existen criterios mínimos para definir las MSCs según descriptos por DOMINICI *et al.*, 2006 como resumida en la **ilustración 1**. estos corresponden a:

Ilustración 1: Criterios mínimos que caracterizan a las MSCs.



a) MSCs derivadas de tejidos adultos b) en condiciones de cultivo estándar c) deben reunir 3 requisitos mínimos; 1) adherencia de las MSC al plástico 2) capacidad de diferenciación en por lo menos adipócitos, condrocitos y osteócitos; 3) expresión de marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, la ausencia de expresión de marcadores CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y HLA DR de clase II. Fuente de imagen: autor ; imagen creada con biorrender.com.

2.4 APLICACIONES DE LAS MSCs EN LA TERAPIA AVANZADA.

Las aplicaciones de las MSCs en la terapia regenerativa o medicina avanzada, son dadas en base a su potencial terapéutico deriva desde su capacidad para a) diferenciarse en varios linajes celulares b) secreción de factores solubles de supervivencia y proliferación celular denominados factores de crecimiento; c) vesículas extra-celulares; conteniendo citoquinas; que modular la respuesta inmunitaria que la expresión de marcadores de membrana migrando al sitio exacto de la lesión. Por lo que posee propiedades inmunomoduladoras, en función a la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) I; e inmunosupresoras principalmente por la ausencia del MHC de clase II; los trasplantes presentan bajo un rechazo inmunológico (WILLIAM *et al.*, 2000 ; WEI *et al.*, 2013; JACOBS *et al.*, 2013; ANKRUM *et al.*, 2014 ; GHARBIA *et al.*, 2021).

Por lo que su empleo en tratamientos de numerosas enfermedades ha venido en aumento en los últimos años, para trasplante autólogo, como en el uso medicamentoso en el caso de trasplante alogénico, en las enfermedades degenerativas (WEI *et al.*, 2013; VAN PHAM *et al.*, 2016; GUGLIANDOLO *et al.*, 2020).

En perspectivas futuras se prevee su uso en aplicación es el área de la ingeniería de tejidos, en combinación con *Scaffolds* o andamios asociadas a bioimpresoras 3D y el uso de biotintas adaptadas para cada tejido, con el intuito de restaurar o sustitutos tejidos lesionados como ;vasos sanguíneos, tejido óseos, cartílago, válvulas cardíacas, hígado, músculo, tejido nervioso entre otros, y se espera reconstituir hasta órganos completos en el futuro (SALTZMAN *et al.*, 2004; GOMILLION *et al.*, 2006; TASNIM *et al.*, 2018).

No obstante, para que las MSCs puedan ser utilizadas con fines terapéuticos deben ser abundantes, aislables mediante procesamientos mínimamente invasivos, diferenciables en múltiples linajes celulares de manera regulables y el proceso reproductibles. En este sentido, las más utilizadas son las MSCs de la médula ósea y la fracción vascular del estroma

del tejido adiposo en donde en este ultimo satisface mayormente con estos requisitos para su aplicación clínicas (GIMBLE *et al.*, 2003; GIMBLE *et al.*, 2013; PITTENGER *et al.*, 2019).

2.5 VENTAJAS DE USO DE CÉLULAS MADRE ADIPOSAS ADSCs EN LA MEDICINA REGENERATIVA.

Las ADSCs (*del inglés adipogenic Stem cell*) están constituidas de una población heterogénea de células, compacta y organizada, considerada un depósito de células madres que se encuentran entre (SVF) fracciones vasculares del estroma, y representan una alternativa al uso de al uso de MSCs de la médula ósea en la terapia celular, son abundantes, y pueden ser aisladas de una forma menos invasiva, por lo que su obtención es relativamente fácil, además de su facilidad de propagación *in vitro* lo que contribuye a su aplicación, y presentan implicaciones éticas más flexibles con relación manipulación y su aplicación (ZUL *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2014; CHU *et al.*, 2019; MAZINI *et al.*, 2019).

El procedimiento de extracción de tejido adiposo generalmente es realizado para fines estéticos, en los humanos y dada su capacidad de diferenciación en por lo menos adipócitos, condrocitos y osteócitos en condiciones de cultivo estándar y su potencialidad de regeneración de tejidos para el tratamiento de defectos de cartílago, hueso y tejido adiposo; son muy prometedoras en aplicaciones en reconstrucción plástica, en el área de la ortopédica y la medicina estética de reconstrucción facial; por lo que las técnicas para su aplicación clínica han sido mejoradas en los últimos tiempos (DOMINICI *et al.*, 2006; CLEVINGER *et al.*, 2016; VOLAREVIC *et al.*, 2018).

En la medicina regenerativa humana los procedimientos replican fielmente las condiciones de ensayos clínicos en animales, en patologías que se desenvuelven tanto en humanos como en animales, como son enfermedades musculoesqueléticas en perros y caballos, la degeneración del disco intervertebral además de que los métodos de evaluación son muy similares a los que se utilizan en la medicina humana; por lo que es viable su

aplicación tanto en medicina regenerativa humana como animal (STEFFEN *et al.*, 2019; MOCCHI *et al.*, 2020).

Actualmente, el uso de las ASC se consideran una fuente segura y conveniente para su uso en la medicina regenerativa; por lo que es plausible respaldar la seguridad y eficiencia de las cAD-MSc para modelos terapéuticos regenerativos (TONNARD *et al.*, 2013; TREMOLADA *et al.*, 2016 ; SI *et al.*, 2019; JEYARAMAN *et al.*, 2021).

Aplicaciones Futuras en enfermedades musculoesqueleticas

En vista de la necesidad de algunos tratamientos a enfermedades degenerativas caninas ilustración 2 parte a) como el caso de enfermedad del disco intervertebral EIV Hernia discal, que son condiciones comunes de la médula espinal canina en las razas condrodistróficas; ilustración 2 parte b) cuyas rehabilitaciones aún se basan en diferentes modalidades terapéuticas como la utilización de ejercicios de frío, calor, luz, agua, electricidad y movilidad (LONDOÑO *et al.*, 2021).

Ilustración 2: alternativa terapéuticas para razas condrodistróficas.



a) canino de raza condrodistrófica: Cabeza baja y extremidad anterior flexionada, debido al dolor por extrusión del disco cervical b) Proceso de una rehabilitación Veterinaria por electroterapia. Imagen descriptas por LONDOÑO *et al.*, 2021.

En un estudio clínico para la osteoartritis canina utilizando células tronco adultas alogénicas; quedo evidenciada la reducción del dolor, acompañada del aumento de movilidad (SHAH *et al.*, 2018); ademas de la eficiencia de uso de células madres mesenquimales derivadas de adipócitos (AD-MSCs) en la terapias de afecciones musculoesqueleticas en pacientes con secuelas neurológicas como resultado de transplantes alógenicos con como se observa en ilustración 3.

Ilustración 3: Aplicación terapéutica de ASCs alogénicas.

Células madre mesenquimales alogénicas en el tratamiento de las secuelas neurológicas de cinomose (moquillo)



Antes de la aplicación de CTM-CAT, los animales presentaban un cuadro neurológico característico de mioclonias severas, paraplejia de los miembros pélvicos, baja coordinación de los miembros pélvicos y respuesta propioceptiva reducida, (A,C).

90 días después del inicio Después del tratamiento, el animal recuperó sus movimientos, desplazándose con normalidad (B,D).

Pacientes caninos sometidos a tratamiento con ASC alogénico en la medicina regenerativa veterinaria. Imagen de SANTOS *et al.*, 2019.

2.6 IMPLICACIONES Y ASPECTOS NECESARIOS PARA LA APLICACIÓN DE LAS ADSC EN LA TERAPIA AVANZADA.

Esta comprobado que tanto el cultivo y la expansión continua como la criopreservación de células afecta la funcionalidad de las mismas a largo plazo y el riesgo de tumorigenicidad es plausible para cualquier célula cultivada y expandida *in vitro* constantemente, pudiendo ocasionar el surgimiento de alteraciones genéticas, variación del número de copias y mutaciones de un solo nucleótido; y el mecanismo por el cual las MSCs se transforman en células malignas se asocian mayoritariamente a anomalías cromosómicas acumuladas con altos grados de actividad de la telomerasa es recomendable verificar la estabilidad genética de las mismas (MIURA *et al.*, 2006; DUAN *et al.*, 2018; YAMAA *et al.*, 2020 ;DI BELLA *et al.*, 2021).

2.6.1 Normativas regulatorias Internacionales de uso de células en la terapia y la investigación.

La agencia reguladora de medicamentos de terapia avanzada de la Unión Europea (EMA) en Londres, establece que las ASC según su Reglamento (CE) n.º 1394/2007 (del Reglamento sobre medicamentos de terapia avanzada (ATMP)); son consideradas medicamentos; aunque su uso se consideran una fuente segura para medicina regenerativa; las autoridades reguladoras nacionales e Internacionales; exigen el control de la calidad mediante estudios de seguridad que confirmen que las células no son tumorigenicas; además de otros criterios relacionadas con la manipulación físicas de los productos de ingeniería tisular; por las manipulaciones sustanciales como el uso de colagenasa; así como el cultivo y expansión *in vitro* de las ASC o como el de la esterilidad del material genético de las mismas (KIRKLAND *et al.*, 1992; GIMBLE *et al.*, 2013; RAPOSIO *et al.*, 2017; PARCA *et al.*, 2018; SI *et al.*, 2019).

Regulación de uso de células con fines de uso investigación y uso clínico en Brasil.

En Brasil; la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) estableció los requisitos mínimos que rigen el licenciamiento y operación de células por parte de los Centros de Tecnología Celular (CTC) a través de su decreto por Resolución del Consejo Colegiado (RDC09/2011); solicita la implementación de un control genético como criterio de autorización para el uso de estas células, con fines de investigación clínica y terapéutica (PARCA *et al.*, 2018).

La seguridad de la terapia basada MSCs esta estrechamente relacionada a sus implicaciones a largo plazo en condiciones de criopreservación; que eventualmente pueden llegar a ocasionar, la diferenciación no deseada de las MSC trasplantadas; asociada a una capacidad de suprimir la respuesta inmune anti tumoral a factores oncogenicos, capacidad de angiogénesis promueven el crecimiento tumoral y la metástasis (VOLAREVIC *et al.*, 2018).

Por lo que verificar la integridad genómica a través de pruebas de cariotipo; para corroborar la estabilidad genética de las MSC además de estandarizar los métodos de la manipulación de ADSC antes de su aplicación clínica, es un procedimiento necesario y determinante la efectividad de la terapia (OTHMANI, *et al* 2019; ZAKRZEWSKI *et al.*, 2019 ;NERI *et al.*, 2019).

2.7 ASPECTOS CITOGENÉTICOS.

La citogenética comprende el estudio del número y la estructura de los cromosomas, cuyas estructuras empaquetadas contienen la información de la célula en forma de DNA, los cuales son estudiadas a través del cariotipo, incluyendo anomalías adquiridos, a través de cambios estructurales, y numéricos en los cromosomas inducidos por agentes ambientales, químicos, entre otros (MONTAZERINEZHAD *et al.*, 2020; JANÉ *et al.*, 2021).

El desarrollo de la citogenética ha venido en crecimiento desde la tinción cromosómica clásica de Giemsa; hasta nuestros días; en que las técnicas mejoradas de la citogenética permitieron comprender las bases cromosómicas varias patologías genéticas, tanto humanas como animales (MARTÍNEZ *et al.*, 2010 ; BALAJEE *et al.*, 2018).

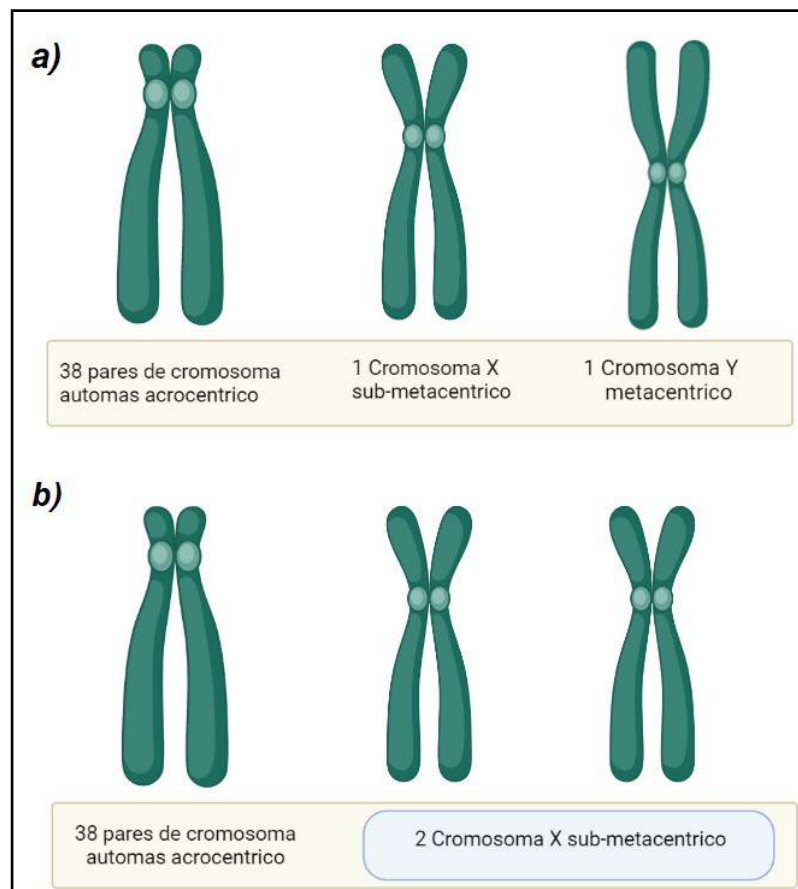
Las investigaciones sobre el genoma canino fueron motivadas en primer lugar por ser una especie que tiene propensión a desarrollar patologías con base genética que pueden ser modelo de estudio en la especie humanas; como pueden ser cardiopatías, cáncer, enfermedades autoinmunes, diabetes entre otros; además de ser un animal adaptado al núcleo familiar del ser humano, por lo que varios estudios respaldan la validez del perro como modelo de estudio, para distintas patologías relacionadas a los humanos (THOMAS *et al.*, 2003; REIMANN-BERG *et al.*, 2012; RIMBAUL *et al.*, 2012; ETTLIN *et al.*, 2017; WALLIS *et al.*, 2021).

En el canino doméstico (*Canis lupus familiaris*) normalmente se observan en cada núcleo celular normalmente 38 pares de cromosomas autosómicos acrocéntricos; 1 par de cromosomas sexuales; con un cromosoma X submetacéntrico y un cromosoma Y metacéntrico en los

machos; ya en la hembras se observan 2 cromosomas x sub- metacéntricos; cuyas morfologías pueden observarse en la Ilustración 4 por lo que un cariotipo canino consta de $2n=78$ de cromosomas, y pertenecen al grupo de cromosomas supernumerarios o cromosomas B al grupo al cual también se encuentran algunas plantas y algunos animales (OSTRANDER *et al.*, 2005; BREEN *et al.*, 2008; LLAMBÍ DELLACASA *et al.*, 2018; AHMAD *et al.*, 2019).

La morfología de los cromosomas del cariotipo del *Canis lupus familiaris* esta constituido de:

Ilustración 4: Constitución morfológica de los cromosomas del *Canis lupus familiaris*.



a) morfología de cromosomas de *Canis lupus familiaris* macho; b) morfología de cromosomas de *Canis lupus familiaris* hembra. Fuente: autor; imagen creada con biorrender.com.

2.8 CITOGENÉTICA EN EL DIAGNOSTICO CLÍNICO.

A pesar del avance de la biología molecular y de la citogenética molecular, la citogenética clásica o convencional sigue siendo una valiosa herramienta de diagnóstico para una gran cantidad de pacientes con múltiples dismorfías y malformaciones genéticas, el uso de las técnicas de visualización de alta resolución pueden dañar los cromosomas, por lo tanto el análisis cromosómico a través de la citogenética convencional que se utilizan en los procedimientos de rutina resulta ser un procedimiento clave tanto en el diagnóstico de trastornos genéticos; como en la evaluación rutinaria de cultura de células para aplicaciones en la terapia avanzada (BREEN *et al.*, 2008; TORRES E *et al.*, 2018; VOZDOVA *et al.*, 2019).

2.8.1 CARIOTIPO CONVENCIONAL.

La tinción cromosómica con el colorante Giemsa es una técnica este ha sido el método estándar en la elaboración del caritipo, para detectar las anomalías genéticas de tipo estructural y numérica se realiza el cariotipo; ordenando los cromosomas, después de su extracción; permitiendo identificar aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales; visibles en el microscopio óptico; cuya inestabilidad cromosómica, reordenamientos translocaciones, deleciones y aneuploidías conducen a trastornos genéticos; por lo tanto el análisis cromosómico resulta ser un procedimiento clave en el diagnóstico de trastornos genéticos; como en la evaluación rutinaria de cultura de células para aplicaciones en la terapia avanzada (CASPERSSON *et al.*, 1970; TORRES E *et al.*, 2018; UNE, *et al.*, 2006; STETTEN *et al.*, 2005; SÖHNER *et al.*, 2021).

2.9 PROCESAMIENTO SEMI - AUTOMATIZADO DE CARIÓTIPOS:

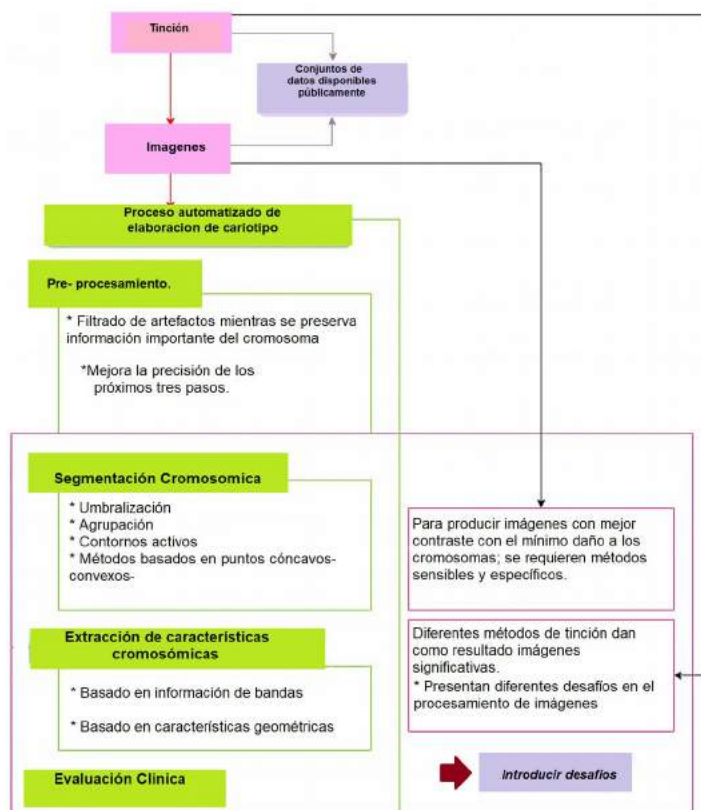
Para detectar las anomalías genéticas de tipo estructural y numérica se realiza el cariotipo; ordenando los cromosomas, después de su extracción; no obstante la citogenética demanda la implementación de un sistema de observación y clasificación cromosómica automatizada que pueda excluir en el procesos la dependencia de la experiencia; la ineficiencia del tiempo en la elaboración del cariotipo, y errores de fatiga que a su vez

debido a que es un proceso repetitivo consecuentemente generan variabilidad en el observador; especialmente en las etapas de segmentación y extracción de características cromosómicas; por lo que la automatización de estas dos ultimas etapas buscan optimiza tanto el procedimiento como el diagnóstico genético ya que abordan las limitaciones de los procesos manuales en el cariotipaje, ademas de que la mayoría de los *softwares* comerciales son costosas (KHAN *et al.*, 2005; KURTZ *et al.*, 2015).

2.9.1 Desafíos de la segmentación y extracción de características de automatizada.

El procesamiento automatizado consta de los procedimientos descrito en la ilustración 5; en donde los pasos correspondientes a la segmentación y la extracción de las características cromosómicas; son los procedimientos mas desafiantes en el procesamiento automatizado de cariotipo relativamente laboriosa de ejecutar; en especial cuando los cromosomas se solapan o se doblan y o se interponen (KURTZ *et al.*, 2015; ARORA *et al.*, 2016).

Ilustración 5: fujograma del procedimiento de un cariotipaje automatizado.



Figuran ilustrativa del procedimiento de un cariotipaje automatizado adaptada en español de BALAGALLA *et al.*, 2022.

El procesamiento automatizado de segmentación cromosómica consiste en extraer y generar una nueva imagen actualmente los algoritmos de segmentación cromosómica presentan varias categorías, como la umbralización, contornos activos métodos basados en puntos, entre otros; por su parte la extracción de características o informaciones cromosómicas se basan en 2 categorías principales; como patrones de bandas y la geometría (POLETTI *et al.*, 2012; JANÉ *et al.*, 2021, BALAGALLA *et al.*, 2022).

3. JUSTIFICATIVA.

La medicina regenerativa y la ingeniería tisular tienen como objetivo la reparación tisular y la regenerar tejidos combinando con factores de crecimiento, biomateriales y células troncales las células madre de tejidos adultos más utilizados son los de la medula ósea, y la fracción vascular del estroma del tejido adiposo (BUTLER *et al.*, 2000 ; PITTENGER *et al.*, 2019).

Los procedimientos replican las condiciones de ensayos clínicos, en patologías que se desenvuelven tanto en humanos como en animales; y los métodos de evaluación celular en la veterinaria son muy similares a los que se utilizan en la medicina humana (STEFFEN *et al.*,2019).

No obstante sus posibles implicaciones a largo plazo aún están en debate por lo que los órganos que regulan el uso de las MSCs, tanto en la investigación como en clínica, son claras y puntuales en cuanto a las normativas sobre los criterios mínimos establecidos para su manipulación y aplicación; ya sea para su expansión como para su crioconservación (PARCA *et al.*, 2018; NIKITINA *et al.*, 2018)

Su aplicación *in vivo* requiere un control de calidad y seguridad previo, pues estas células pueden dar lugar a una acumulación de alteraciones genéticas; y presentar inestabilidad genética, es por eso que la caracterización cromosómica de cAD-MSc proporcionaría un valioso aporte para las pruebas rutinarias de aberraciones *in vitro* tanto en el avance de la ingeniería de tejidos como en la medicina regenerativas (KIRKLAND *et al.*, 1992; BORGONOVO *et al.*, 2014; NIKITINA *et al.*, 2018; OTHMANI *et al.*, 2019).

Por lo mismo el presente trabajo tubo por objetivo padronizar los proceso relacionados a la padonización de procedimientos para la generación de cariotipos de células en cultivo; para la caracterización de los cromosomas; a través de la tinción de las células cultivadas; obtención de microfotografía con ajuste de aumentos, segmentación y posterior análisis de los datos morfométricos extraídos de los cromosomas; para verificar la estabilidad numérica y estructural empleando como herramienta un *software* de código libre.

4. OBJETIVOS.

4.1 OBJETIVO GENERAL.

- Padronizar un protocolo de caracterización cromosómica células madres mesenquimales derivadas de tejido adiposo canino cAD-MSC *in vitro*

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Adquirir microfotografías de los cromosomas metafásicos de cAD-MSC a través de microscopía óptica.
- Procesar las imágenes obtenidas y montar el cariotipo de las cAD-MSC mediante el *software* ImageJ y sus distintos complementos
- Verificar la integridad genética de la estructura de los cromosomas tanto numérica como estructural de las cAD-MSC.
- Comparar la eficiencia de los procedimientos de segmentación extracción de las características cromosómicas de las cromosomas de las células madres caninas mediante la aplicación del procedimiento establecido con imágenes de cromosomas de células humanas de linfocito.

5. MATERIALES Y MÉTODO.

La metodología consistió en la adquisición de células madres derivadas de tejido adiposas, cultivo celular, tratamiento previo para preparación de cromosomas, tinción con Giemsa, adquisición de imágenes; procesamiento de imagen mediante ImageJ.

5.1 ASPECTOS ÉTICOS RELACIONADOS AL USO DEL MATERIAL BIOLÓGICO E IMÁGENES PARA FINES DE INVESTIGACIÓN.

Para caracterizar los cromosomas se utilizaron imágenes de cromosomas de cAD-MSK derivadas de tejido adiposo y una imagen de cromosomas de linfocitos humanos de sangre periférico, como método de control de eficiencia del procedimiento de caracterización, de linfocitos en metáfase, cuya imagen fue Cortesía de Maria Antonella Silva Lezcano autora de la micro fotografía una imagen obtenida como alumna graduanda en el año 2019 en el Laboratorio de Biotecnología aplicada a la Salud de la UNILA.

5.1.2 ADQUISICIÓN DE MUESTRA DE TEJIDO ADIPOSO CANINO.

La adquisición y el proceso extracción mecánica de la muestra de tejido adiposo subcutáneo de aproximadamente 5,0 gramos fueron conducidas en responsabilidad de la clínica Supercell medicina veterinaria Ltda. y realizada con la autorización y permiso de uso del materia biológico para fines de investigación; concedida a través del tutor de canino.

La muestra biológica fue proveniente de una paciente canino en edad de castración extraídas a través de una intervención quirúrgica resultados del proceso de castración que fueron cedidas por Supercell Medicina Regenerativa Veterinaria Ltda, acondicionado y guardado en un recipiente de tubo colector estéril conteniendo medio de cultivo completo; el cual fue almacenado y transportado a 4°Celsius hasta las instalaciones de la Universidad Federal da Integração Latino Americana en el laboratorio de Biotecnología Aplicada a la Salud G-004, el mismo día.

5.2 AISLAMIENTO ENZIMÁTICO DE LAS CÉLULAS MADRE ADIPOSAS.

Todos los experimentos fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología aplicada a la Salud de la Universidade Federal da Integração Latino-Americana- UNILA.

En una cabina de seguridad biológica de grado II; en las instalaciones del laboratorio de cultivo de células de la UNILA; el material biológico fue retirado de los tubos; la masa fue pesada y adicionada en placas Petri; para realizar un cultivo primario a partir de fragmentos realizados en el tejido Adiposo con el auxilio de un bisturi hasta tomar una consistencia pastosa; luego la muestra se transfirió en un tubo de 50 mL, se le adiciono 5 mL de colagenasa I 2000 U/mL y se incubo a 37°C por 1 hora; agitando y revolviendo la solución cada 20 minutos; posterior a ello se inactiva la colagenasa I; adicionando 20 mL de medio de cultivo completo DMEM; y se transfiere en tubos Falcom de 15 mL; se centrifuga por 200xg por 10 minutos; el sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue re-suspendido en 10 mL de medio completo DMEM; fue centrifugado nuevamente por 10 minutos hasta lograr separar del material graso en dos fases; se descarta el sobrenadante; se re-suspende nuevamente el *pellet* en 1 mL de medio completo DMEM (ALIVE *et al.*, 2021).

5.3 EXPANSIÓN CELULAR DE cAD-MSCs.

El medio DMEM conteniendo células fueron adicionadas en una garrafa de cultivo de 75 cm² (BIOFIL, China) con 10% de suero fetal bovino FBS y 1% de penicilina y estreptomina; cultivada en condición estándar de 37°C con 5% de CO₂, 5 días después del cultivo fueron verificadas la existencia de colonias de células adherentes, a través de un microscopio invertido Nikon eclipse Ti, las células fueron tratadas con tripsina-EDTA (Vitrocell, Brasil); luego la tripsina es inactivada mediante la adición de medio completo DMEM se centrifuga a 100 rpm por durante 10 minutos; el medio fue descartado y las células desagregadas restantes en el *pellet*, se adiciona 10 mL de medio DMEM completo (VIEIRA *et al.*, 2010; BORGONOVO *et al.*, 2014; MORAIS *et al.*, 2015).

5.4 CONTEO Y CULTIVO DE cAD-MSCs.

Se realiza el conteo de las células con el hemocitómetro mediante la retirada de 10 μL del medio con el material para el conteo de las células, se adiciono 10 μL de azul de Tripam sobre un hemocitómetro y se constató una población celular de aproximadamente 1.6×10^6 células/ mL se transfieren 2,0 mL de la alicota de muestra con medio en 5 frasco cultivo de 25mm; 5 días después se vuelve a verificar la confluencia sea mayor a 70% como se observa en la ilustración 6 y se procede a la preparación de las células para realización el ensayo citogenético.

Ilustración 6: Imagen de la Confluencia del cultivo celular 5 días después del cultivo.

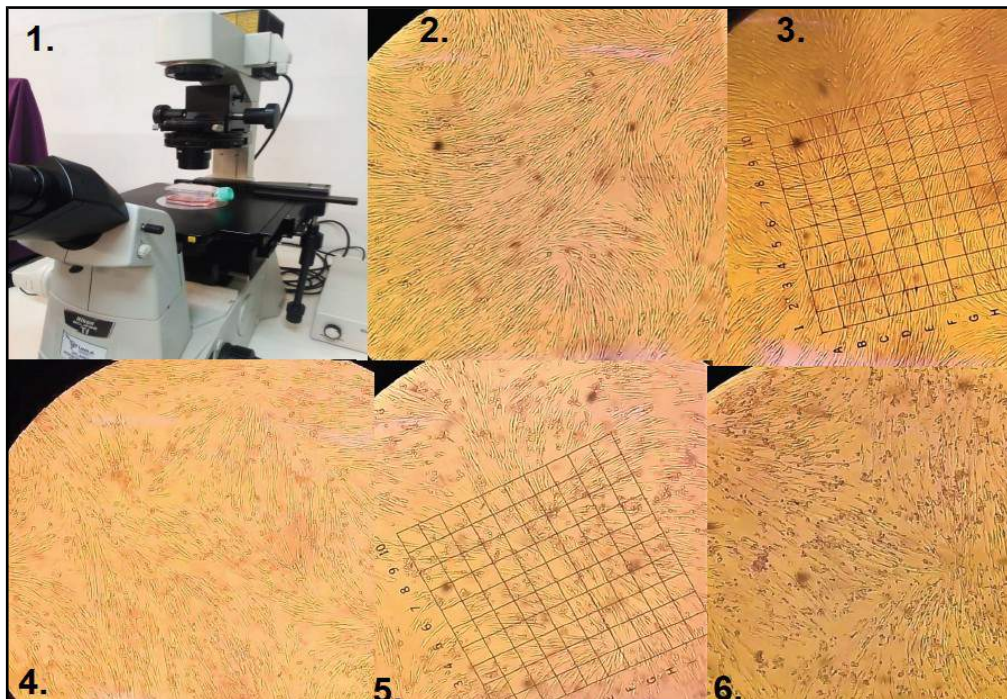


Imagen 1: verificación del crecimiento de las cAD-MSC, 5 días después a través de un microscopio invertido Nikon eclipse *Ti* ; Imagen 2,3,4,5 y 6 observación del crecimiento de las cAD-MSC en los frascos de cultivo celular. Fuente: autor.

5.5 TRATAMIENTO PREPARATORIO CELULAR PREVIO AL MONTAJE DE CARIÓTIPO.

5.5.1 TRATAMIENTO CON SOLUCIÓN COLCHICÍNA.

Una vez las células en cultivo alcanzan una confluencia del 70% se adicionan 100 μL de solución pro-metafásica colchicína en los 5 frascos de cultivos, como demuestra la **Tabla 1** luego se incuba en la estufa a 37°C con

Co₂ al 5%, como establece las condiciones de cultivo padrón por mínimo 30 minutos (HOWE *et al.*, 2014).

Tabla de tratamiento de cultivo cAD-MSC de con colchicina.

Tratamiento con solución colchicina	Tiempo de exposición
T1 tratamiento 30 minutos de incubación.	(tiempo mínimo).
T2 tratamiento 40 minutos de incubación.	10 minutos de exposición.
T3 tratamiento 50 minutos de incubación.	20 minutos de exposición.
T4 tratamiento 60 minutos de incubación.	+ 30 minutos de exposición.
T5 tratamiento 70 minutos de incubación.	+ 40 minutos de exposición.

Tabla 1: Tiempos de exposición de la solución colchicina para optimizar la formación de los cromosomas mitóticos.

5.5.2 DESAGREGACIÓN ENZIMÁTICA.

Posteriormente se desagregan las células de cAD-MSCs que crecen adheridas al frasco de cultivo celular de plástico, mediante un tratamiento enzimático como figura en la Ilustración 7.

Por lo que se retiran los frascos de cultivo de la estufa con un intervalo de 10 minuto, cada uno de los cultivos DEMEN de cada frasco son transferido en tubos Falcoms de 15 mL ilustración 7 a) las células adheridas al frasco de cultivo son previamente lavadas agregando 1.0 ml de tampón PBS; se agita y se descarto; se adicionando 1.0 mL de tripsina-EDTA por 2 minutos, seguidamente se devolven los medios DEMEN de los tubos Falcoms de 15 mL en el frasco de cultivo para inactivar la acción de la enzima tripsina-EDTA; y se transfirió Ilustración 7b) nuevamente en los respectivos tubos Falcoms de 15 mL enumerados; Ilustración 7c) se balancea los tubos Ilustración 7d) y se centrifuga a 200 xg durante 10 minutos y se retira el sobrenadante.

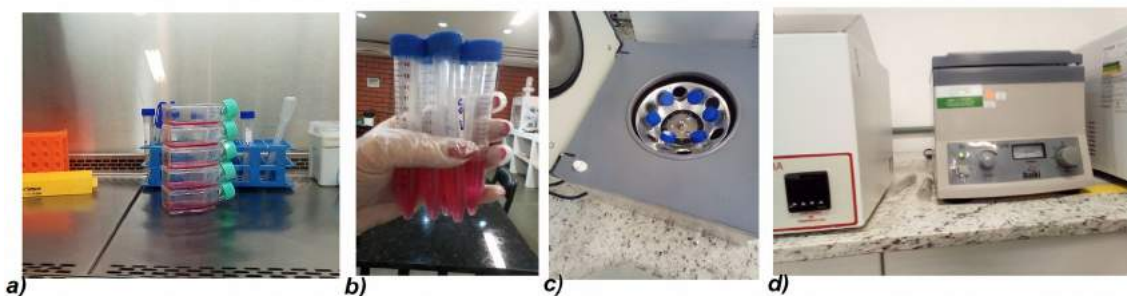


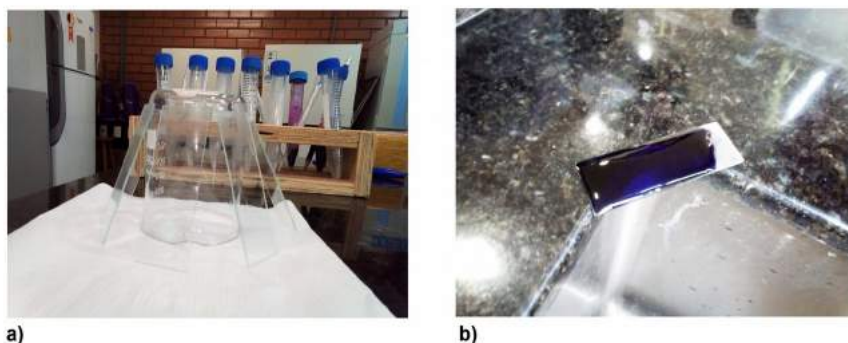
Ilustración 7: Imágenes correspondientes al procedimientos de tripsinización y centrifugación.

5.6 PREPARACIÓN DE LAS cAD-MSCs Y TINCIÓN CROMOSÓMICA.

Se dejó un aproximadamente 0,5 mL de muestra en el *pellet* de los tubos Falcons de 15 el cual fue re-suspendido utilizando una pipeta estéril diferente para cada tubo, las células de las 5 unidades tubos de 15 mL conteniendo las células de nuestro interés en el *pellet*, fueron tratados y preparados para su posterior tinción a través de una serie de procedimientos preparatorios de las células y los cromosomas:

Con el auxilio de un porta tubos de madera se adicionó lentamente 5,0 mL de solución hipotónica KCl 0.075 M en todos los tubos conteniendo las cAD-MSCs en el *pellet* y se incubó a 37 °C por 10 min; luego se centrifuga a 200 rpm durante 5 minutos, se retira el sobrenadante y se resuspende el precipitado; y se adicionaron 2 veces 5 mL la solución de fijadora Carney constituida de 3:1 metanol- ácido acético glacial.

Ilustración 8: Lavado, secado de laminas y tinción con Giemsa.



a) Proceso de secado de laminas previo al goteamiento de las células sobre laminas b) tinción de las laminas con colorante Giemsa al 10%.

Para la tinción de los cromosomas sobre unas Ilustración 8 a) laminas previamente lavadas con detergente y alcohol 98% se dejan caer gotas de células sobre la superficie de las laminas; de tal modo que las células sometidas previamente a solución hipotónica; se rompen dejando expuesto el contenido celular sobre las laminas; se deja secar por 15 minutos; posteriormente se tñieron con colorante Giemsa durante 10 minutos Ilustración 8 b) y se lava con agua corriente.

5.7 MICROSCOPIA:

La Adquisición de imágenes se realizaron en el laboratorio de microscopia avanzada del laboratorio de Biotecnología aplicada a la salud G-004 a través de una serie de fotografías de imágenes; capturadas con un microscopio óptico ZEISS primotech utilizando el software Matscope donde se capturaron imágenes de células inducidas a metáfase las imágenes fueron guardadas en un dispositivo CD y transferidos en un computador portátil para su posterior procesamiento.



Ilustración 9: microscopio óptico utilizado para la adquisición de imágenes.

5.8 Descarga e Instalación del Software ImageJ versión Fiji

ImageJ es un software multiplataformas, gratuito, de código abierto, adaptada al lenguaje de programación Java por Wayne Rasband en 1997 de la versión nativa del software NHI-Image creada en 1987 por el mismo Rasband para el NIH (*National Institute of Mental Health*); cuyo objetivo fue facilitar el uso de la plataforma a cualquier persona; y procesar cualquier tipo de imágenes (SCHNEIDER *et al.*, 2012; VOSATKA *et al.*, 2022).

El software se descarga del sitio <https://imagej.net/> en la opción Fiji; se selecciona el paquete comprimido del archivo adecuado al sistema operativo del nuestro procesador informático en uso, una vez descargada el paquete de archivo comprimido; procedimiento resumido en la Ilustración 10.

5.9 PROCESAMIENTO AUTOMATIZADOS DE ELABORACIÓN DE CARIOTIPO.

Siguiendo el esquema descrito por BALAGALLA *et al.*, 2022, segmentación y extracción de características cromosómicas; el flujo metodológico se aplica el siguiente método de mediante ImageJ y los complementos elegidos.

Primeramente se realiza el procesamiento de imágenes del linfocito humano y luego se realiza el mismo procedimiento con las imágenes de células caninas.

1. PRE-PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.

Con relación a la técnica de pre-procesamiento; se seleccionan las imágenes de cromosomas en metafase en que las imágenes de entrada analizables son sometidas a filtros, previas a su procesamiento (REMYA *et al.*, 2019).

Los procedimientos previamente a la segmentación incluye:

1.) Guardado de las imágenes en formato PNG o JPG;2.) Duplicados previo de las imágenes para evitar pérdida de la imagen original; 3.) Aumento y recorte de las imágenes específicas para delimitar el área a segmentar.;4.) Conversión en una escala de gris; este procedimiento es relativo a procedimiento posterior y según requiera el complemento de segmentación a ser aplicado.

2. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.

La etapa de procesamiento de imágenes para el montaje de cariotipo consistió en 2 pasos: la Segmentación Cromosómica y la Extracción de características cromosómicas.

1.Segmentación Cromosómica:

Se aplicó el método de segmentación denominada umbralización basada en las diferencias de intensidad vía contraste de colores, la umbralización cromosómicas permite delimitar regiones de interés, definir los bordes de la célula entre los cromosomas (LORMAND *et al.*, 2018; BALAGALLA *et al.*, 2022).

2.Extracción de características cromosómicas:

Para caracterizar las imágenes preparadas y segmentadas se utilizo los complementos del software ImageJ versión Fiji, basado en informaciones geométricas; los cuales fueron descargados y adicionados en la barra de complementos de la carpeta de Fiji. Los complementos corresponden a:

2.1 ChromosomeJ:

Obtenida del sitio <http://bigwww.epfl.ch/>, este complemento realiza corte entre los cromosomas y los ordena en orden descendente; por lo que nos permite verificar el numero de los cromosomas; este complemento requiere una previa conversión en la escala de grises; y la adición previa de los números de cromosoma que se esperan encontrar (PO *et al.*, 2013, UHLMANN *et al.*, 2016).

2.2 Levan:

Obtenida a traves del sitio <https://imagej.nih.gov/> de la opción de complementos, este *plugin* describe y clasifica morfológicamente los cromosomas basada en un algoritmo que los identifica y clasifica a partir de la relación de los brazos cortos y largos de los cromosomas; para lo que se requiere un trazo lineal longitudinal a lo largo del cromosomas (SAKAMOTO *et al.*, 2009).

IMÁGENES CORRESPONDIENTES AL PROCESAMIENTO DE LA IMAGEN DE LOS CROMOSOMAS DE LINFOCITO HUMANO.

Etapa de pre- procesamiento:

Como primer procedimiento a) se aumenta y se cambia de orientación la imagen original b) se pixela la imagen para crear una c) mejor definición de las mismas; y los solapamientos de los cromosomas queden mas evidentes.

Ilustración 10: pre- procesamineto de imagen de cromosomas de linfocito humanos.

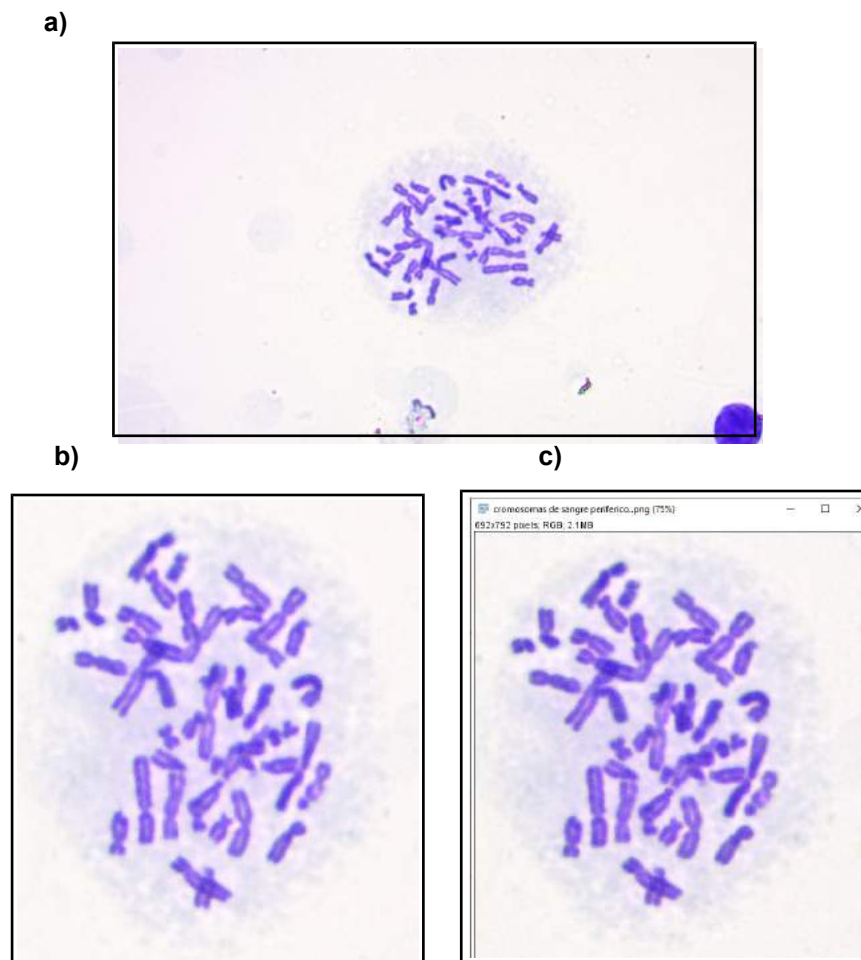


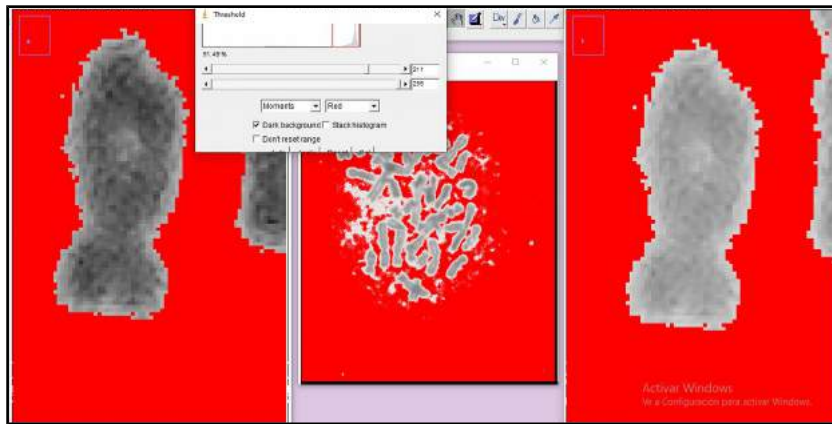
Imagen a) correspondiente a la imagen original cedida por la autora b) imagen a recortada digitalmente y c) Imágenes b de cromosomas de linfocito humanos pixelada de mediante ImageJ.

Etapa de segmentación mediante umbralización.

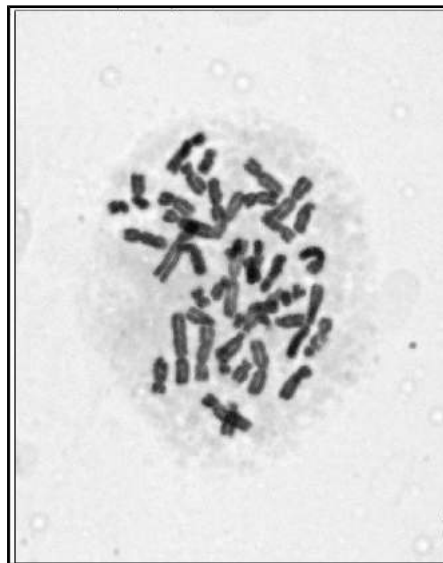
Se somete a la imagen de 16 bits a diferentes tipos de umbralizaciones de las opciones que el panel de opciones de Imagen J, con el objetivo de seleccionar la opción que mas permita diferenciar los cromosomas del resto de la estructura celular.

Ilustración 11: selección de imagen previa al método de segmentación.

a)

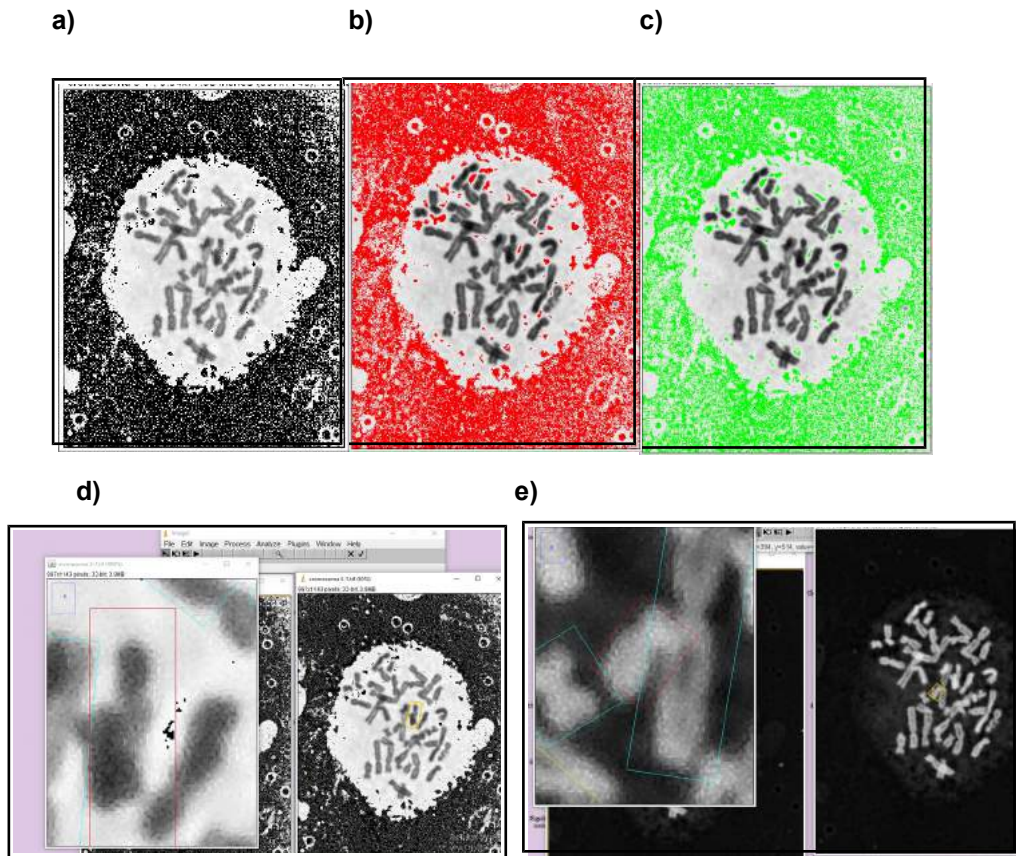


b)



a) Se realiza un duplicado de la imagen y se someter a diferentes escalas de grises imagen superior a la derecha 8 bits y 16 bits imagen superior a la izquierda b) En función a la nitidez dada se optó por aplicar 16 bits.

Ilustración 12: Selección del método de segmentación.

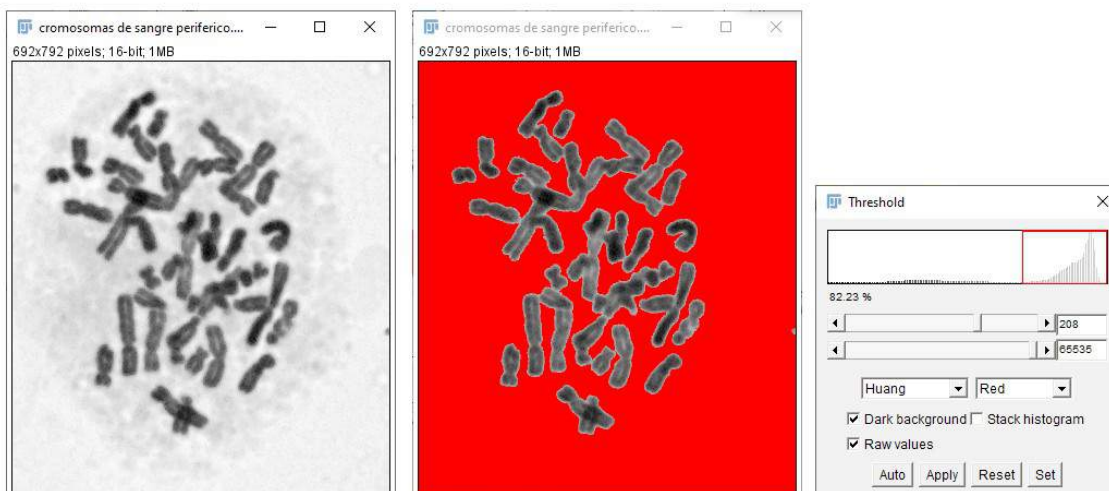


Se realizó imagen otras pruebas de umbralización para seleccionar el mejor método de segmentación imagen a, b, c d) también se sometió a una conversión a escala de grises de 16 bits e) e inversión de LUT (imagen inferior a la derecha).

SEGMENTACIÓN VÍA UMBRALIZACIÓN.

Se realizan distintos tipos de umbralizaciones con diferentes niveles de profundidad; y se mantienen los colores de fondo para verificar cual de todos otorga un mayor grado de limpieza de área de nuestro interés en la imagen; de los que se elige uno de las imágenes umbralizadas; en este caso el del fondo rojo para someter a la extracción de las características de nuestros cromosomas. Como se observa en la Ilustración 13 primera imagen a la izquierda conversión de escala de gris de 16 bit: primera imagen a la izquierda: Umbralización con fondo rojo.

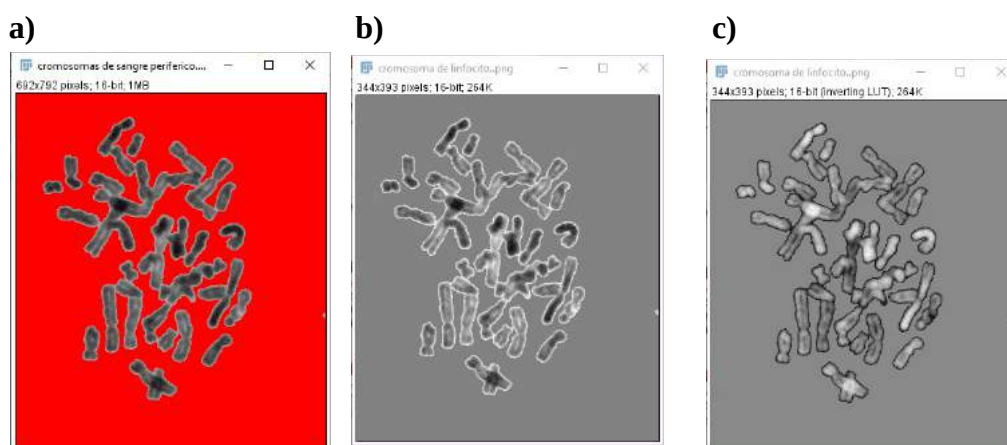
Ilustración 13: Umbralización o (Threshold) con fondo (background) rojo



CONVERSIÓN A ESCALA DE GRISES E INVERSIÓN DE LUT.

Los cromosomas humanos aquí utilizados contenían la membrana celular íntegra y visible al microscopio óptico; delimitan el contenido celular del resto de la muestra; la umbralización permitiendo un mejor agregado local de los cromosomas, restando a la imagen la información del fondo. Como visto en la ilustración 14. a)

Ilustración 14: Segmentación de fondo rojo, conversión a un escala de gris de 16 bit , e inversión de LUT.



Seguidamente se convierte en escala de gris; ilustración 14 b) en función a que los complementos para la extracción de la información solicitan

una entrada de imagen en escala de gris; para que sus algoritmos funcionen y reconozcan las estructuras en cuestión.

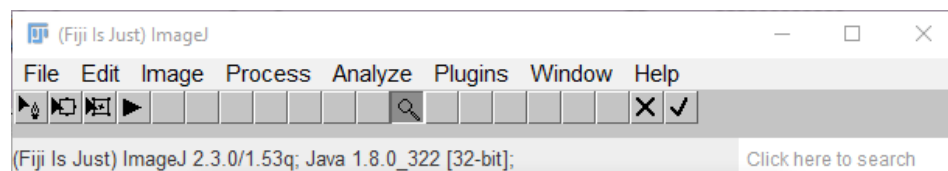
La inversión de LUT corresponde a la última segmentación a la cual es sometida la imagen este crea una inversión en el espectro de colores de la imagen; contrastando inversamente a los colores anteriores permitiendo delimitar las áreas de los cromosomas resaltando los bordes de los mismos. Visto en la Ilustración 14 c).

La imagen generada es guardada en formato PNG antes de usar los complementos de extracción.

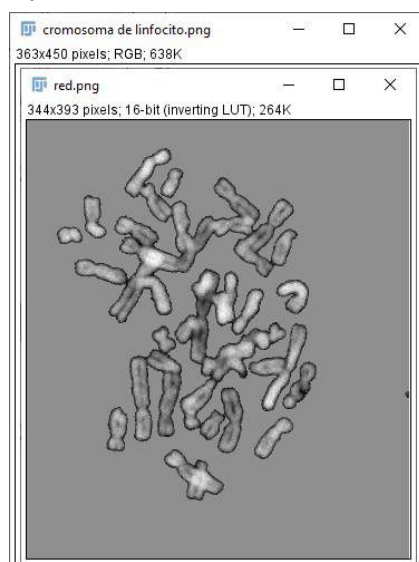
EXTRACCIÓN DE INFORMACIÓN NUMÉRICA UTILIZANDO EL PRIMER COMPLEMENTO DE CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS EL *PLUGIN* CHROMOSOMEJ.

Ilustración 15: Ventana del complemento ChromosomeJ previa a la extracción de la información numérica.

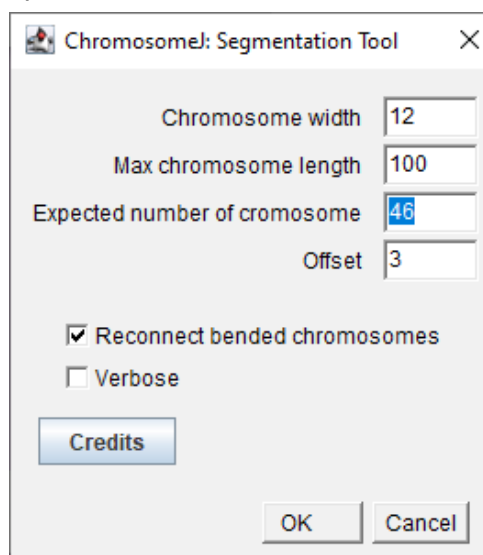
a)



b)

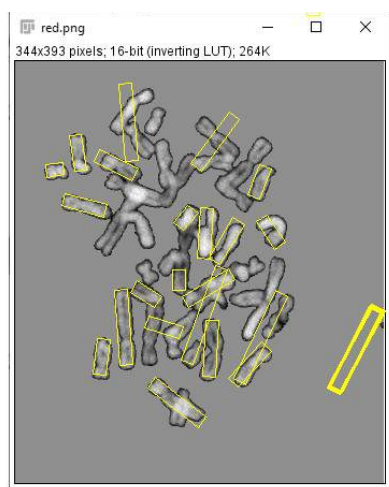


c)

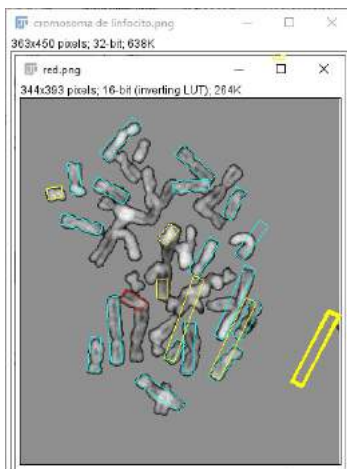


a) La imagen anteriormente segmentada y guardada es abierta nuevamente en Fiji en la barra de opciones del interfaz se abre el complemento chromosomeJ b) y c) mediante la opción *plugins*, se adiciona la cantidad de cromosomas que se esperan encontrar.

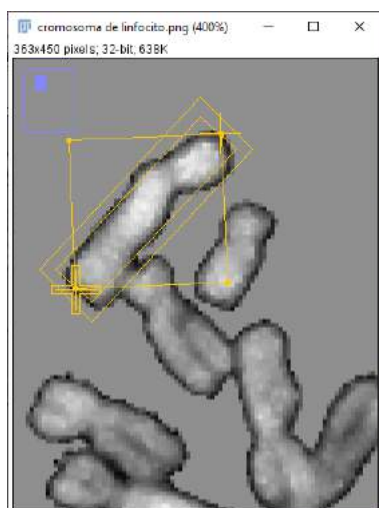
Ilustración 16: Etapas de procedimiento final de uso del complemento ChromosomeJ.



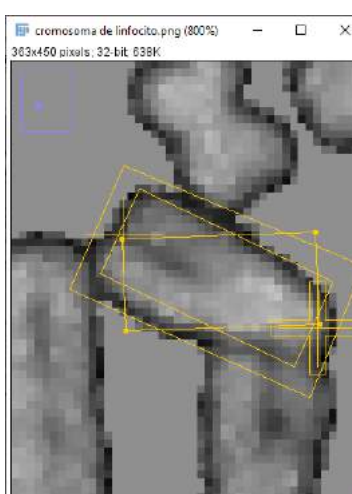
a)



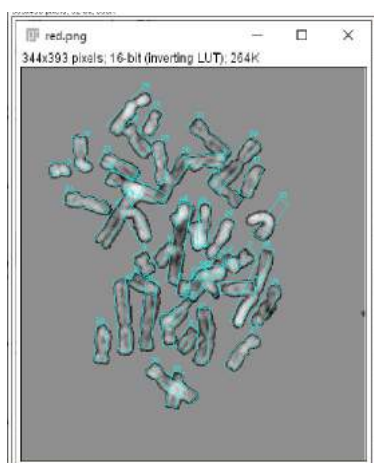
b)



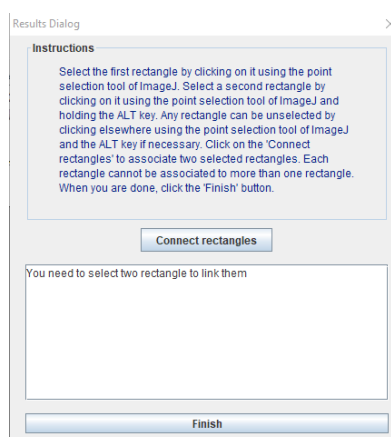
c)



d)



e)



f)

Imagen a) ilustración16 se abre una ventana que permite controlar la piezas móviles de la ventana de selección. Imagen b) la imagen original se duplica automáticamente en dos (2) ventanas que permite verificar la posición de los cromosomas y las áreas ya seleccionadas, cambian a color azul los cuales para evitar seleccionar mas una vez la misma estructura.

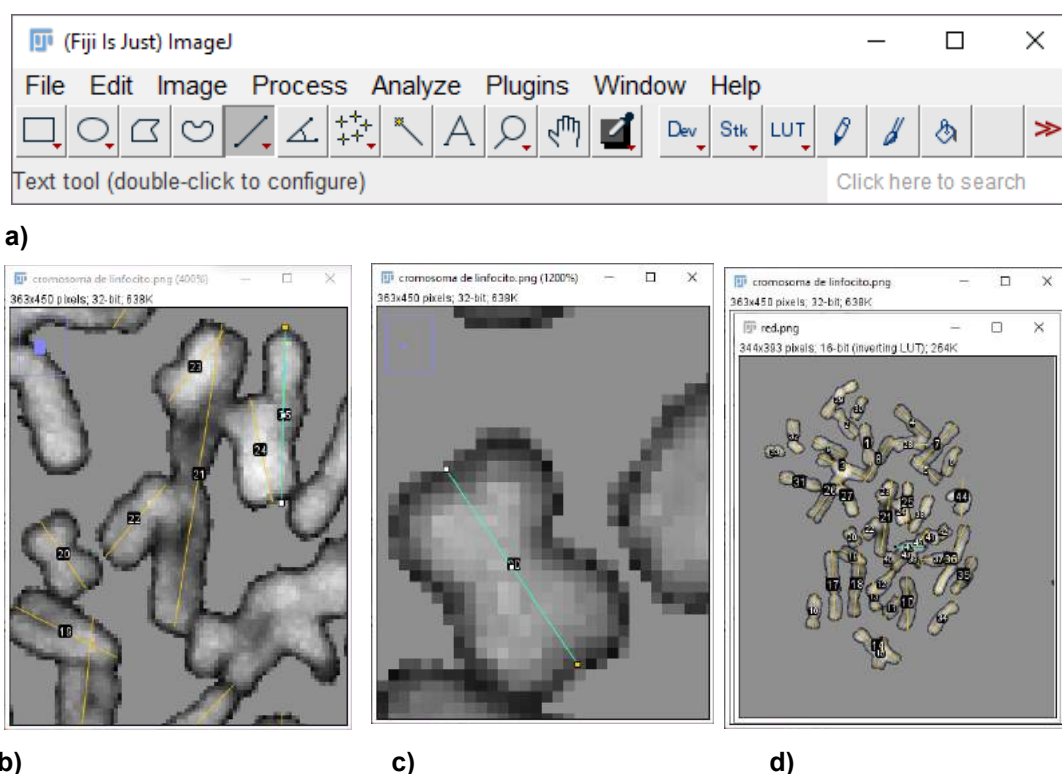
Imagen c) y d) denotando (rectangulos amarillos) del interfaz del complemento chrmosomeJ que permite el acercamiento y una mejor visualización de las áreas a seleccionar, ademas de tener la opción optimizar de corte con ajustes laterales y longitudinales previa a su selección.

e) al final la selección de todos los cromosomas, se abre la opción f) “conectar rectangulos” mediante esta opción se finalizar y se extrae el cariotipo de los cromosomas donde los cromosomas son alineados en orden descendentes como resultado.

EXTRACCIÓN DE INFORMACIÓN MORFOLÓGICA UTILIZANDO EL SEGUNDO COMPLEMENTO DE CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICAMENTE DE LOS CROMOSOMAS, EL *PLUGIN* LEVAN.

Para la caracterización de la morfología de los cromosomas mediante Levan, se abre la opción *plugins* en el interfaz y se selecciona de entre las opciones el complemento LEVAN conforme describe la ilustración 17.

Ilustración 17: Proceso de extracción de características cromosómicas con LEVAN.



- abre una ventana la cual solicita acceder por medio de la misma al archivo de la imagen.
- Una vez abierta se selecciona el área c) a través de un trazo lineal longitudinal a lo largo del cromosomas;
- una vez seleccionados se adiciona la opción classify que en seguida clasifica los cromosomas.

RESULTADO Y DISCUSION:

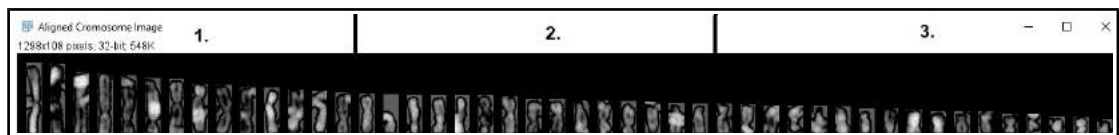
RESULTADO DE LA EXTRACCIÓN DE INFORMACIÓN NUMÉRICA UTILIZANDO EL PRIMER COMPLEMENTO DE CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS EL *PLUGIN* CHROMOSOMEJ.

Ilustración 18: Resultado de la extracción de información numérica del plugin ChromosomeJ

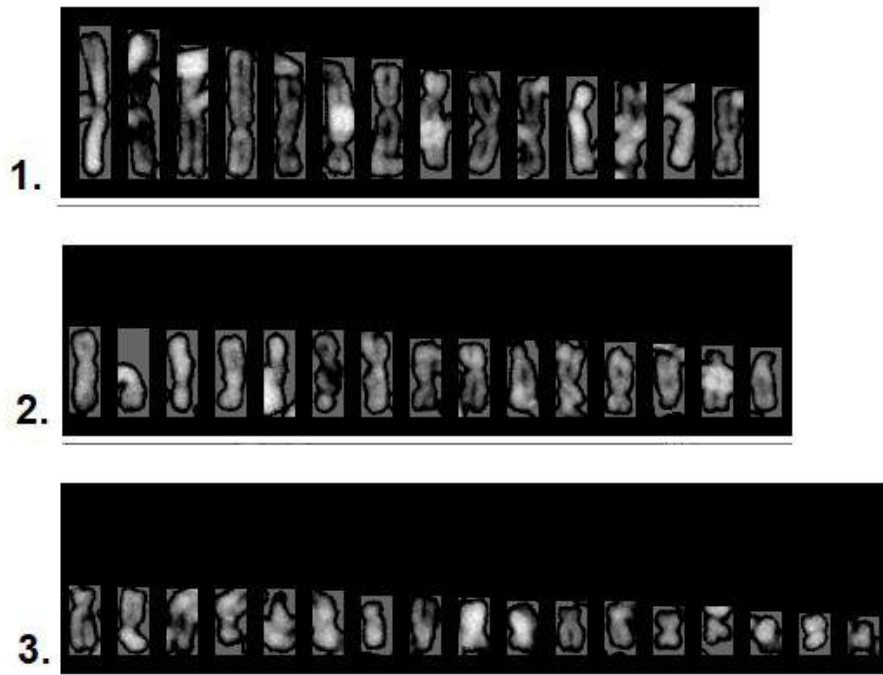
a)



b)



c)



a) Imagen de salida del idiograma como resultado del *plugin* ChromosomeJ, tamaño original

b) Imagen del idiograma dividida en 3 secciones. c) Imágenes en aumento de las secciones

1,2 y 3.

RESULTADO DE LA EXTRACCIÓN DE INFORMACIÓN MORFOLÓGICA UTILIZANDO EL SEGUNDO COMPLEMENTO DE CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICAMENTE DE LOS CROMOSOMAS DEL *PLUGIN* LEVAN.

Ilustración 19: Resultado de la etapa de extracción de informaciones mediante el complemento LEVAN

N	p	q	Total	A.R.	Morphology
[18,17]	3,65	4,01	7,66	1,10	Metacentric(m)
[35,36]	2,44	4,41	6,85	1,80	Submetacentric(sm)
[25,26]	2,48	3,70	6,19	1,49	Metacentric(m)
[8,7]	2,89	3,17	6,07	1,10	Metacentric(m)
[22,21]	1,30	4,31	5,61	3,32	Subtelocentric(st)
[4,3]	2,42	2,88	5,30	1,19	Metacentric(m)
[9,10]	2,04	3,05	5,09	1,49	Metacentric(m)
[13,14]	1,68	2,99	4,67	1,78	Submetacentric(sm)
[32,31]	2,01	2,44	4,45	1,22	Metacentric(m)
[28,27]	1,99	2,39	4,38	1,20	Metacentric(m)
[30,29]	1,43	2,79	4,22	1,95	Submetacentric(sm)
[37,38]	1,85	2,31	4,16	1,25	Metacentric(m)
[2,1]	1,77	2,35	4,11	1,33	Metacentric(m)
[43,44]	1,91	2,09	4,01	1,10	Metacentric(m)
[15,16]	1,83	1,99	3,82	1,09	Metacentric(m)
[6,5]	1,75	2,04	3,79	1,17	Metacentric(m)
[46,45]	1,67	1,83	3,50	1,09	Metacentric(m)
[33,34]	1,20	2,28	3,48	1,89	Submetacentric(sm)
[11,12]	1,32	2,09	3,41	1,59	Metacentric(m)
[20,19]	1,12	1,61	2,73	1,43	Metacentric(m)
[23,24]	1,24	1,48	2,72	1,20	Metacentric(m)
[40,39]	0,81	1,18	1,99	1,46	Metacentric(m)
[42,41]	0,83	0,95	1,78	1,15	Metacentric(m)

Caracterización y clasificación morfológica en función a N: que representa los cromosomas que fueron emparejados; p representa la media de la largura del brazo largo de los cromosomas q: representa la media de la largura del brazo corto de los cromosomas; cuya razón entre los brazos, genera un índice (A.R) que permite la clasificación morfológica de los mismos, en donde los resultados fueron tipo: (m): metacentricos; (sm): submetacentricos; (st): subtelocentricos.

DISCUSIÓN DEL RESULTADO DE LA CARACTERIZACIÓN DE LOS CROMOSOMAS DE LINFOCITO HUMANO.

En lo que respecta a la caracterización de los cromosomas de linfocito humano, el cual fue utilizado para comparar la funcionalidad del procedimiento metodológico de segmentación y extracción; en este trabajo se pudo verificar que:

La imagen de los cromosomas de linfocito humano; permitió verificar la posibilidad de utilización de ImageJ en el momento de caracterizar cromosomas utilizando como método de segmentación via umbralización inicialmente planteada en la metodología.

Varios son los factores que pudieran haber favorecido a este resultado como:

El procedimiento preparatorio realizada para la creación de la imagen de los cromosomas; ya que los cromosomas se encontraban relativamente separados previamente al procesamiento de la imagen.

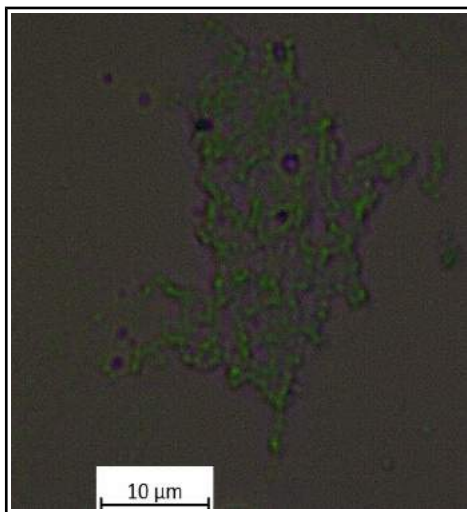
La visibilidad de los cromosomas; o el proceso de la tinción también contribuyo al éxito del procedimiento de la extracción de características y en la segmentación y extracción de características cromosomicas; se verifico que la etapa de umbralización demostró eficiencia en un numero reducido de cromosomas, por que implica una menor probabilidad de sobreposición, logro definir los bordes de los cromosomas; lo que permite una mejor evaluación de las características, por lo que supone ser una etapa significativa en el momento de utilizar complementos o herramientas semiautomáticos o herramientas que dependen de la óptica del investigador en el momento de la verificación.

Resultado de imágenes de cromosomas de las cAD-MSC obtenidas por Microscopia óptica y segmentadas mediante ImageJ.

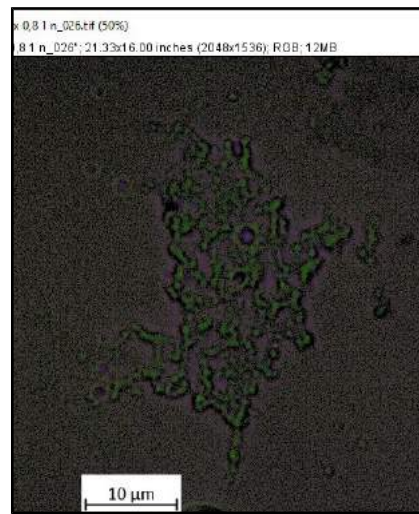
El primer paso es la segmentación de los cromosomas y los grupos de cromosomas en el fondo de la imagen, donde los principales métodos utilizados para segmentar las imágenes citogenéticas también se basan en la evaluación de un umbral global mediante el método de Otsu, sobre un umbral global con un Local Re -esquema de umbralización (LRT) o en la binarización de K-Means (POLETTI *et al.*, 2012; JANÉ *et al.*, 2021).

Fueron elegidas las imágenes de capturadas de cromosomas mas representativas como puede ser visto en el **anexo** se seleccionaron las imágenes con mejor formación de metafases, cuyas imágenes se sometieron a la umbralización como método de segmentación de imagen. Arrojando los siguientes resultados.

Ilustración 20: Imagen de metafase seleccionada del tratamiento 2 para la segmentación.



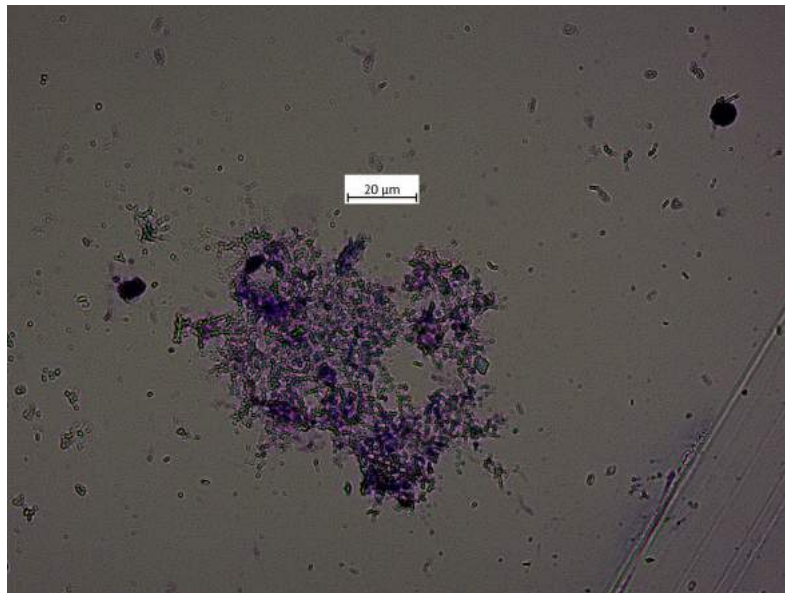
a) Imagen de una de las metafases resultados del tratamiento 2, con colchicina.



b) segmentacion via umbralización sin necesidad de pasar por la escala de grises utilizando metodo mean; Threshold color black; color space HSB; dark background, genero la imagen a la derecha.

Ilustración 21: Imágenes resultados del tratamiento T3 con colchicina antes y después de la segmentación.

a)



b)

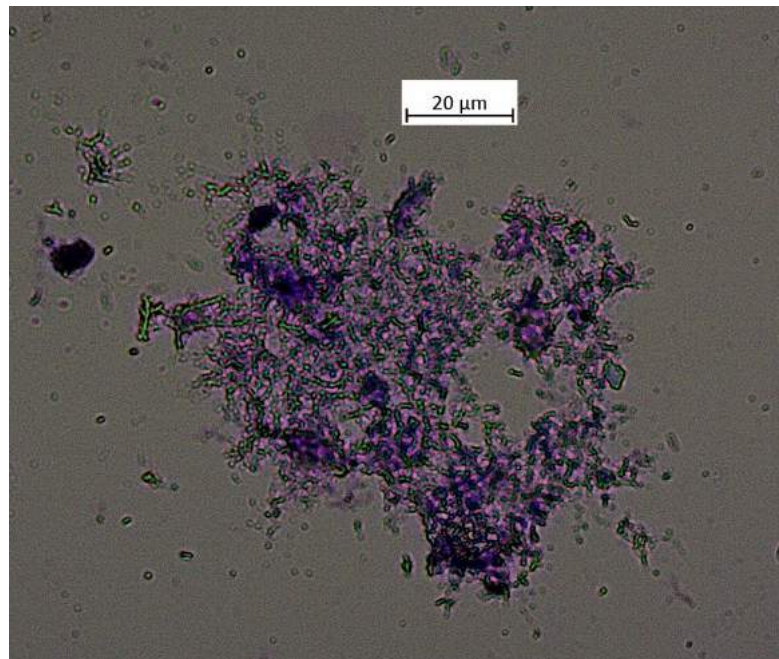
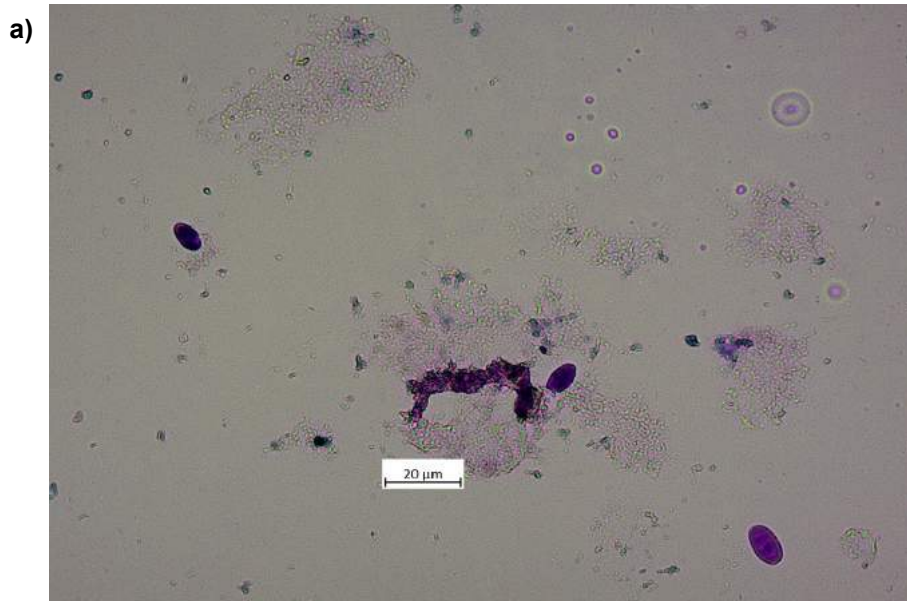
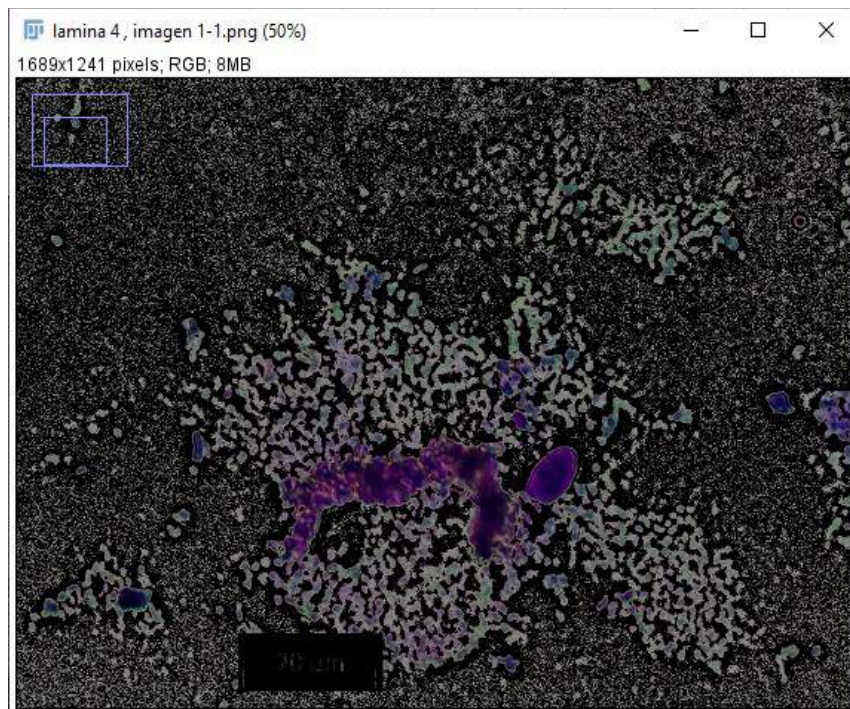


Imagen resultado T3 de segmentación por umbralización.a) Imagen de una de las metafases resultados del tratamiento T3 con colchicina.Obtenida vía microscopia. b) Segmentación Cromosómica Mediante Fiji Threshold color, imagen generada a través de uso de la umbralización sin necesidad de pasar por la escala de grises utilizando methodo Li; Threshold color black; color space HSB.

Ilustración 22: Imágenes de una de las metafases resultados del tratamiento T4 con colchicina antes y después de la segmentación.



b)



a) Imagen de una de las metafases resultados del tratamiento T4 con colchicina, obtenida via mocosopia. b) imagen a fue generada a través de uso de la umbralización sin pasar por la escala de grises utilizando methodo mean; Threshold color black; color space HSB; dark background.

DISCUSIÓN DEL RESULTADO DE LA CARACTERIZACIÓN CROMÓSOMICA DE LAS CAD-MSC.

En lo que respecta a la caracterización de los cromosomas de las células madre caninas cultivadas; las muestras de imágenes no pudieron ser segmentadas y caracterizadas en función a que el método no fue suficiente para delimitar las áreas de los cromosomas caninos analizados en los tratamientos con colchicina T2; T3 y T4 demostraron la formación de cromosomas metafásicos; el tratamiento 4 de demostró mayor localización y exposición local de los cromosomas; aunque no fue suficiente para la definición de las mismas. esto pudiera estar relacionada a la necesidad de mejoras en:

a) El tiempo de exposición y la concentración al colorante Giemsa demostraron marcar un diferencial en el momento de la visualización de los cromosomas; por lo que debe ser considerado realizar una exposición al colorante a un tiempo mayor a 10 minutos y una concentración mayor al 5,0 % al momento de realizar la tinción utilizando el colorante Giemsa. Por lo tanto: b) El tiempo ideal para la formación de cromosomas metafásicos correspondería a un tiempo mayor 60 minutos de exposición de las células en el inhibidor mitótico colchicina para permite una mejor localización y relativa segregación de los mismos al momento de la preparación de los cromosomas, fue notable a partir de los 60 minutos de exposición en donde se observo menor grado solapamiento de cromosomas, REIMANN- BERG *et al* 2012 menciona que el tratamiento con colchicina para el estudio de cromosomas caninos correspondería 0.1 µg/mL a aproximadamente 1.5 a 2 horas antes de la cosecha

Ademas en la ilustración 6 imagen 6 correspondiente al frasco numero 5, de tiempo de tratamiento desigando luego como T5, en el que en teoría este tendría una mejor observación de los cromosomas al estar mas próximo del tiempo considerado por REIMANN- BERG *et al* 2012. para el tratamiento con colchicina, no obstante pudo observarse que este frasco de cultivo denotaba estar menos confluentes con relación a resto de las otras

garrafas de cultivo y por lo tanto menos predispuestos genéticamente al estar senecientes en el momento del tratamiento, cosecha y tinción

El procedimiento final del procesamiento de Imágenes; correspondiente a la extracción de la información denominada aquí caracterización cromosómica numérica y morfológica se vio comprometida por las etapas previa a la segmentación; por lo cual no pudo ser concretada, esto en función a que esta etapa depende en gran medida de los procedimientos preparatorios de las células, que consecutivamente permitirían una mejor segregación cromosomica y una mejor observación de las estructuras aquí estudiadas.

Por lo que fue evidente que los procesos inherentes a la preparación celular, tinción y segmentación cromosomica son los procesos claves en el momento de montar un cariotipo por lo tanto optimizar estos parámetros en el momento de replicar el procedimiento permitirá una mejor evaluación de las características tanto numéricas como estructurales de los cromosomas de las CAD-MSK.

El desafío de los geneticistas al diseño y desarrollo ideal de un sistema automatizado de cromosomas es una tarea desafiante; las diferencias significativas que influyen en la calidad de la imagen a analizar suelen ocurrir durante la obtención de la imagen, dependen a su vez del método de tinción, daños en los cromosomas, límites débiles, sobreposición de cromosomas; variaciones morfológicas, lo que permite la segmentación automática de cromosomas y la separación exitosa de este, esto a la vez sumado al que el análisis citogenético de células caninas también presenta desafíos en función a la complejidad que suponen el cariotipaje de los cromosomas del grupo B, además de que la estandarización de la morfología de los mismos es relativamente reciente, para el análisis de las células caninas son utilizadas los mismos procedimientos para la preparación en la citogenética humana.

La integración de técnicas modernas como genética molecular, programas computacionales adaptados, facilitarán y completarán los estudios

de la citogenética convencional, aun no podemos prescindir de la citogenética convencional, ya que responden a interrogantes puntuales a aberraciones estructurales de manera eficiente, aun que el desenvolvimiento de softwares de análisis, aportarian una rapida caracterización de metafase canino, no obstante estos programas de softwares requeriran un aprendizaje previo ademas de la interpretación de un citogeneticista, por lo que la citogenética convencional es clave en el analisis y caracterización de aberraciones cromosomicas. (POLETTI *et al.*, 2012; REIMANN- BERG *et al* 2012. TORRES *et al* 2018; AHMAD *et al.*, 2019; JANÉ *et al.*, 2021)

8. CONSIDERACIONES FINALES.

Los procedimientos inherentes a la preparación celular, tinción y segmentación cromosómica son los procesos claves en el momento de montar un cariotipo por lo que es necesario optimizar estos parámetros en el momento de replicar el procedimiento lo que permitirá una mejor evaluación de las características tanto numéricas como estructurales de los cromosomas de las CAD-MSD.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

ABU-GHNAME, Amjed; PERDANASARI, Aurelia Trislina; REECE, Edward M. Principles and applications of fat grafting in plastic surgery. In: Seminars in Plastic Surgery. Thieme Medical Publishers, 2019. p. 147-154.

AHMAD, Syed Farhan; MARTINS, Cesar. The modern view of B chromosomes under the impact of high scale omics analyses. *Cells*, 2019, 8.2: 156.

ANKRUM, James A.; ONG, Joon Faii; KARP, Jeffrey M. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature biotechnology*, 2014, 32.3: 252-260.

ALONSO-GOULART, Vivian, et al. Biomaterials and adipose-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine: A systematic review. *Materials*, 2021, 14.16: 4641.

ALIEVI, Anderson Lucas. AVALIAÇÃO DO LISADO DE PLASMA RICO EM PLAQUETAS CANINO COMO SUBSTITUTO DO SORO FETAL BOVINO NO CULTIVO DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO CANINO. 53 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2021.

ARORA, Tanvi; DHIR, Renu. A review of metaphase chromosome image selection techniques for automatic karyotype generation. *Medical & biological engineering & computing*, 2016, 54.8: 1147-1157.

BALAGALLA, Umaya Bhashini; SAMARABANDU, Jagath; SUBASINGHE, Akila. Automated human chromosome segmentation and feature extraction: Current trends and prospects. *F1000Research*, 2022, 11.301: 301.

BALAJEE, Adayabalam S.; HANDE, M. Prakash. History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2018, 836: 3-12.

BREEN, Matthew. Canine cytogenetics—from band to basepair. *Cytogenetic and genome Research*, 2008, 120.1-2: 50-60.

BLAU, Helen M.; DALEY, George Q. Stem cells in the treatment of disease. *New England Journal of Medicine*, v. 380, n. 18, p. 1748-1760, 2019.

BIRBRAIR, Alexander. Stem cell microenvironments and beyond. In: *Stem Cell Microenvironments and Beyond*. Springer, Cham, 2017. p. 1-3

BORGONOVO, Tamara, et al. Genetic evaluation of mesenchymal stem cells by G-banded karyotyping in a Cell Technology Center. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 2014, 36: 202-207.

CASPERSSON, T.; ZECH, Lore; JOHANSSON, C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Experimental cell research*, 1970, 60.3: 315-319.

CASPERSSON, T., et al. Chemical differentiation with fluorescent alkylating agents in *Vicia faba* metaphase chromosomes. *Experimental Cell Research*, 1969, 58.1: 128-140.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, 1991, 9.5: 641-650.

CLEVERS, Hans C. Organoids: avatars for personalized medicine. *The Keio journal of medicine*, v. 68, n. 4, p. 95-95, 2019.

CLEVINGER, Tracy N., et al. Strategies for bioengineered scaffolds that support adipose stem cells in regenerative therapies. *regenerative medicine*, 2016, 11.6: 589-599.

CHU, Dinh-Toi, et al. Adipose tissue stem cells for therapy: an update on the progress of isolation, culture, storage, and clinical application. *Journal of Clinical Medicine*, 2019, 8.7: 917.

DI BELLA, Santina, et al. The Effect of a 7 Year-Long Cryopreservation on Stemness Features of Canine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (cAD-MSC). *Animals*, 2021, 11.6: 1755.

DOMINICI, M. L. B. K. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DUAN, Wei; LÓPEZ, Mandi J.; HICOK, Kevin. Criopreservación de células estromales multipotentes adultas: ventajas y desventajas. *Cirugía Veterinaria*, v. 47, n.1, pág.19-29, 2018.

EJAZ, Asim, et al. Fibroblast feeder layer supports adipogenic differentiation of human adipose stromal/progenitor cells. *Adipocyte*, 2019, 8.1: 178-189.

ETTLIN, Julia, et al. Analysis of gene expression signatures in cancer-associated stroma from canine mammary tumours reveals molecular homology to human breast carcinomas. *International journal of molecular sciences*, 2017, 18.5: 1101.

GHARBIA, Sami, et al. Regenerative Potential of Mesenchymal Stem Cells' (MSCs) Secretome for Liver Fibrosis Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22.24: 13292.

GIMBLE, Jeffrey M. Adipose tissue-derived therapeutics. *Expert opinion on biological therapy*, 2003, 3.5: 705-713.

GIMBLE, Jeffrey M.; KATZ, Adam J.; BUNNELL, Bruce A. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation research*, 2007, 100.9: 1249-1260.

GIMBLE, Jeffrey M., et al. Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. *Organogenesis*, 2013, 9.1: 3-10.

GOMILLION, Cheryl T.; BURG, Karen JL. Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials*, 2006, 27.36: 6052-6063.

GÜL, Sancak İrem et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from the adipose tissue of young and old dogs. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, v. 63, n. 3, p. 297-302, 2016.

GUGLIANDOLO, Agnese; BRAMANTI, Placido; MAZZON, Emanuela. Mesenchymal Stem Cells in Multiple Sclerosis: Recent Evidence from Pre-Clinical to Clinical Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 8662, 2020.

HELMY, Myriam A., et al. A protocol for primary isolation and culture of adipose-derived stem cells and their phenotypic profile. *Alexandria Journal of Medicine*, 2020, 56.1: 42-50.

HOWE, Bradley; UMRIGAR, Ayesha; TSIEN, Fern. Chromosome preparation from cultured cells. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2014, 83: e50203.

JACOBS, Sandra A., et al. Human multipotent adult progenitor cells are nonimmunogenic and exert potent immunomodulatory effects on alloreactive T-cell responses. *Cell Transplantation*, 2013, 22.10: 1915-1928.

KHAN, Ammad Aslam; ASHRAF, Muhammad. Use of Corel Photo-Paint® for Chromosome Karyotyping: An Inexpensive, Semiautomatic Approach. *Journal of the Association of Genetic Technologists*, 2005, 31.2: 52-54.

KIRKLAND, David J. Chromosomal aberration tests in vitro: problems with protocol design and interpretation of results. *Mutagenesis*, 1992, 7.2: 95-106.

LAPLANE, Lucie; SOLARIO, Eric. Filosofía de la biología: hacia una clasificación de las células madre. *Elife*, versículo 8, pág. e46563, 2019.

LAZZAROTTO-SILVA, Carolina. Estudos moleculares de células tronco mesenquimais cultivadas in vitro. 2009.

LEE, Yun-Hee, et al. Exploring the activated adipogenic niche: interactions of macrophages and adipocyte progenitors. *Cell Cycle*, 2014, 13.2: 184-190.

LEE, Jienny et al. Effect of donor age on proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue. *Journal of Veterinary Science*, v. 18, n. 2, p. 141-148, 2017.

LEDEZMA FUENTES, Luis Enrique. Reconocimiento de patrones para estructuras cromosómicas; *Universidad Autónoma del Estado de México UAEM*; 2013.

LIU, Zhao-Jun; ZHUGE, Ying; VELAZQUEZ, Omaid C. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry*, 2009, 106.6: 984-991.

LONDOÑO, Sarah Cristina da Silva. Doença do disco intervertebral em cães: aspectos fisiopatológicos e reabilitação. 2021.

LORMAND, Charline, et al. Weka trainable segmentation plugin in imagej: A semi-automatic tool applied to crystal size distributions of microlites in volcanic rocks. *Microscopy and Microanalysis*, 2018, 24.6: 667-675.

LUO, Huina, et al. Manufacturing and banking canine adipose-derived mesenchymal stem cells for veterinary clinical application. *BMC Veterinary Research*, 2021, 17.1: 1-11.

LLAMBÍ DELLACASA, Silvia; ARRUGA LAVIÑA, M. *Selecciones de genética veterinaria I*. Universidad de Zaragoza. Facultad de Veterinaria, 2018; Pagina 19; capítulo I; El puzzle de los genomas de animales domésticos.

MAYANI, Héctor. At 50 years of the discovery of hematopoietic stem cells. *Revista de Hematología*, 2011, 12.1: 5-6.

MAZINI, Loubna, et al. Regenerative capacity of adipose derived stem cells (ADSCs), comparison with mesenchymal stem cells (MSCs). *International journal of molecular sciences*, 2019, 20.10: 2523.

MEIRELLES, Lindolfo da Silva; CHAGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, 2006, 119.11: 2204-2213.

MERUANE, Manuel; ROJAS, Mariana. Células troncales derivadas del tejido adiposo. *International journal of morphology*, 2010, 28.3: 879-889.

MIURA, Masako, et al. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem cells*, 2006, 24.4: 1095-1103.

MONTAZERINEZHAD, Somayeh; EMAMJOMEH, Abbasali; HAJIEGHRARI, Behzad. Chromosomal abnormality, laboratory techniques, tools and databases in molecular Cytogenetics. *Molecular Biology Reports*, 2020, 47.11: 9055-9073.

MORAIS, C. S. D., et al. Direct preparation protocol to obtain mitotic chromosomes from canine mammary tumors. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14.4: 19389-19395.

MOCCHI, Michela et al. Veterinary regenerative medicine for musculoskeletal disorders: can mesenchymal stem/stromal cells and their secretome be the new frontier?. *Cells*, v. 9, n. 6, p. 1453, 2020.

MCINTIRE, Erik, et al. Genomic stability testing of pluripotent stem cells. *Current protocols in stem cell biology*, 2020, 52.1: e107.

NERI, Simona. Genetic stability of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine applications: a fundamental biosafety aspect. *International journal of molecular sciences*, 2019, vol. 20, no 10, p. 2406.

NIKITINA, Victoria, et al. Clonal chromosomal and genomic instability during human multipotent mesenchymal stromal cells long-term culture. *PLoS One*, 2018, 13.2: e0192445.

NOMBELA-ARRIETA, César; RITZ, Jerome; SILBERSTEIN, Leslie E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2011, 12.2: 126-131.

OSTRANDER, Elaine A.; WAYNE, Robert K. The canine genome. *Genome research*, 2005, 15.12: 1706-1716.

OTHMANI, AE et al. La criopreservación afecta la funcionalidad celular de las células madre derivadas de tejido adiposo expandido a largo plazo. *J. Res. de células madre. Ther.*, v. 9, n.1, 2019.

PARCA, Renata Miranda; TAKAO, Marilia Rodrigues Mendes; DA SILVA JUNIOR, João Batista. Proposta de marco regulatório para os Produtos de Terapias Avançadas no Brasil. *Vigilância Sanitária em Debate*, 2018, 6.1: 15-22.

PITTENGER, Mark F., et al. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *NPJ Regenerative medicine*, 2019, 4.1: 1-15.

PITTENGER, Mark F., et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284.5411: 143-147.

PO Michel, R. Delgado-Gonzalo, M. Hubert, L. Baldi, DL Hacker, M. Unser, FM Wurm, "Evaluación de la variación de la longitud cromosómica en células CHO", Actas de la vigésimo tercera reunión de la Sociedad Europea de Animal Cell Technology (ESACT'13), Lille, Francia, 23-26 de junio de 2013, pp. 206.

POST, Yorick; CLEVERS, Hans. Defining adult stem cell function at its simplest: the ability to replace lost cells through mitosis. *Cell stem cell*, 2019, vol. 25, no 2, p. 174-183.

PURWANINGRUM, Medania et al. Comparative characteristic study from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Veterinary Science*, v. 22, 2021.

PRZĄDKA, Przemysław et al. The role of mesenchymal stem cells (MSCs) in veterinary medicine and their use in musculoskeletal disorders. **Biomolecules**, v. 11, n. 8, p. 1141, 2021.

RAPOSIO, Edoardo; CILIBERTI, Rosa Gemma. Clinical use of adipose-derived stem cells: European legislative issues. *Annals of medicine and surgery*, v. 24, p. 61-64, 2017.

REMYA, R. S., et al. Preprocessing G-banded metaphase: towards the design of automated karyotyping. *SN Applied Sciences*, 2019, 1.12: 1-8.

REIMANN-BERG, N., et al. Chromosome analyses in dogs. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere/Heimtiere*, 2012, 40.03: 191-196.

RICORDI, C. MESENCHYMAL STEM CELLS. *CellR4--repair, replacement, regeneration, & reprogramming*, 2013, 1.2: e405.

RIMBAULT, Maud; OSTRANDER, Elaine A. So many doggone traits: mapping genetics of multiple phenotypes in the domestic dog. *Human molecular genetics*, 2012, 21.R1: R52-R57.

RODBELL, Martin. Metabolism of Isolated Fat Cells: II. The similar effects of phospholipase c (*Clostridium perfringens* α toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 1966, 241.1: 130-

SAKAMOTO, Y. and Zacaro, A. A. 2009. LEVAN, un complemento de IMAGEJ para el análisis citogenético morfológico de cromosomas mitóticos y meióticos. Versión inicial. Un complemento Java de código abierto.

SANTOS, Enrico Jardim Clemente, et al. Células-tronco mesenquimais alogênicas no tratamento das sequelas neurológicas de cinomose canina. *Revista Científica de Medicina Veterinária-Pequenos Animais e Animais de Estimação*, 2019, 49.3: 32-40.

SALTZMAN, W. Mark. Tissue engineering: engineering principles for the design of replacement organs and tissues. Oxford university press, 2004.

SHAH, Kiran et al. Outcome of allogeneic adult stem cell therapy in dogs suffering from osteoarthritis and other joint defects. *Stem Cells International*, v., 2018.

SI, Zizhen et al. Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 114, p. 108765, 2019.

STEINER, Dominik, et al. The Adipose-Derived Stem Cell and Endothelial Cell Coculture System—Role of Growth Factors?. *Cells*, 2021, 10.8: 2074.

STEFFEN, Frank et al. Treatment of naturally degenerated canine lumbosacral intervertebral discs with autologous mesenchymal stromal cells and collagen microcarriers: a prospective clinical study. *Cell transplantation*, v. 28, n. 2, p. 201-211, 2019.

STETTEN, Gail. The Principles of Clinical Cytogenetics. *American Journal of Human Genetics*, 2005, 76.3: 543. Capítulo 63; Examining and Analyzing Chromosomes.

SÖHNER, Felicitas; HANSSON, Nils. Placing women in Cytogenetics: Lore Zech and the chromosome banding technique. *Molecular Cytogenetics*, 2021, 14.1: 1-8.

SQUILLARO, Tiziana; PELUSO, Gianfranco; GALDERISI, Umberto. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell transplantation*, 2016, 25.5: 829-848.

SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 2012, 9.7: 671-675.

SZCZERBAL, Izabela; SWITONSKI, Marek. Clinical cytogenetics of the dog: a review. *Animals*, 2021, 11.4: 947.

TASNIM, Nishat, et al. 3D bioprinting stem cell derived tissues. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2018, 11.4: 219-240.

TILL, James E.; MCCULLOCH, Ernest A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation research*, 1961, 14.2: 213-222.

THOMAS, R., et al. Chromosome aberrations in canine multicentric lymphomas detected with comparative genomic hybridisation and a panel of single locus probes. *British journal of cancer*, 2003, 89.8: 1530-1537.

TONNARD, Patrick, et al. Nanofat grafting: basic research and clinical applications. *Plastic and reconstructive surgery*, 2013, 132.4: 1017-1026.

TORRES, Myriam Janeth Ortega; ROMERO, José Camilo Torres; OSORIO, Julialba Ángel. Fundamentos de citogenética humana y animal. *Libros Universidad Nacional Abierta ya Distancia*, 2018.

TORRES E. Ventajas y limitaciones de la citogenética en la medicina actual. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*. 2018; 16(2): 107-112

TREMOLADA, Carlo; COLOMBO, Valeria; VENTURA, Carlo. Adipose tissue and mesenchymal stem cells: state of the art and Lipogems® technology development. *Current stem cell reports*, 2016, 2.3: 304-312.

UNE, Tomoka, et al. Assessment of molecular cytogenetic methods for the detection of chromosomal abnormalities. *Acta Medica Okayama*, 2006, 60.5: 279-287.

UHLMANN, Virginie, et al. User-friendly image-based segmentation and analysis of chromosomes. In: *2016 IEEE 13th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI)*. IEEE, 2016. p. 395-398.

VAN PHAM, Phuc; VU, Ngoc Bich. In vitro expansion of mesenchymal stem cells for clinical use. *Progress in Stem Cell*, 2016, 3.02: 87-96.

VIEIRA, N. M., et al. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell transplantation*, 2010, 19.3: 279-289.

VOGA, Metka et al. Stem Cells in Veterinary Medicine—Current State and Treatment Options. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 7, p. 278, 2020.

VOLAREVIC, Vladislav, et al. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International journal of medical sciences*, 2018, 15.1: 36.

VOZDOVA, Miluse, et al. Structural and copy number chromosome abnormalities in canine cutaneous mast cell tumours. *Journal of applied genetics*, 2019, 60.1: 63-70.

VOSATKA, Karl W.; LAVENUS, Sandrine B.; LOGUE, Jeremy S. A novel Fiji/ImageJ plugin for the rapid analysis of blebbing cells. *PloS one*, 2022, 17.4: e0267740.

WALLIS, Natalie; RAFFAN, Eleanor. The genetic basis of obesity and related metabolic diseases in humans and companion animals. *Genes*, 2020, 11.11: 1378.

WANG, Xusheng. Stem cells in tissues, organoids, and cancers. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76.20: 4043-4070.

WEI, Xin, et al. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2013, 34.6: 747-754.

WILLIAM, T. Tse, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells suppress T cell activation without inducing allogeneic anergy. *Blood*, 2000, 96.11 PART I.

WORKU, Misganaw Gebrie. Pluripotent and multipotent stem cells and current therapeutic applications. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, 2021, 14: 3.

YAMANAKA, Shinya. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges. *Cell Stem Cell*, v. 27, n. 4, p. 523-531, 2020.

YANESELLI, Kevin M. et al. Comparison of the characteristics of mesenchymal stem cells derived from canine adipose tissue extracted from different sites and in different numbers of passages. *Journal of Veterinary Sciences*, v. 19, n. 1, p. 13, 2018.

YANESELLI, Kevin et al. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de caninos, equinos y felinos en Uruguay. *Veterinaria (Montev.)*[online]. 2018, vol.54, n.209, pp.18-25. ISSN 0376-4362.

ZUK, Patricia A., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 2001, 7.2: 211-228.

10. ANEXO.

A seguir imágenes adquiridas vía microscopia óptica a través del *software* Matscope en la etapa de microscopia de la metodología establecida, de los tiempos de Tratamiento con solución colchicina implementados para la captura de fotografías de los cromosomas observados en las laminas.

Imágenes correspondientes a T2 como puede ser observado en la tabla 2. del Tratamiento con solución colchicina.

Tratamiento con solución colchicina	Tiempo de exposición
T1: tratamiento 30 minutos de incubación.	(tiempo mínimo establecido).
* T2: tratamiento 40 minutos de incubación.	10 minutos de exposición.
T3 : tratamiento 50 minutos de incubación.	20 minutos de exposición.
T4 : tratamiento 60 minutos de incubación.	+ 30 minutos de exposición.
T5 : tratamiento 70 minutos de incubación.	+ 40 minutos de exposición.

Tabla 2: Tabla de Tiempos de Tratamiento (T) de la solución colchicina para la formación de los cromosomas mitóticos, * denotando el tiempo que exposición correspondiente a T2.

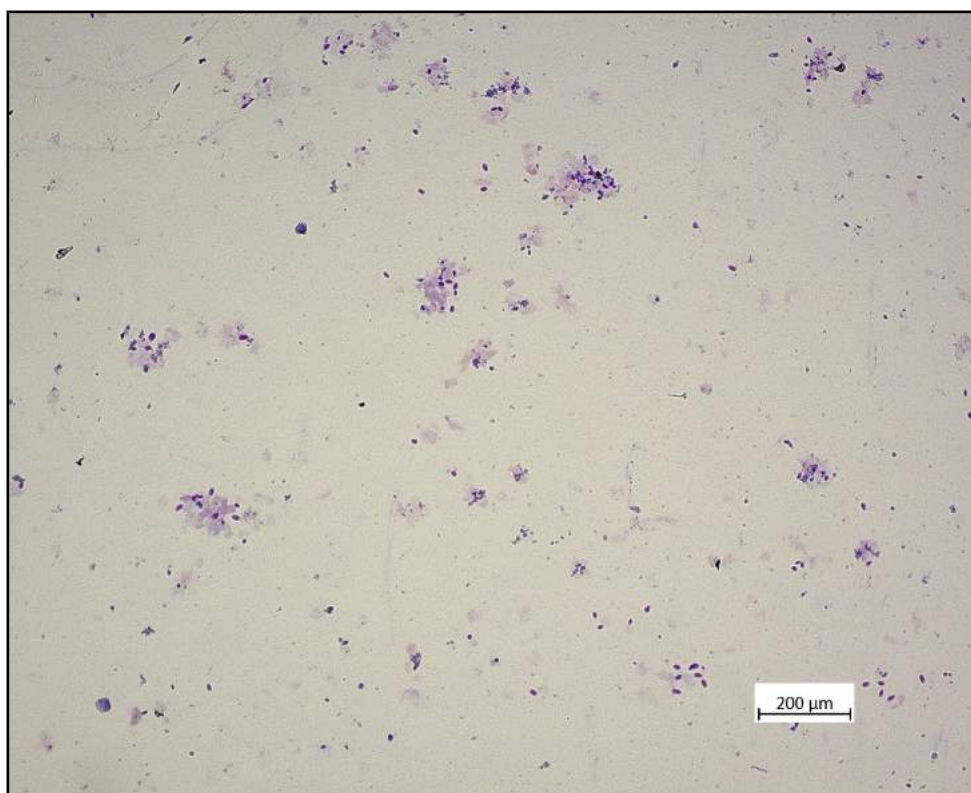


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 200µm

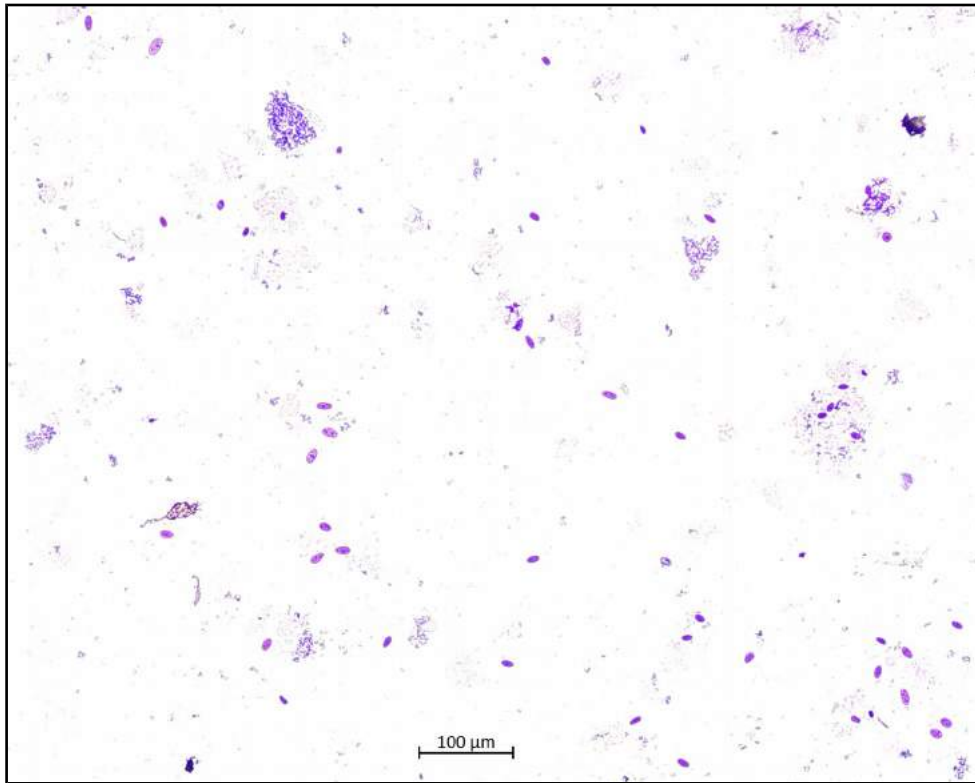


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 100μm

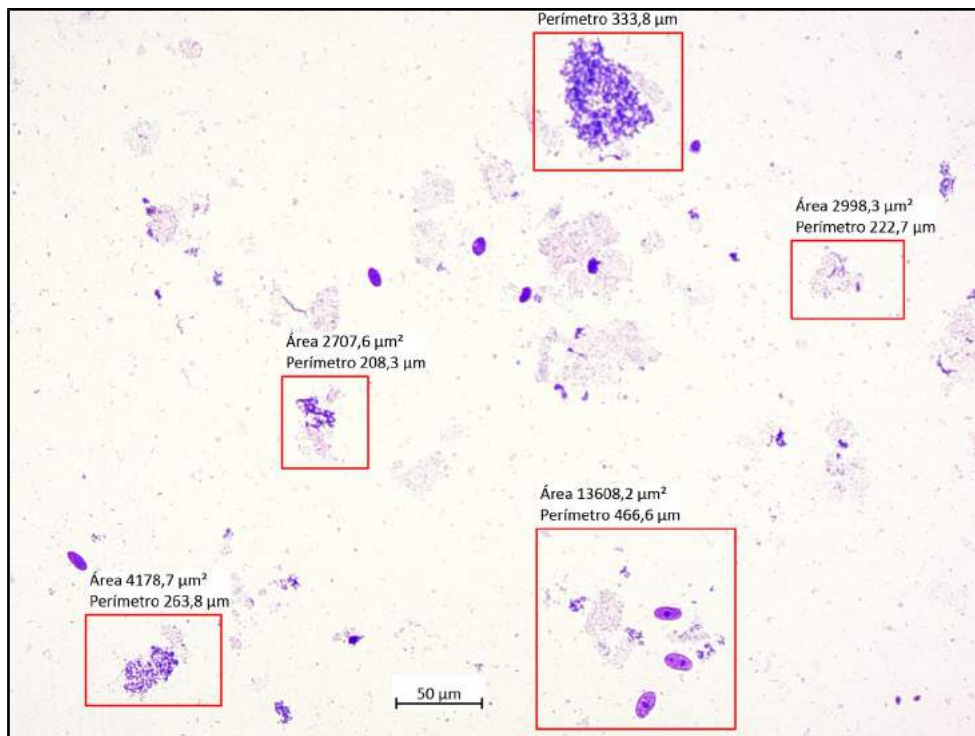


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 50μm denotando las metafases y sus respectivas dimensiones en cuadros rojos, mediante el software Matscope.

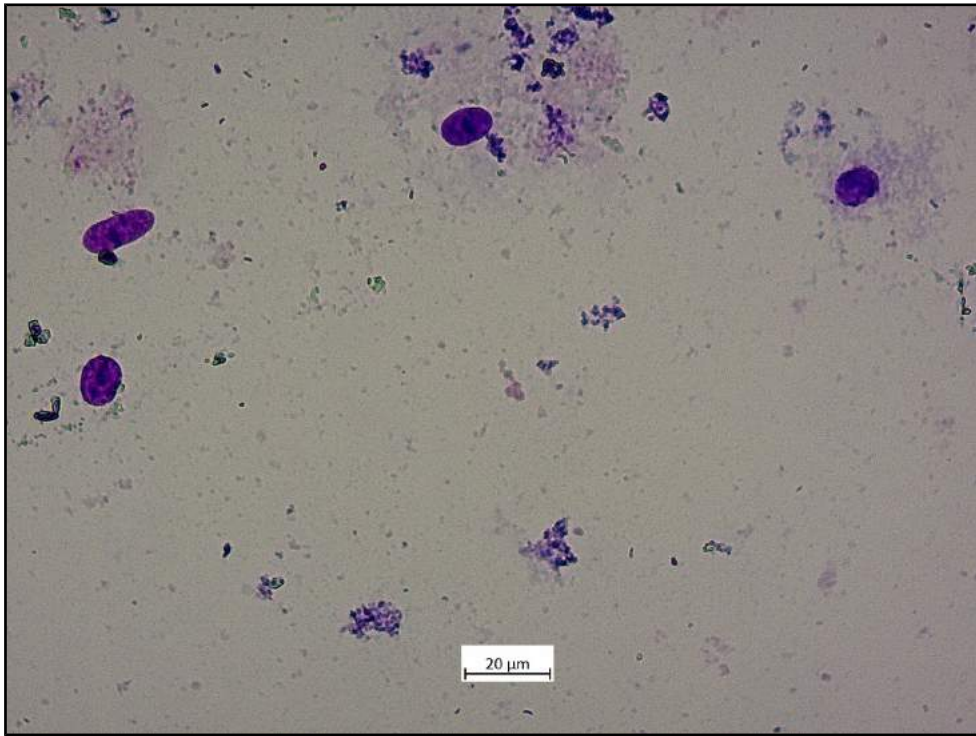


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 20μm

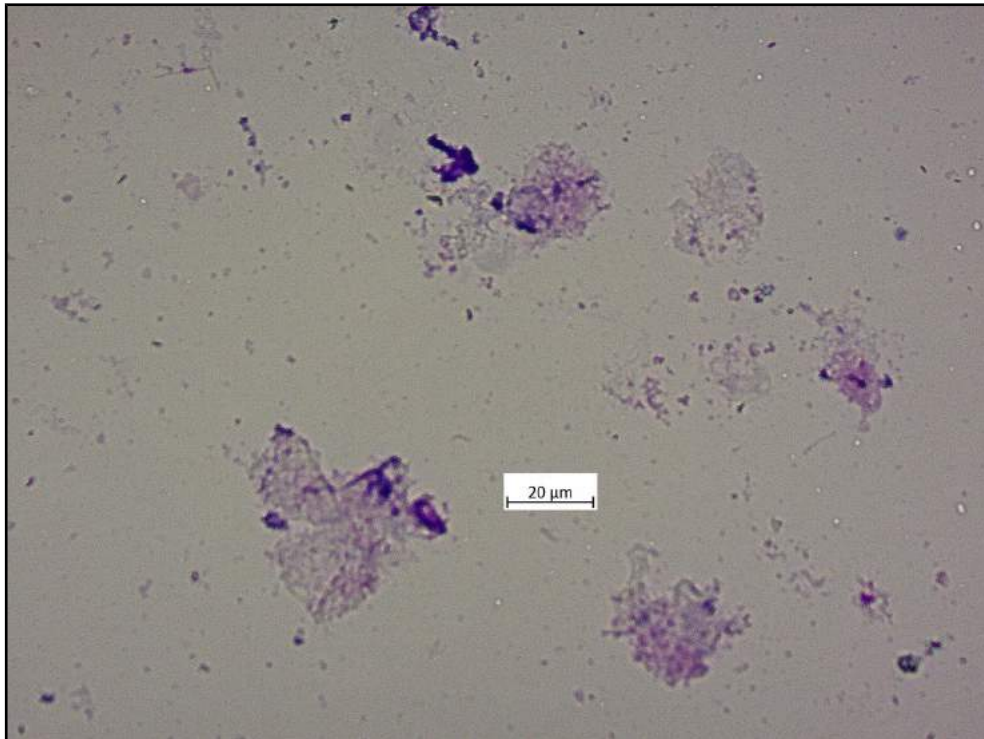


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 20μm

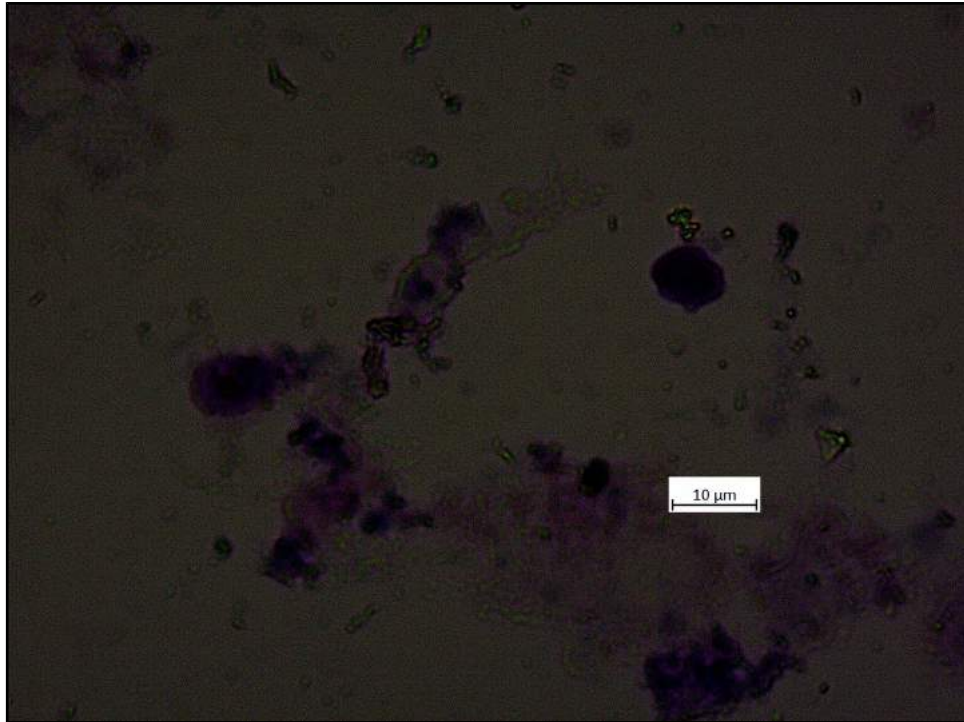


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 20 μ m.

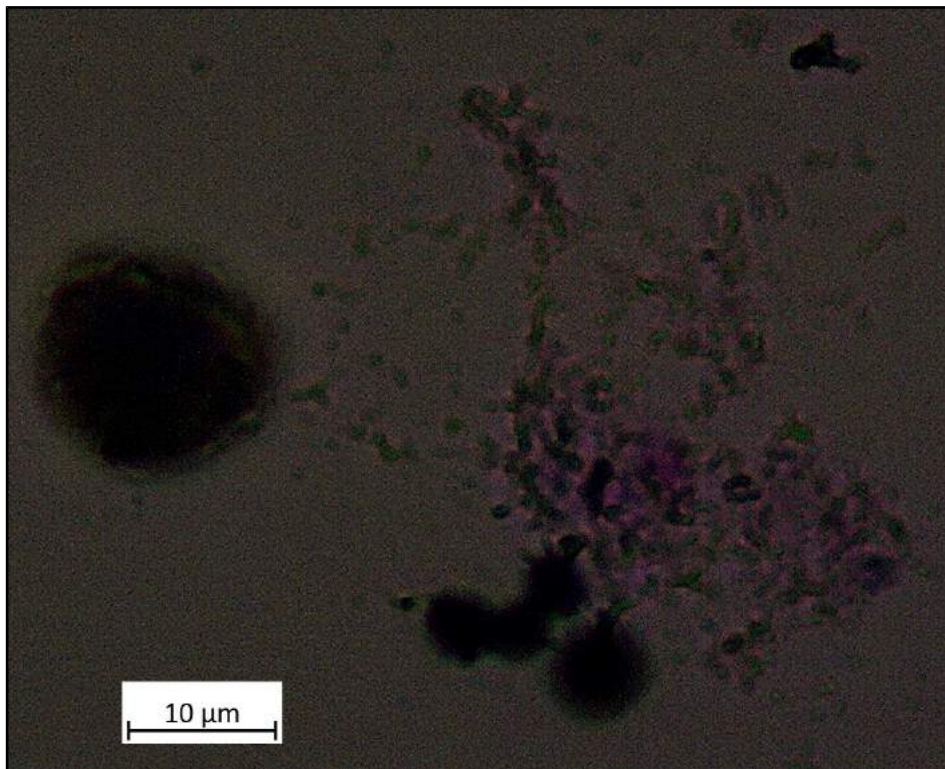


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 10 μ m.

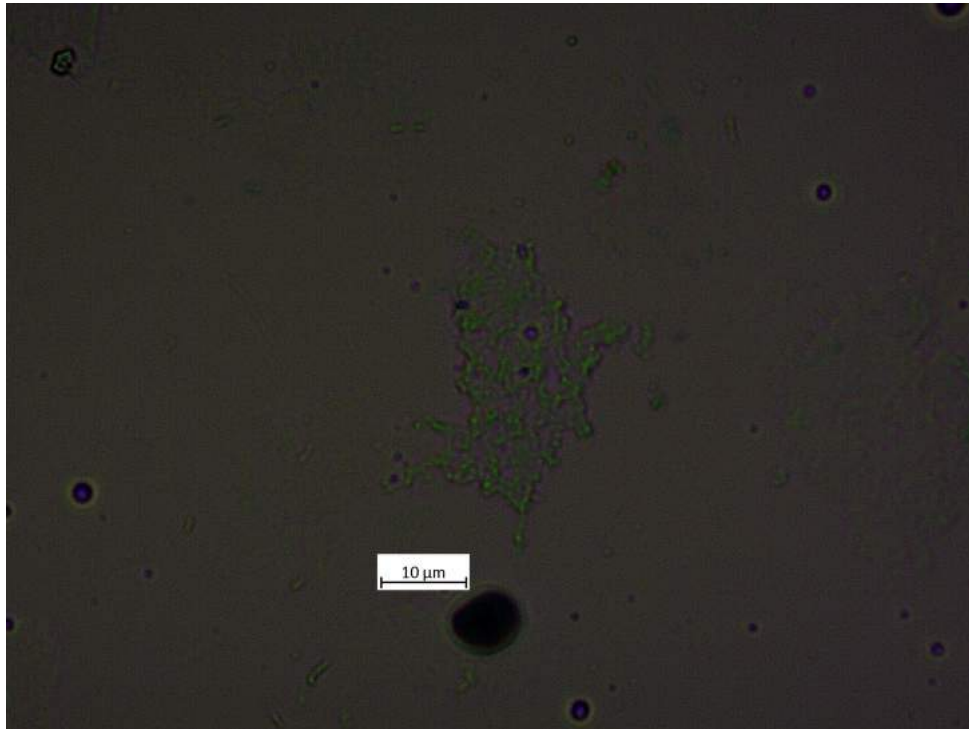


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 10μm

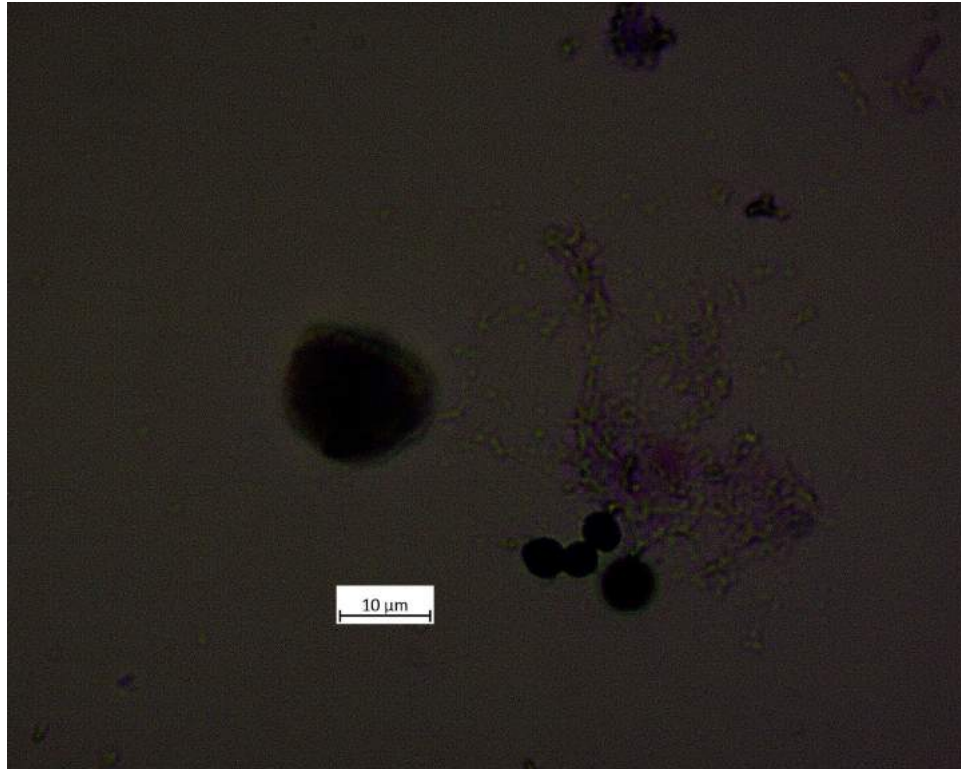


Imagen de una de las laminas resultado del T2 visto a 10μm

Imágenes correspondientes a T3 como puede ser observado en la tabla 3. del Tratamiento con solución colchicina.

Tratamiento con solución colchicina	Tiempo de exposición
T1: tratamiento 30 minutos de incubación.	(tiempo mínimo establecido).
T2: tratamiento 40 minutos de incubación.	10 minutos de exposición.
* T3 : tratamiento 50 minutos de incubación.	20 minutos de exposición.
T4 : tratamiento 60 minutos de incubación.	+ 30 minutos de exposición.
T5 : tratamiento 70 minutos de incubación.	+ 40 minutos de exposición.

Tabla 3: Tabla de Tiempos de Tratamiento (T) de la solución colchicina para la formación de los cromosomas mitóticos, * denotando el tiempo que exposición correspondiente a T3.

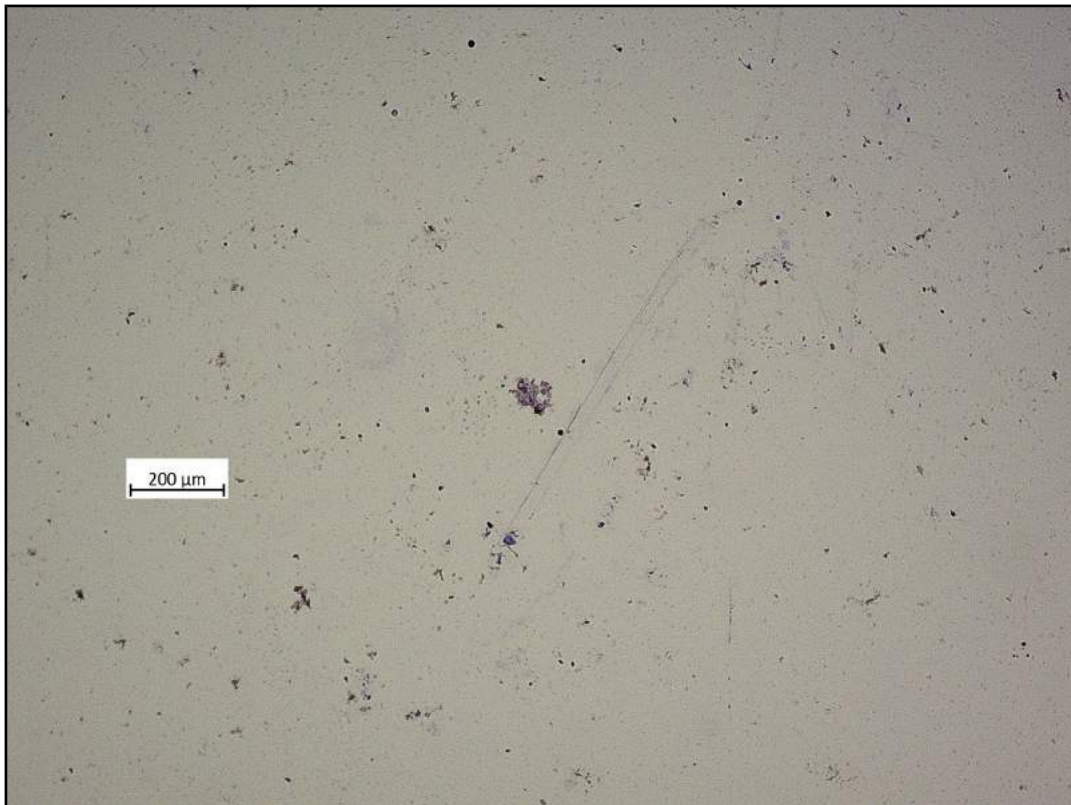


Imagen de una de las laminas resultado del T3 visto a 200μm

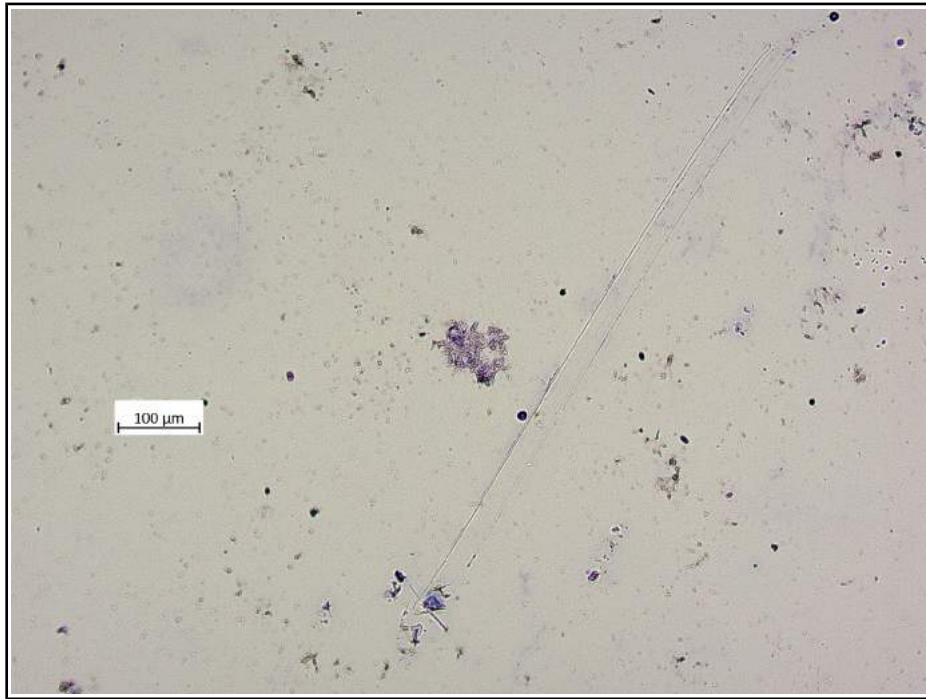


Imagen de una de las laminas resultado del T3 visto a 100 μm.

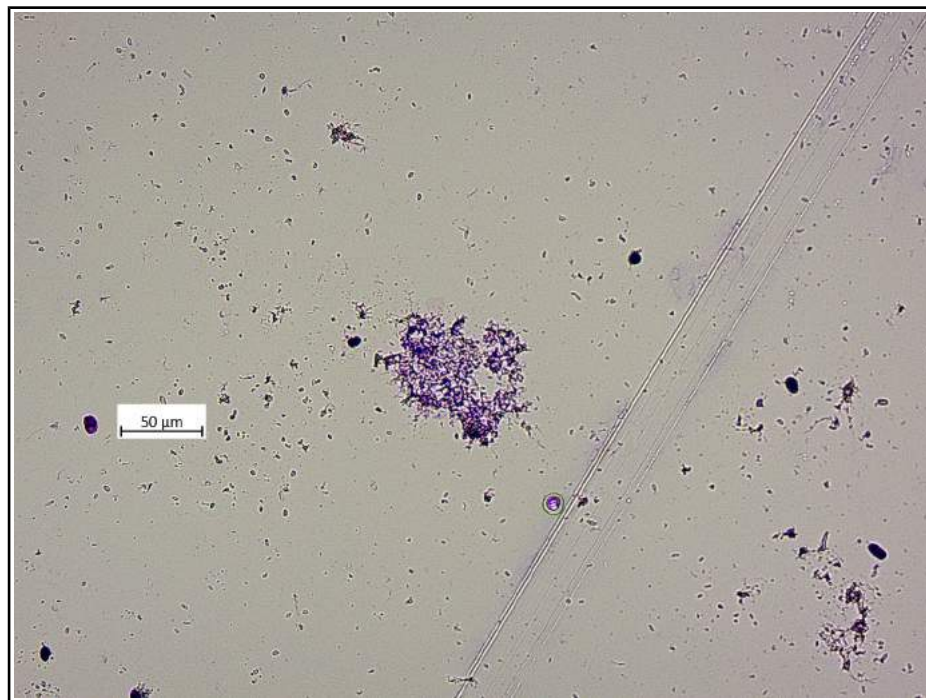


Imagen de una de las laminas resultado del T3 visto a 50 μm.

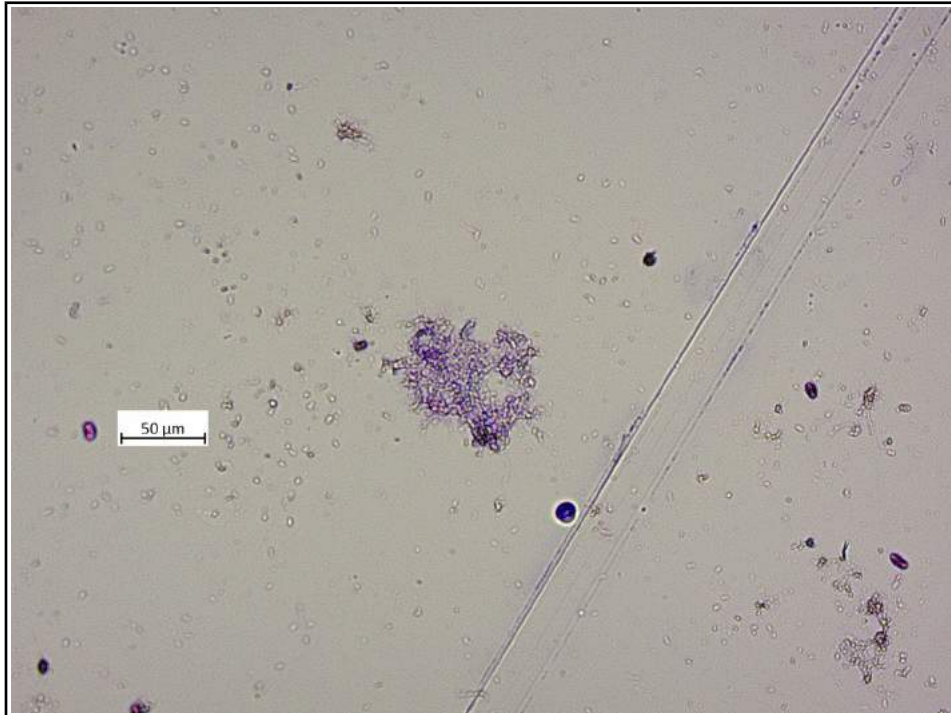


Imagen de una de las laminas resultado del T3 visto a 50μm

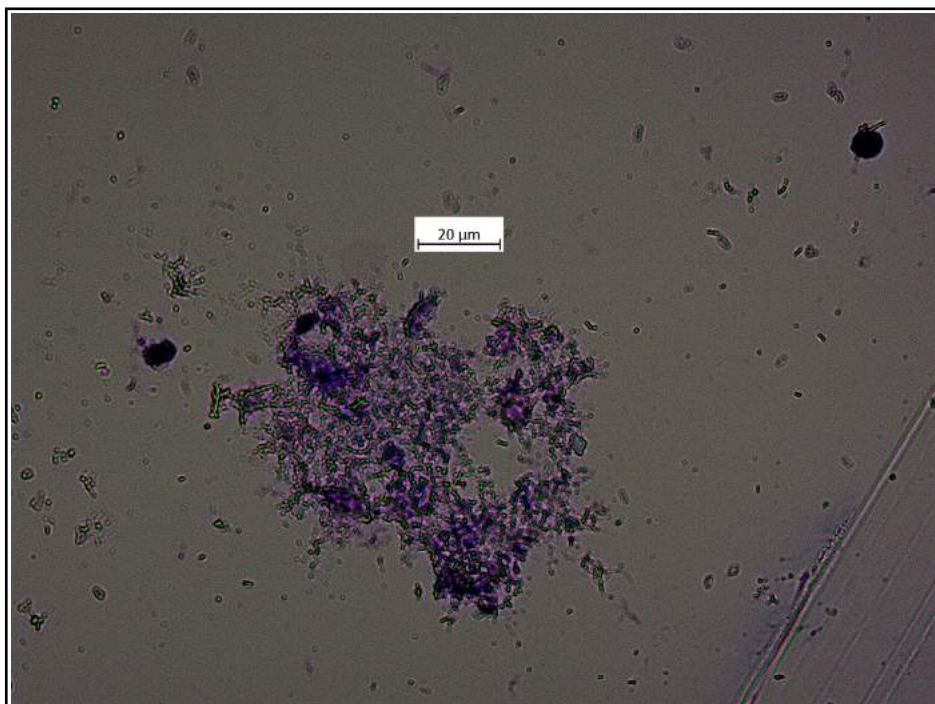


Imagen de una de las laminas resultado del T3 visto a 20μm

Imágenes correspondientes a T4 como puede ser observado en la tabla 4. del Tratamiento con solución colchicina.

Tratamiento con solución colchicina	Tiempo de exposición
T1: tratamiento 30 minutos de incubación.	(tiempo mínimo establecido).
T2: tratamiento 40 minutos de incubación.	10 minutos de exposición.
T3 : tratamiento 50 minutos de incubación.	20 minutos de exposición.
* T4 : tratamiento 60 minutos de incubación.	+ 30 minutos de exposición.
T5 : tratamiento 70 minutos de incubación.	+ 40 minutos de exposición.

Tabla 4: Tabla de Tiempos de Tratamiento (T) de la solución colchicina para la formación de los cromosomas mitóticos, * denotando el tiempo que exposición correspondiente a T4.

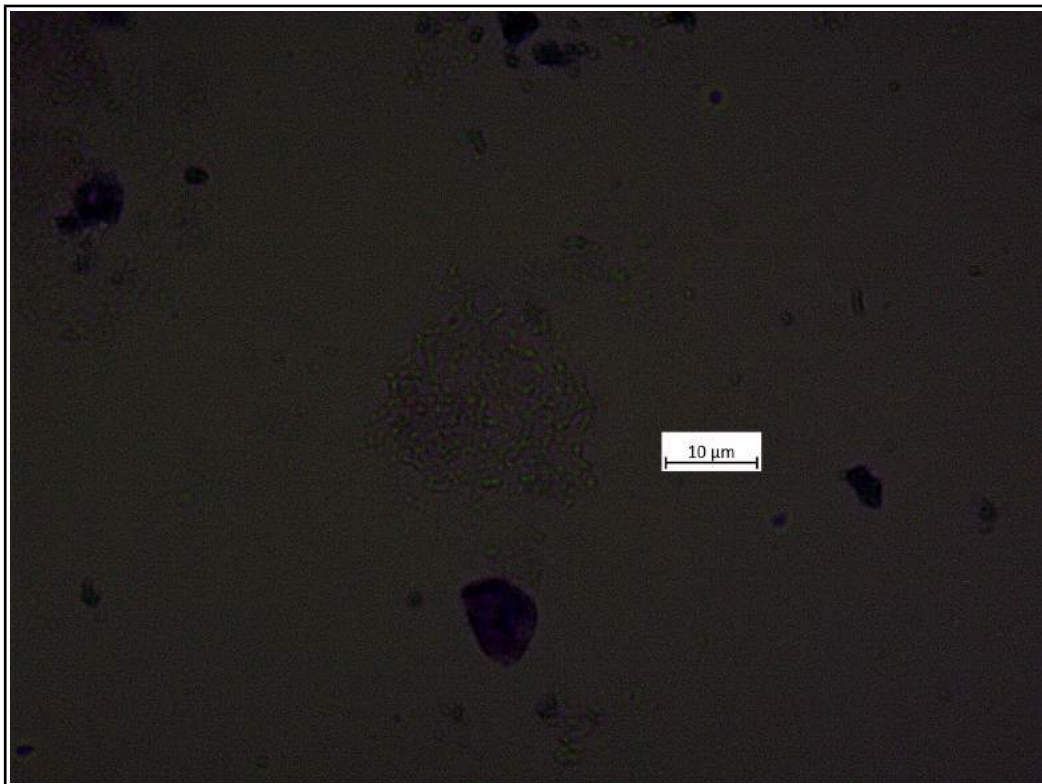


Imagen de una de las laminas resultado del T4 visto a 10µm

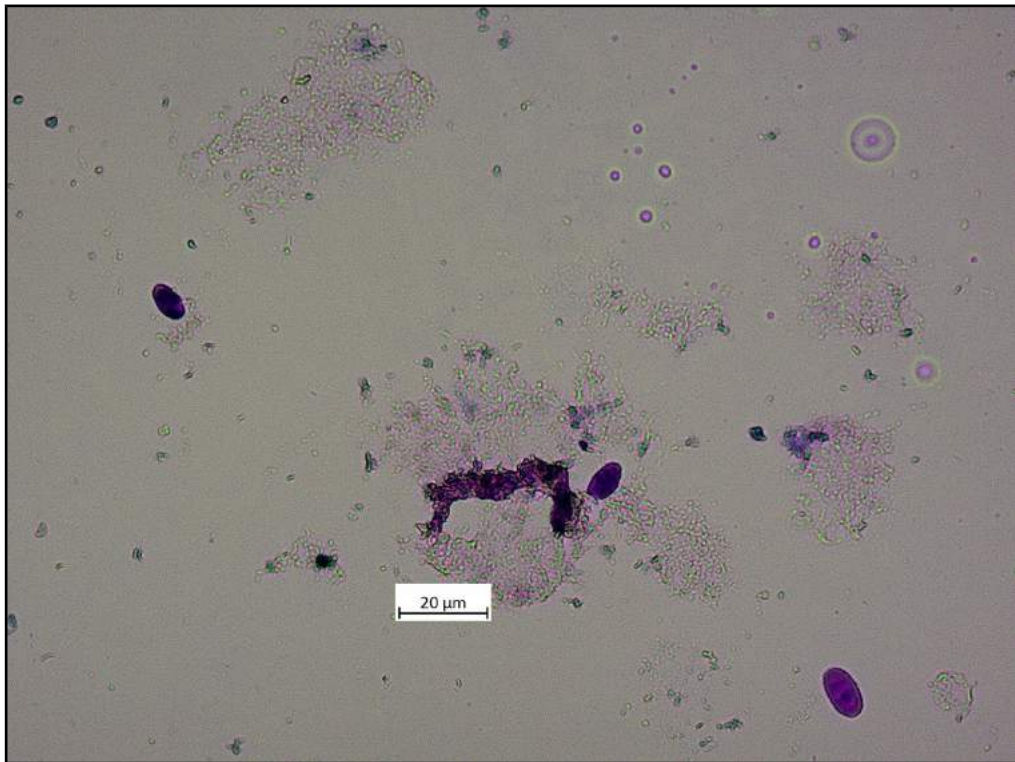


Imagen de una de las laminas resultado del T4 visto a 20 µm

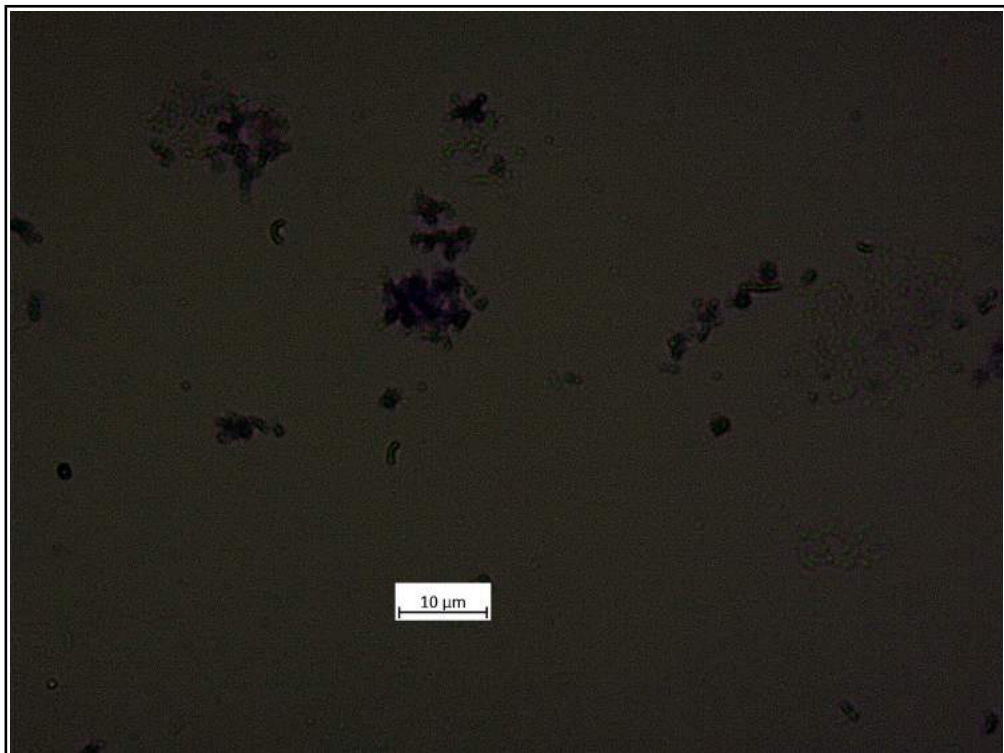


Imagen de una de las laminas resultado del T4 visto a 10 µm