

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**



Transferencia Mitocondrial Artificial de Plaquetas en Osteoartritis: Evaluación In Vitro de su Potencial Terapéutico en Condrocitos Derivados de Pacientes

Nicole Antonia Jeraldo Araya

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

DIRECTORES

Jorge Toledo

Red de Equipamiento Científico
Avanzado (REDECA), Facultad de
Medicina, Universidad de Chile
Centro de Investigación Clínica Avanzado
(CICA), Hospital Clínico Universidad de
Chile (HCUCH)

Patricia Luz-Crawford

Centro de Investigación e Innovación
Biomédica, Universidad de los Andes
Center of Interventional Medicine for Precision
And Advanced Cellular Therapy (IMPACT)

PROFESORA PATROCINANTE

Valentina Parra

Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular, Facultad
de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Advanced Center for Chronic
Diseases (ACCDiS)
Universidad de Chile

Octubre, 2024

Financiamiento

La memoria de título presentada fue realizada en el Centro de Investigación Biomédica (CiiB), Universidad de los Andes, en el Centro de Investigación Clínica Avanzada del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (CICA-HCUCH) y en la Red de Equipamiento Científico Avanzado (REDECA) de la Universidad de Chile. Fue financiada por el proyecto Fondecyt Regular 1211353, con agradecimientos al proyecto FONDEQUIP EQM120032.

Agradecimientos

A mis amigxs, a quienes conocí durante estos años, que además formaron parte muy importante en este proceso, por su apoyo, cariño y contención, a Nachito; gracias por todo, por ser mi compañero siempre, a la Dani; que conozco desde el día 1, a las personas maravillosas que son parte de la carrera y del laboratorio. A Cami y Kev, por ser tan buenos. A estas personas, que sin duda van a brillar donde quiera que estén.

A mi familia, a mis abuelos Nilda y Jorge, por la comida y el hogar. A mis papás, Jessica y John, por su apoyo incondicional. A los que ya son parte de mi vida hace más de 10 años, wantán, muy agradecida que hayan sido parte de este proceso.

A mi directora, la Dra. Patricia Luz. Al laboratorio de Inmunología PLC, gracias por abrirme las puertas, por todo el apoyo, los conocimientos, la amabilidad y el buen humor. Gracias a quienes fueron clave, que me ayudaron en este proceso, a Lili y Jona, por su disposición, sus conocimientos, sus 'tips' y su paciencia, aprendí mucho.

A mi director Jorge Toledo. A todo REDECA, destaco a la Cami (de nuevo), a los oficiales, no-oficiales e internacionales, a quienes estuvieron y forman tan lindo espacio, lleno de una diversidad de gente y de tanto conocimiento, muchas gracias por todo; por la ayuda, el cariño, el ánimo, las risas, por tan buenas experiencias y por dejarme conocer gente tan buena.

A aquellos que mencioné, y a quienes no, agradezco las coincidencias que llevaron a esto.

Índice de contenidos

| | |
|--|-----------|
| Financiamiento | 2 |
| Agradecimientos | 3 |
| Índice de contenidos | 4 |
| Índice de tablas y figuras | 5 |
| Abreviaturas | 6 |
| Resumen | 7 |
| Abstract | 8 |
| Introducción | 9 |
| I.- Osteoartritis: Perspectiva Clínica e Importancia | 9 |
| II.- Cartílago Articular: Ambiente celular | 9 |
| III.- Condrocitos y Matriz extracelular en Osteoartritis | 10 |
| IV. Terapias disponibles y en desarrollo para Osteoartritis | 12 |
| V.- Nuevos Enfoques Terapéuticos: Transferencia Mitocondrial Artificial | 13 |
| VI.- Transferencia Mitocondrial Artificial y Osteoartritis | 16 |
| VII. Transferencia Mitocondrial: Plaquetas como donantes mitocondriales | 16 |
| Hipótesis | 20 |
| Objetivo General | 20 |
| Objetivos Específicos | 20 |
| Metodología | 21 |
| Resultados | 28 |
| Discusión | 47 |
| Conclusiones y Proyecciones | 52 |
| Bibliografía | 53 |
| Anexo | 59 |

Índice de tablas y figuras

| | |
|--|-----------|
| Esquema 1. Mecanismos de Transferencia Mitocondrial..... | 14 |
| Esquema 2. Diseño experimental..... | 21 |
| Tabla 1. Secuencia de partidores para RT-qPCR..... | 25 |
| Figura 1. Internalización de mitocondrias de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA por citometría de flujo..... | 29 |
| Figura 2. Internalización de mitocondrias de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA por microscopía de fluorescencia..... | 32 |
| Figura 3. Análisis de internalización de mitocondrias de plaquetas en condrocitos de pacientes derivados con OA..... | 34 |
| Figura 4. Expresión relativa de genes de condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas..... | 37 |
| Figura 5. Expresión de ACAN en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas..... | 39 |
| Figura 6. Cuantificación de ACAN posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA..... | 40 |
| Figura 7. Expresión de COL2 en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas..... | 41 |
| Figura 8. Cuantificación la expresión de COL2 en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas..... | 42 |
| Figura 9. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial..... | 43 |
| Figura 10. Determinación del potencial de membrana mitocondrial en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas..... | 44 |
| Figura 11. Análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial..... | 46 |

Abreviaturas

ACAN: Agrecano

ADN: Ácido-Desoxirribonucleicos

ADNc: ADN complementario

ARN: Ácidos Ribonucleicos

Ca²⁺: Calcio

CCCP: Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona

CTE: Cadena transportadora de electrones

CMM: Células Madre Mesenquimales

COL1: Colágeno tipo 1

COL2: Colágeno tipo 2

COL10: Colágeno tipo X

EROs: Especies reactivas de oxígeno

FCCP: Carbonil-p-trifluorometoxifenilhidrazona

MEC: Matriz Extracelular

MMP-1: Metaloproteasa 1

MMP-13: Metaloproteasa 13

MTDR: MitoTracker DeepRed

PRP: Plasma Rico en plaquetas

PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial

TM: Transferencia Mitocondrial

TMRM: Tetrametil rodamina éster metílico

TOMM20: Translocasa de la membrana externa mitocondrial

OA: Osteoartritis

OCR: Tasa de consumo de oxígeno

Resumen

La osteoartritis (OA) es una enfermedad articular crónica y progresiva caracterizada por dolor, inflamación y rigidez en el movimiento, cuya incidencia y prevalencia han aumentado significativamente en los últimos años. Esta condición se distingue por la degeneración del cartílago articular, un tejido esencial para el soporte mecánico de la articulación que carece de capacidad regenerativa. Los condrocitos, células responsables de mantener la matriz extracelular (MEC) del cartílago articular, ven comprometida su función mitocondrial y celular en la OA, lo que afecta la integridad del tejido cartilaginoso. Actualmente, no existe una cura para esta enfermedad, y los tratamientos disponibles son mayormente paliativos, lo que ha impulsado la investigación de nuevas terapias que tengan efectos condrogénicos, es decir, que promuevan la síntesis de cartílago por los condrocitos. Una de las estrategias en estudio es la transferencia mitocondrial (TM) artificial, donde mitocondrias de células donadoras se incorporan a células receptoras. Esta técnica ha mostrado ser prometedora en diversas patologías. En la búsqueda de un tipo celular adecuado como donante mitocondrial, las plaquetas emergen como candidatas debido a su metabolismo mitocondrial activo, su abundancia, fácil obtención y evidencia de realizar TM con efectos documentados a nivel celular y mitocondrial. En este contexto, se plantea la hipótesis de que la TM artificial de mitocondrias derivadas de plaquetas hacia condrocitos derivados de pacientes con OA promueve efectos condrogénicos y mejora el metabolismo oxidativo *in vitro*. En este estudio, se demostró que los condrocitos derivados de pacientes con OA son capaces de internalizar mitocondrias aisladas de plaquetas a distintas proporciones. Respecto a los efectos condrogénicos, con la TM artificial se sugieren cambios en la expresión de factores catabólicos como metaloproteasas de matriz, aunque no en los productos estructurales que componen la MEC. De manera interesante, se sugieren cambios en la distribución de agregano. Además, hay una disminución de la citoquina proinflamatoria IL-1 β . No obstante, no se observaron cambios en la función mitocondrial, ya que el potencial de membrana y en la tasa de respiración mitocondrial se mantuvieron estables tras la TM. Estos resultados sugieren que la TM artificial puede inducir efectos condrogénicos y antiinflamatorios en condrocitos de pacientes con OA. Aunque no se observaron cambios en la función mitocondrial, se destaca el potencial de la TM como intervención terapéutica para la OA y otras patologías asociadas con la disfunción mitocondrial.

Abstract

Artificial Mitochondrial Transfer from Platelets in Osteoarthritis: *In vitro* Evaluation of Its Therapeutic Potential in Patient-derived Chondrocytes

Osteoarthritis (OA) is a chronic and progressive joint disease characterized by pain, inflammation, and movement stiffness, with its incidence and prevalence having significantly increased in recent years. One of the hallmarks of OA is the degeneration of the articular cartilage, a crucial tissue for mechanical support in the joint that lacks regenerative capacity. Chondrocytes, the cells responsible for maintaining the extracellular matrix (ECM) of the cartilage, experience compromised mitochondrial and cellular function in OA, affecting the integrity of the cartilage tissue. Currently, there is no cure for this disease, and the available treatments are only palliative. This has driven research into new therapies with chondrogenic effects, that is, therapies that promote cartilage synthesis by chondrocytes. One of the novel strategies under investigation is artificial mitochondrial transfer (MT), where mitochondria from donor cells are incorporated into recipient cells. This approach has shown promising effects in several pathologies. In the search for an appropriate donor cell type for MT, platelets, emerge as candidates due to their active mitochondrial metabolism, abundance, easy accessibility, and evidence of performing MT with documented effects at the cellular and mitochondrial levels. In this context, it is hypothesized that artificial MT from platelets to chondrocytes derived from OA patients promotes chondrogenic effects and enhances oxidative metabolism *in vitro*. In this study, it was demonstrated that chondrocytes derived from OA patients are capable of internalizing mitochondria isolated from platelets at different ratios. Regarding chondrogenic effects, artificial MT suggests changes in the expression of catabolic factors such as matrix proteases, though not in structural ECM products. Interestingly, changes in aggrecan distribution are also suggested. Additionally, there is a decrease in the proinflammatory cytokine IL-1 β . However, no changes in mitochondrial function were observed, as the membrane potential and mitochondrial respiration rate remained stable after MT. These results suggest that artificial MT may induce chondrogenic and anti-inflammatory effects in chondrocytes from OA patients. Although no changes in mitochondrial function were observed, the potential of TM as a therapeutic intervention for OA and other pathologies associated with mitochondrial dysfunction is highlighted.

Introducción

I.- Osteoartritis: Perspectiva Clínica

La osteoartritis (OA), también conocida como artrosis, es una enfermedad degenerativa crónica articular, considerada una de las afecciones musculoesqueléticas más comunes (Steinmetz et al., 2023). Se caracteriza por presentar manifestaciones clínicas como dolor e inflamación crónica, además de rigidez y dificultad en el movimiento de la articulación, principalmente afectando la columna vertebral, las caderas y las rodillas de las personas que la padecen (Giorgino et al., 2023). Actualmente, la OA es una patología progresiva sin cura, y según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), afecta a 250 millones de personas a nivel mundial (Primorac et al., 2020). Esta alta prevalencia ha incrementado su relevancia, convirtiéndola en un foco de interés para el desarrollo de nuevas investigaciones (Primorac et al., 2020).

La etiología de la enfermedad aún no ha sido determinada, sin embargo, se le asocian diversos factores de riesgo, incluyendo predisposición genética, el sexo (principalmente afectando a mujeres), el trauma físico o sobre uso de la articulación, la obesidad, y también el envejecimiento (Giorgino et al., 2023). Este último factor ha tomado gran relevancia, ya que la población principalmente afectada comienza a manifestar síntomas tras los 60 años, e incluso desde los 50 (Giorgino et al., 2023). Es una morbilidad que, aunque no presenta una tasa de mortalidad asociada, determina de manera importante la calidad de vida de las personas que la padecen, pudiendo ser una condición incapacitante en cuanto a movilidad (Giorgino et al., 2023; Primorac et al., 2020).

II.- Cartílago Articular: Ambiente celular

Se entiende por articulación a la estructura anatómica que permite la unión entre componentes esqueléticos. Para el contexto de la OA, se ven afectadas específicamente las articulaciones de tipo sinovial, y los distintos elementos y tejidos que la componen: el hueso, la membrana sinovial y el cartílago articular (Primorac et al., 2020).

El cartílago articular corresponde a un tejido conectivo especializado ubicado en los extremos de los huesos de la articulación, y su función es otorgar resistencia mecánica y una superficie suave, para evitar el roce, permitiendo el movimiento fluido de la articulación. Este tejido es avascular, alinfático y carece de inervación, solo recibe nutrientes a través de

difusión desde el líquido sinovial. El cartílago se compone principalmente de agua, una red de macromoléculas (principalmente proteínas estructurales que forman una compleja matriz extracelular (MEC)) y diversos factores solubles, además de condrocitos (Rim et al., 2020).

En OA, hay rasgos patológicos característicos que afectan la articulación: el remodelamiento óseo, la inflamación de la membrana sinovial (sinovitis) y la degeneración progresiva del cartílago articular (Primorac et al., 2020). Se destaca la degeneración del cartílago articular, lo que a su vez favorece a los demás procesos de remodelamiento e inflamación que se dan en la patología (Singh et al., 2019). Este proceso ocurre progresivamente, y considera cambios en la composición de la articulación a nivel molecular y celular, involucrando la síntesis de componentes que otorgan una mayor rigidez y otros que favorecen la destrucción de la MEC, lo que conlleva a defectos en las propiedades biomecánicas que impiden que el cartílago cumpla su función (Bačenková et al., 2023). Sumado a esto, dadas sus características, es un tejido que cuenta con una baja capacidad regenerativa, por lo que esta degradación promueve el daño progresivo y con ello el avance de la enfermedad (Primorac et al., 2020).

III.- Condrocitos y Matriz extracelular en Osteoartritis

Los condrocitos son células especializadas del cartílago, cuya función es mantener la homeostasis entre los procesos anabólicos y catabólicos que ocurren durante la síntesis y el remodelamiento de la MEC (Bačenková et al., 2023). Esto último comprende la síntesis de proteínas estructurales como colágenos y proteoglicanos, destacando el colágeno tipo II (COL2) y el agrecano (ACAN). Debido a su función: el primero actúa como un elemento estabilizador de la MEC mientras que el segundo tiene la habilidad de atraer iones y moléculas de agua, otorgando tensión, estabilidad, fuerza y resistencia contra la compresión mecánica (Bačenková et al., 2023; Primorac et al., 2020; Singh et al., 2019), las cuales son propiedades biomecánicas fundamentales de soporte del cartílago articular (Bačenková et al., 2023).

En OA, los condrocitos se caracterizan por alteraciones en el fenotipo celular, donde se describen cambios en la función fisiológica secretora y en su metabolismo celular, sumado a una elevada muerte celular debido a un aumento en el estrés oxidativo (Qi et al., 2023; Singh et al., 2019). Las alteraciones en la función secretora se manifiestan como la secreción anormal de productos de MEC, destacando cambios en la síntesis de colágeno:

se favorece la síntesis de colágeno tipo I (COL1) y colágeno tipo X (COL10), ambas proteínas extracelulares que otorgan rigidez estructural (Singh et al., 2019). En paralelo, se favorece la secreción de factores catabólicos de la MEC como metaloproteasas de matriz (MMP), que corresponden a proteasas que degradarán los componentes de la MEC como Metaloproteasas -1 y -13 (MMP-1, -13). A su vez, se favorece la secreción de otros factores como citoquinas proinflamatorias, destacando las Interleuquina 6 y 1 β (IL -6, -1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), que promueven la inflamación del tejido y estimulan el daño a la MEC (Singh et al., 2019).

Por otro lado, cambios en el metabolismo celular y en la función mitocondrial en condrocitos favorecen la OA, favoreciendo la alteración en su función y provocando la elevada muerte celular (Qi et al., 2023). Específicamente, hay evidencia de la alteración de parámetros mitocondriales, como la disminución de tanto el potencial de membrana mitocondrial (PMM) como la respiración mitocondrial, debido a una disminución en la expresión de complejos proteicos de la cadena transportadora de electrones (CTE) (Wu et al., 2023). Esto aumenta la glicólisis basal y la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), lo que promueve el desarrollo de estrés oxidativo, además de cambios en la morfología y dinámica mitocondrial, lo cual ha sido observado tanto en modelos de condrocitos *in vivo* como *in vitro* (Qi et al., 2023; Wu et al., 2023). Por todos estos antecedentes se ha planteado que la disfunción mitocondrial es un importante componente en la patología de la OA, dada la relevancia de este organelo en la mantención de una correcta homeostasis celular, ya que se ha demostrado que estos defectos tienen repercusión sobre la función fisiológica de los condrocitos (Cillero-Pastor et al., 2013; Qi et al., 2023).

La alteración en el fenotipo celular favorece el remodelamiento y daño en la MEC, afectando sus propiedades biomecánicas, promoviendo la formación de fibrocartílago, el daño al cartílago y el progreso de la enfermedad (Singh et al., 2019). A pesar de la comprensión de ciertos mecanismos celulares como la alteración en el metabolismo celular y función mitocondrial, no hay tratamientos disponibles para la OA que estén enfocados en efectos que favorezcan la viabilidad celular y eviten el daño en el cartílago (efectos condroprotectores) o aquellos que favorezcan la expresión de marcadores de condrocitos, la secreción de MEC y por ende la síntesis de cartílago articular (efectos condrogénicos), a pesar de haber sido ambos propuestos como una vía para tratar y/o detener el progreso de la patología (Giorgino et al., 2023; Wu et al., 2023).

IV. Terapias disponibles y en desarrollo para Osteoartritis

A pesar de todo el conocimiento respecto a los mecanismos celulares de la OA, el abordaje terapéutico actual corresponde principalmente a opciones paliativas, que solo alivian la sintomatología de quienes padecen la enfermedad (Li et al., 2023). Como primer enfoque, se suelen recomendar terapias no-farmacológicas que consideran principalmente terapias físicas, que son complementadas generalmente con terapias farmacológicas como analgésicos, antiinflamatorios, inyecciones intraarticulares de ácido hialurónico, entre otras alternativas (Li et al., 2023). En conjunto ambas estrategias ayudan aliviar el dolor, disminuir la inflamación y favorecer la movilidad articular, sin embargo, en estados avanzados de la enfermedad, la reducción de los síntomas no es suficiente, y en estos casos, se suele recomendar el reemplazo total de la articulación, cirugía conocida como artroplastia, que más que un tratamiento se considera una solución permanente, siendo la última opción dadas las consecuencias postoperatorias (Li et al., 2023; Primorac et al., 2020).

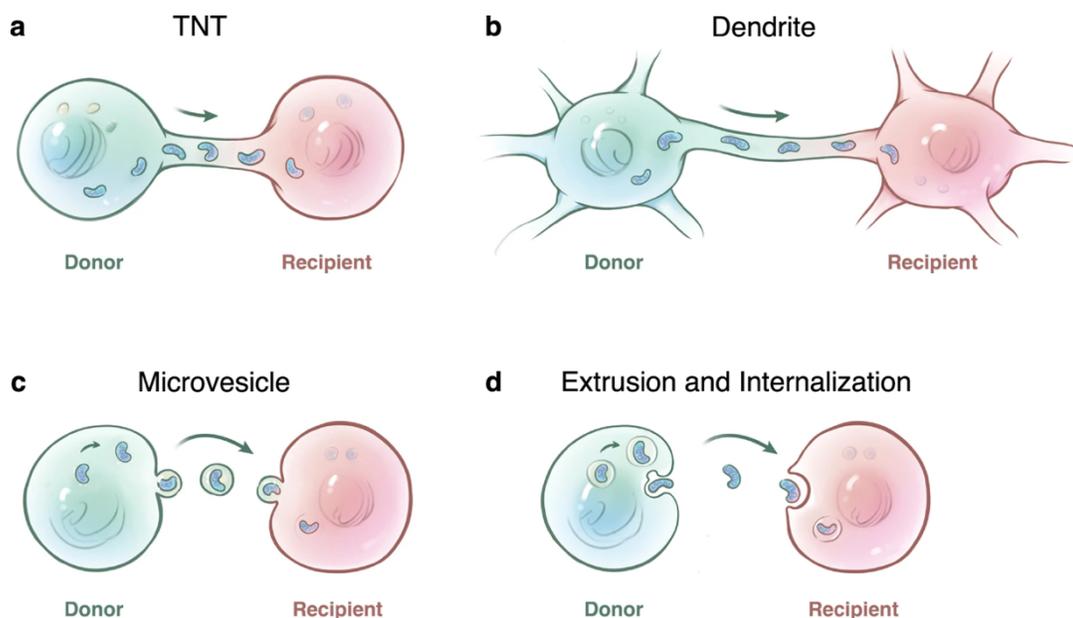
Nuevas terapias buscan potenciar tanto efectos condroprotectores como condrogénicos (Taninaka et al., 2023). Entre estos enfoques, destacan las terapias celulares, como la implantación de condrocitos autólogos (ACI, del inglés *Autologous chondrocyte implantation*), cuyo objetivo es tratar el daño localizado en el cartílago articular y favorecer su regeneración (Li et al., 2023). Otra alternativa en investigación es el uso de células madre mesenquimales (CMM), que poseen capacidades regenerativas gracias a los factores que secretan y a su habilidad para diferenciarse en un linaje condrogénico. Estas células son consideradas agentes terapéuticos prometedores para tratar el dolor, la inflamación y frenar el progreso del daño en la OA (Giorgino et al., 2023).

Sin embargo, la evidencia sobre el éxito de estas terapias es aún controversial, ya que, si bien abordan la sintomatología asociada a la OA, no se ha demostrado que puedan modificar efectivamente el curso de la enfermedad a través de efectos condroprotectores y condrogénicos. Las limitadas pruebas clínicas disponibles hasta ahora concluyen que estas terapias no logran detener el progreso ni ofrecer una cura para la OA, lo que subraya la importancia de continuar explorando nuevas estrategias terapéuticas (Giorgino et al., 2023; Li et al., 2023; Matas et al., 2019).

V.- Nuevos Enfoques Terapéuticos: Transferencia Mitocondrial Artificial

Las mitocondrias son organelos que además de tener un rol en la síntesis de ATP, modulan otros procesos como la señalización de calcio (Ca^{2+}), la generación de EROs, la diferenciación y muerte celular, entre otros (Qi et al., 2023; Zong et al., 2024). Su correcta función es clave para mantener la homeostasis celular, por ende, su disfunción gatilla procesos de señalización que afectan el equilibrio celular, dirigiéndolo a un estado patológico (Zong et al., 2024). Es este rol el que la ha convertido en un blanco de interés, por lo que se encuentran en desarrollo estrategias mitocondriales para el tratamiento de distintas enfermedades.

La transferencia mitocondrial (TM) es un proceso en el cual hay traspaso de mitocondrias desde una célula donadora a otra receptora capaz de incorporar este organelo (Valenti et al., 2021). Las primeras evidencias demostraron que este proceso ocurre espontáneamente a través de nanotúbulos de membrana entre células adyacentes, sin embargo, ya se ha descrito que también se da a través de uniones intercelulares, vesículas extracelulares o la endocitosis libre de este organelo (D'Amato et al., 2023; Rustom et al., 2004). Se le atribuyen una serie de funciones entre las que destaca ser una forma de comunicación celular, siendo descrita en distintos contextos, por ejemplo: comunicación entre astrocitos y neuronas, entre células endoteliales y células del sistema inmune, entre otros procesos (Borcherding & Brestoff, 2023; Valenti et al., 2021) y en condiciones patológicas, en donde favorecería la resistencia a la quimioterapia de las células cancerosas (Borcherding & Brestoff, 2023).



Esquema 1. Mecanismos de transferencia mitocondrial. Se ilustran las rutas de transferencia mitocondrial a partir de una célula donadora a una receptora **(A)** A través de nanotúbulos de membrana. **(B)** A través de dendritas, proyecciones de la membrana que permiten el contacto célula-célula. **(C)** A través de mitocondrias empaquetadas en microvesículas. **(D)** Por medio de la extrusión de mitocondrias libres y su posterior internalización por la célula receptora. Modificado de (Liu et al., 2021).

Dada la importancia de la mitocondria en diversas patologías, se ha propuesto la TM como estrategia para el tratamiento de múltiples enfermedades (Chen & Chen, 2024; Valenti et al., 2021). Esta estrategia, conocida como “Transferencia Mitocondrial Artificial”, incluye protocolos específicos para aislar, concentrar y transferir mitocondrias de diversas fuentes celulares a células receptoras de interés (Caicedo et al., 2015; Valenti et al., 2021).

La TM artificial surge como una alternativa en distintas patologías, debido a su potencial de restaurar la función mitocondrial y por mostrar efectos favorables en la función celular, siendo estudiada tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, utilizando fuentes alogénicas de mitocondrias (Yamada et al., 2020). En modelos celulares *in vitro*, se han reportado cambios tanto en la función mitocondrial (disminución en el PMM, aumento en la fosforilación oxidativa, disminución en la producción de EROs), como también en la proliferación y migración celular en CMM, favoreciendo capacidades regenerativas en fibroblastos dermales y CMM, y una respuesta antiinflamatoria en linfocitos T (Court et al., 2020; Guo et al., 2020; Kim et al., 2022; Levoux et al., 2021). En investigaciones con

modelos *ex vivo* e *in vivo*, se tiene que en un modelo de daño por isquemia-reperfusión pulmonar; se favorece la supervivencia celular y función pulmonar, por otro lado, en un modelo de la enfermedad de Parkinson; se reduce la neurotoxicidad celular (Chang et al., 2016; Cloer et al., 2023). Más aún, ya ha sido evaluado en etapa de ensayo clínico como tratamiento para heridas en un contexto de isquemia y perfusión (Emani et al., 2017). En conclusión, dados los efectos reportados a nivel metabólico y celular es válido plantear la TM artificial como una estrategia a utilizar en un contexto de OA, considerando las alteraciones en el fenotipo celular en los condrocitos para favorecer la síntesis de cartílago articular.

Los mecanismos celulares por los que se dan los efectos de la TM aún se encuentran en estudio. Se ha planteado que las mitocondrias incorporadas promueven la función mitocondrial y la síntesis de ATP (Borcherding & Brestoff, 2023), no obstante, otros autores discuten que este efecto se debe al reemplazo del ADN mitocondrial dañado a causa de condiciones patológicas (D'Amato et al., 2023). Otro de los mecanismos propuestos es que la internalización de las mitocondrias favorece la dinámica mitocondrial, es decir, la fisión, fusión o mitofagia, mediando así los efectos celulares reportados (Lin et al., 2024; Yamada et al., 2020).

En la investigación de la TM artificial, los donantes mitocondriales más utilizados son las células musculares y las CMM. Las células musculares se plantean como donantes mitocondriales debido al rol energético crítico que las mitocondrias desempeñan en ellas. Estas han sido evaluadas en modelos *in vivo*, mostrando resultados favorables en la función cardíaca (McCully et al., 2009; Yamada et al., 2020). Sin embargo, la obtención de estas requiere de un proceso invasivo. Por otro lado, las CMM han sido ampliamente estudiadas debido a sus capacidades regenerativas y se ha demostrado que pueden realizar TM de manera espontánea en distintos contextos lo que las posiciona como donantes mitocondriales de interés, atribuyéndoles los efectos regenerativos a este proceso (D'Amato et al., 2023; Thomas et al., 2022). Dado que la TM artificial es un enfoque relativamente nuevo, es crucial considerar la respuesta inmune en este contexto. Aunque la evidencia disponible, como la reportada en solo un ensayo clínico, indica que no hubo respuesta inflamatoria de rechazo, aún hay poca evidencia al respecto, por lo que el uso de estas aproximaciones continúa siendo un área de investigación activa (Emani et al., 2017; Yamada et al., 2020).

Al ser una propuesta novedosa, la internalización de mitocondrias exógenas aún es controversial, ya que se postula que el efecto va a depender del tipo de célula receptora y del ambiente en el que ocurre este proceso (Zhao et al., 2021). A la vez, la elección del donante mitocondrial debiese ser específica, ya que se han evaluado principalmente tanto CMM y células musculares; sin embargo, su uso puede implicar desventajas como la dificultad de obtención y el cultivo mismo de las células (Bourebaba et al., 2022). Se hace crucial entonces continuar la investigación para maximizar los posibles beneficios terapéuticos y minimizar las complicaciones de este tipo de estrategias.

VI.- Transferencia Mitocondrial Artificial y Osteoartritis

En el contexto de la OA, la investigación sobre la TM ha cobrado relevancia. Dada la implicancia de la disfunción mitocondrial en esta patología, la TM ofrece una nueva estrategia terapéutica dirigida a los condrocitos. Este tipo celular tiene la capacidad de internalizar mitocondrias exógenas, lo que se ha demostrado a través de co-cultivos con células donantes y por la endocitosis de vesículas extracelulares que contienen mitocondrias exógenas en condiciones de estrés, así como la incorporación de mitocondrias libres, utilizando CMM y células musculares como donantes (Fahey et al., 2022; Korpershoek et al., 2022; Lee et al., 2022). Estos enfoques han mostrado efectos prometedores como la mejora en la viabilidad celular, cambios positivos en la función mitocondrial, un aumento en PMM, la disminución en la generación de EROs, la reducción de marcadores catabólicos, y un incremento en la deposición de proteínas de matriz y proteoglicanos, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Korpershoek et al., 2022; Lee et al., 2022; Wang et al., 2020). A pesar de esto, los estudios disponibles aún son limitados, no evalúan persistencia de los efectos en el tiempo y tampoco los cambios sobre el metabolismo celular, además se limitan a los donantes mitocondriales anteriormente mencionados.

VII. Transferencia Mitocondrial: Plaquetas como donantes mitocondriales

Las plaquetas son fragmentos celulares que circulan en la sangre, siendo su rol principal regular la hemostasis, participando en la respuesta aguda a la coagulación, permitiendo la formación de los coágulos sanguíneos, y además participan de la respuesta inmune asociada a la inflamación (Melchinger et al., 2019). Son elementos de tamaño pequeño (2 a 4 μm) que tienen una vida en circulación que ronda entre los 8 a 12 días, y a pesar de

que no poseen núcleo, contienen en su citoplasma distintos componentes subcelulares, destacando algunos organelos como mitocondrias y factores solubles o moléculas biológicamente activas (Melchinger et al., 2019). Las plaquetas son abundantes en el plasma. Sus rangos fisiológicos van desde los 150.000 a los 450.000 de plaquetas por μL de sangre y su función consiste principalmente en la secreción de gránulos con los diversos factores contenidos en su citoplasma, como factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas, aminas bioactivas (como serotonina e histamina) (Melchinger et al., 2019). Considerando su rol en la hemostasis y el sistema inmune, se ha investigado su participación en otros contextos fisiológicos.

Las plaquetas se consideran una opción terapéutica prometedora, especialmente por la facilidad de su obtención de manera mínimamente invasiva a través de venipuntura, la cual además puede ser autóloga (Levoux et al., 2021; Ma et al., 2020). Esto se ha aplicado en la forma de plasma rico en plaquetas (PRP), una fracción de sangre separada por centrifugación que contiene, además de plaquetas, numerosos factores de crecimiento y citoquinas que favorecen procesos celulares como la diferenciación y migración celular, la respuesta inflamatoria y la remodelación de la MEC (Puricelli et al., 2023). El uso de PRP ha sido explorado en medicina regenerativa en diversas áreas, como el cuidado de heridas, tratamientos musculoesqueléticos, oftalmología y medicina estética (Puricelli et al., 2023). En el contexto de la OA, se utilizan inyecciones intraarticulares de PRP que han mostrado efectos analgésicos y antiinflamatorios en pacientes con esta enfermedad (Bansal et al., 2021). Sin embargo, los estudios aún son limitados y no se han observado mejoras significativas en la recuperación del volumen del cartílago en comparación con el grupo placebo (Bansal et al., 2021; Li et al., 2023).

Dado el potencial terapéutico de las plaquetas en medicina regenerativa, se han propuesto como posibles donantes de mitocondrias. A pesar de que estos elementos sanguíneos contienen un número limitado de estos organelos (aproximadamente entre 5 y 8), estas son funcionales y metabólicamente activas (Jin et al., 2023; Levoux et al., 2021). Las mitocondrias en las plaquetas son responsables de dirigir procesos celulares esenciales, como la generación de energía y la producción de EROs, que están asociadas, por ejemplo, con la activación plaquetaria (Ding et al., 2023; Garcia-Souza & Oliveira, 2014).

Las plaquetas tienen la capacidad de realizar la TM de forma espontánea, liberando mitocondrias ya sea como organelos libres o envueltos en vesículas (Boudreau et al., 2014). Debido a esta capacidad, se les considera una fuente significativa de mitocondrias competentes circulantes con capacidad respiratoria en el plasma sanguíneo (Al Amir Dache et al., 2020). En un modelo celular de cáncer de mama, se ha demostrado que la incorporación de mitocondrias derivadas de plaquetas mejora la respiración mitocondrial, aumenta la síntesis de ATP y favorece la proliferación celular (Cereceda et al., 2024). Por otro lado, en estudios con neutrófilos, la adquisición de mitocondrias libres no afectaría la respiración mitocondrial, pero sí el flujo de Ca^{2+} y la liberación de vesículas intracelulares (Léger et al., 2022). Por ende, las mitocondrias de plaquetas tendrían tanto efectos metabólicos como funcionales, sobre las células receptoras.

Asimismo, se ha evaluado la opción de plaquetas y el uso de sus mitocondrias en la TM artificial en distintas patologías en modelos *in vitro* e *in vivo*. En modelos *in vitro* de CMM, fibroblastos dermales y células endoteliales se ha demostrado que las mitocondrias derivadas de plaquetas favorecen sus capacidades regenerativas, teniendo efectos sobre la bioenergética de la célula receptora, tales como un aumento en la respiración basal y una disminución en la síntesis de EROs (Jin et al., 2023; Kim et al., 2022; Levoux et al., 2021). En otro modelo celular, en la línea celular de neuroblastoma SH-SY5Y, se ha demostrado neuroprotección en cuanto a daño causado por hipoxia/reoxigenación que ocurre en un contexto de daño por isquemia-reperfusión, protegiendo de la disfunción mitocondrial y favoreciendo la viabilidad celular (Shi et al., 2021).

A su vez, en modelos *in vivo* de conejo, hay evidencias que el uso de mitocondrias derivadas de plaquetas otorga cardioprotección y favorece la función cardíaca en un contexto de isquemia-reperfusión (Masuzawa et al., 2013). Más aún, en un contexto de diabetes (ratones homocigotos *db/db*), la inyección intra-cerebroventricular de mitocondrias se ha demostrado que atenúa el deterioro cognitivo con efectos directamente sobre la función mitocondrial en las células con el tratamiento (Ma et al., 2020).

La TM artificial utilizando a las plaquetas como donantes mitocondriales, es una alternativa que ha demostrado efectos beneficiosos en distintos modelos a nivel mitocondrial, como en la disminución de EROs y favoreciendo la respiración mitocondrial con efectos también sobre la función celular, además cuenta con ventajas como: su abundancia, facilidad de

obtención y la posibilidad de ser una terapia autóloga (Levoux et al., 2021; Ma et al., 2020; Masuzawa et al., 2013). Dado que la disfunción mitocondrial es uno de los principales desencadenantes de la degeneración del cartílago articular, la TM surge como una estrategia prometedora para restaurar la función mitocondrial y, en consecuencia, la función celular, protegiendo así la articulación. En este contexto, es crucial seleccionar células donantes que ofrezcan una alta viabilidad para futuras aplicaciones clínicas, como las plaquetas. Por ello, en este proyecto se propone evaluar si las mitocondrias derivadas de plaquetas pueden promover efectos condrogénicos mediante la mejora del metabolismo de condrocitos derivados de pacientes con OA, con el objetivo de avanzar en el desarrollo de tratamientos que detengan el progreso de la enfermedad.

Hipótesis

La transferencia artificial de mitocondrias derivadas de plaquetas promueve efectos condrogénicos y un aumento del metabolismo oxidativo *in vitro* en condrocitos de pacientes con OA.

Objetivo General

Evaluar el efecto de la transferencia artificial de mitocondrias derivadas de plaquetas sobre el metabolismo y el efecto condrogénico en condrocitos derivados de pacientes con OA.

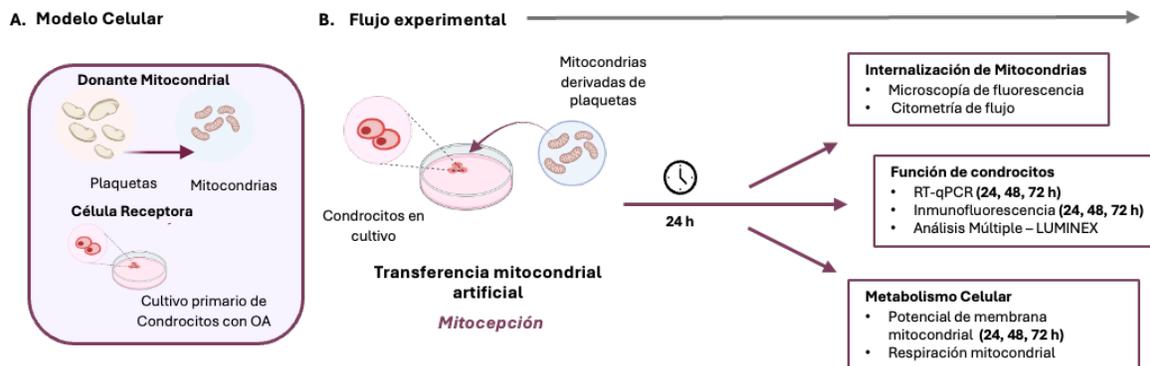
Objetivos Específicos

OE1. Determinar la eficiencia de la transferencia artificial de mitocondrias de plaquetas a condrocitos de pacientes con OA *in vitro*.

OE2. Evaluar el efecto funcional condrogénico de la transferencia artificial de mitocondrias de plaquetas en condrocitos de pacientes con OA.

OE3. Evaluar el efecto de la transferencia artificial de mitocondrias de plaquetas sobre el metabolismo celular en condrocitos de pacientes con OA.

Metodología



Esquema 2. Diseño Experimental. (A) Las donantes mitocondriales corresponden a plaquetas aisladas de donantes sanos a partir de las cuales se obtuvieron las mitocondrias y como células receptoras se tienen cultivos primarios de condrocitos derivados de pacientes con OA (B) A partir del protocolo de TM artificial (Mitocepción) se realizaron los distintos experimentos para analizar la internalización de mitocondrias, función de condrocitos y metabolismo celular.

Obtención y cultivo de Condrocitos humanos

Los condrocitos humanos fueron obtenidos a partir de muestras de cartílago articular de pacientes sometidos a artroplastia de rodilla con diagnóstico de osteoartritis en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH). Las muestras de cartílago fueron cortadas en pequeños trozos y sometidas a digestiones sucesivas con pronasa (Merck, Cat. #P5147) durante 1 h a 37° y luego con colagenasa II (Sigma-Aldrich, Cat. #C6885) durante 16 h a 37°C en agitación constante. Posteriormente, se centrifugó la muestra digerida, para resuspender en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) (Capricorn Scientific). Finalmente, se filtró (filtro de 40 μm) y se procedió con el conteo de las células para sembrar una densidad de 30.000 células/cm².

Los condrocitos humanos se cultivaron en medio modificado DMEM alto en glucosa, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco, inactivado por temperatura), 1% penicilina/estreptomina (p/s) (Gibco), 1% L-glutamina (Gibco) y 1% piruvato de sodio (Gibco), en incubadora a 37°C y 5% CO₂. Se utilizaron en pasajes 1-2.

Obtención de plaquetas

Las plaquetas se obtuvieron a partir de donantes voluntarios entre 18 a 30 años, según el protocolo de bioética aprobado por la Universidad de los Andes, código cec2021031. El

aislamiento de plaquetas se realizó en un rango máximo de 30 minutos una vez extraída la muestra. Se extrajo sangre periférica utilizando agujas de 21g (BD Vacutainer®, 367287) y recolectándola en tubos con anticoagulante Citrato (BD Vacutainer®, 363083), considerando los primeros 2 mL de sangre como descarte. La sangre total se centrifugó a 200 g durante 10 minutos. Luego se separó el plasma de la fracción de elementos figurados y se centrifugó a 1200 g durante 8 minutos, el sobrenadante fue descartado, y el pellet resuspendido en Buffer Tyrode modificado (NaCl 124 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, Glucosa 30 mM, HEPES 20 mM, pH ajustado 7.4) y Citrato de sodio-dextrosa (ACD, del inglés *acid citrate-dextrose*) (Sigma-Aldrich, C3821). Se centrifugó una última vez para eliminar los remanentes de plasma a 1200 g durante 8 minutos y se resuspendieron las plaquetas en Buffer Tyrode (Spurgeon et al., 2021).

El enriquecimiento de plaquetas se evaluó por citometría de flujo utilizando el equipo Cytex® Aurora con el anticuerpo para la proteína de superficie Integrina β 3 (GPIIIA / CD61) anti-CD61-FITC (Clon VI-PL2) (BD Pharmingen TM, 555753). Además, una vez estandarizada la identificación de la población de plaquetas, se realizó el conteo de plaquetas en el mismo equipo para cada experimento correspondiente, obteniendo el número de plaquetas por microlitro.

Para los ensayos de internalización de mitocondrias se realizó el marcaje de las mitocondrias derivadas de plaquetas. Para esto, se incubaron las plaquetas en Buffer Tyrode con la sonda MitoTracker DeepRed (MTDR) (ThermoFisher, cat #M22426) a una concentración de 300 nM durante 45 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente.

Aislamiento de mitocondrias derivadas de plaquetas

Las mitocondrias derivadas de plaquetas se aislaron utilizando el Kit de aislamiento de mitocondrias para células en cultivo (ThermoFisher, cat #89874) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Una vez que se obtuvieron las plaquetas en Buffer Tyrode, se centrifugaron a 1200 g durante 8 minutos, se descartó el sobrenadante, y se añadieron 800 μ L de Reactivo A, se dejó en hielo durante 2 minutos y se agregaron 10 μ L del Reactivo B. Se mezcló la solución en Vortéx durante 5 segundos y luego se dejó en hielo durante 5 minutos. Por cada minuto que la solución pasó en hielo se mezcló en vortéx durante 5 segundos. Luego se añadieron 800 μ L de reactivo C y se centrifugó a 700 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se centrifugó a 3000 g durante 15 minutos a 4°C. Al pellet

se le añadieron 500 μ L del reactivo C y se llevó a centrifugación a 12,000 g por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de mitocondrias se resuspendió en medio DMEM suplementado.

Mitocepción

Para realizar la TM artificial se realizó el protocolo de Mitocepción (Caicedo et al., 2015). En breve, los aislados de mitocondrias obtenidos de plaquetas se añadieron al cultivo de condrocitos humanos, luego, las células se centrifugaron a 1500 g durante 15 minutos a 4°C. La incorporación de las mitocondrias y otros ensayos funcionales se evaluaron luego de 24 h.

Para determinar la proporción de incorporación de mitocondrias, se agregaron mitocondrias derivadas de plaquetas a condrocitos humanos con OA en cultivo en diferentes proporciones: 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100. Estas proporciones se definen como la relación entre cada célula receptora (condrocitos) y la cantidad de células donadoras a partir de las cuales se aislaron las mitocondrias (plaquetas). La proporción utilizada para trabajar fue definida luego de ensayos de internalización.

Internalización de Mitocondrias por Citometría de flujo

Para evaluar la incorporación de las mitocondrias en condrocitos con OA, las células se soltaron de las placas utilizando TrypLE™ (ThermoFisher, 12604054) y se prepararon para citometría de flujo. De acuerdo con las condiciones:

1. Controles:

- a. Auto fluorescencia: Condrocitos sin sondas;
- b. Mitocondrias: Condrocitos con la marca de mitocondrias de plaquetas de MTDR (ThermoFisher, cat #M22426),
- c. Sonda de viabilidad: Condrocitos con la sonda de viabilidad LIVE/DEAD Near IR (ThermoFisher, #L34975).

2. **Grupos experimentales:** Condrocitos derivados de pacientes con OA con distintas proporciones de mitocondrias de plaquetas (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100) con sonda de viabilidad. Para esto, las células se incubaron con la sonda de viabilidad (concentración final 1:2000) en Buffer FACS (2% FBS en PBS 1X pH ajustado) durante 15 minutos a 4°C en oscuridad, luego se centrifugaron a 400 g durante 5 minutos, se resuspendieron en 100 μ L de PBS 1X y se traspasaron a

tubos para citometría de flujo. Se realizó el análisis con el citómetro de flujo BD FACS CANTO II (BD Pharmingen). Para el análisis de los datos se utilizó el software FlowJo VX.

Internalización de Mitocondrias por Microscopía de fluorescencia

Para evaluar la incorporación de mitocondrias obtenidas de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA, las células se sembraron previamente en placas de 24 pocillos con cubreobjetos a una confluencia del 80% y se realizó el protocolo de mitocepción considerando las proporciones 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50, 1:100 con mitocondrias teñidas con MTDR. Posterior a las 24 horas, las células se lavaron con PBS 1X tibio y se fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) 4% y sacarosa al 4% durante 15 minutos. Se realizó la permeabilización con Triton X100 0,1% durante 30 minutos y el bloqueo con solución de BSA 3% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron las células con anticuerpo primario contra la translocasa de la membrana externa mitocondrial (TOM20) (Novus NBP2-67501, 1:400) durante 16 horas a 4°C. Finalmente, se incubó con anticuerpo secundario anti-rabbit-FITC (#711-095-152, Jackson ImmunoResearch, 1:300) durante 1 hora a temperatura ambiente, y luego con DAPI (Sigma, D9542, 1:2000) durante 15 minutos en oscuridad. Se realizó el montaje en los portaobjetos con DAKO *fluorescence mounting medium* (Agilent, S3023). Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal Olympus FV1000.

Determinación de la síntesis de Matriz Extracelular por Inmunofluorescencia

Para evaluar la síntesis de componentes de MEC, específicamente COL2 y ACAN, se sembraron condrocitos en placas de 24 pocillos con cubreobjetos a una confluencia del 80% y se realizó el protocolo de mitocepción: 1:0 (Control, sin mitocondrias) y 1:100. Posterior a 24, 48 y 72 h, las células se fijaron con PFA 4%, y se realizó el bloqueo con solución de inmunofluorescencia (0,25% BSA en PBS 1X) con 10% FBS. Se incubaron las células con los anticuerpos primarios: anti-Agrecano (abcam, ab3778, 1:100) y Anti-Colágeno II (abcam, ab34712, 1:100) durante 16 horas a 4°C. Se realizaron lavados con la solución de inmunofluorescencia, y se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-rabbit-FITC, (Jackson ImmunoResearch, #711-095-152, 1:300) y anti-mouse-Alexa 647 (Jackson ImmunoResearch, #115-605-003, 1:200) durante 1 h a temperatura ambiente. Finalmente, se incubó con DAPI (1:2000) durante 15 minutos en oscuridad, y se realizó el

montaje en los portaobjetos con DAKO *fluorescence mounting medium* (Agilent, S3023). Las imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal Olympus FV1000.

RT-qPCR

Para determinar la expresión de genes asociados al potencial condrogénico de los condrocitos posterior a la transferencia mitocondrial (24, 48 y 72 h) se realizó la extracción de ARN total con TRIzol (Invitrogen, #15596026) de acuerdo con las instrucciones del proveedor y se cuantificó la cantidad de ARN y la razón de Absorbancia_{260/280} con el equipo Nanodrop™ One (ThermoFisher). Se realizó la síntesis de ADNc utilizando el Kit iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio Rad, #1708841) a partir de 1 µg de ARN, utilizando el termociclador convencional Axygen. Para el RT-qPCR se utilizó 2x Brilliant II SYBR^(R) Green QPCR Master Mix (Agilent, #600828-5), y partidores a una concentración de 10 µM por muestra. Se utilizó el equipo AriaMX Real Time PCR. El programa de temperatura utilizado fue: 10 minutos a 95°C (*Hot Start*), 15 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C y 15 segundos a 72°C (Amplificación, 40 ciclos), y 1 minuto a 95°C, segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C (*Melt*). Los genes evaluados corresponden a: *acan*, *col2a1*, *col1a1*, *col10a1*, *mmp1*, *mmp13*. El gen *housekeeping* utilizado para normalizar los niveles de ARNm corresponde a *18s*. La cuantificación y expresión de los resultados se realizó en base al método $2^{-\Delta Ct}$.

| Gen | Secuencia Sentido | Secuencia Antisentido |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>hcol2a1</i> | TCC AAT GAC GTG GAG ATC C | CTT ACC GGT ATG TTT CGT GC |
| <i>hacan</i> | ATC ACC CTC TGG TGT GGA GGA | GGC CAA GTA GGA AGG ATC CCT G |
| <i>hcol10a1</i> | CAT AAA AGG CCC ACT ACC CAA CA | ACC TTG CTC TCC TCT TAC TGC |
| <i>hmmp1</i> | TGA AGA TGA AAG GTG GAC CAA | AAC GTC CAT ATA TGG CTT GGA T |
| <i>hcol1a1</i> | CCT GGA TGC CAT CAA AGT CT | CGC CAT ACT CGA ACT GGA AT |
| <i>hmmp13</i> | TAA GGA GCA TGG CGA CTT CT | GTC TGG CGT TTT TGG ATG TT |
| <i>18s</i> | CCC TGC CCT TTG TAC ACA CC | CGA TCC GAG GGC CTC ACT A |

Tabla 1. Secuencias de los partidores sentido y antisentido de los genes utilizados para RT-qPCR en condrocitos derivados de pacientes con OA.

Determinación del Potencial de Membrana Mitocondrial

Para evaluar el potencial de membrana mitocondrial se sembraron condrocitos derivados de pacientes con OA y se utilizó el Kit de citometría de flujo MitoProbe™ TMRM (Invitrogen,

M20036) a las 24, 48 y 72 h posterior a la mitocepción. Se incubaron las células con el compuesto tetrametil rodamina metil éster (TMRM) a una concentración de 10 nM durante 30 minutos a 37°C. Como control negativo se utilizó el compuesto Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP). Se evaluó la intensidad de fluorescencia usando el citómetro Cytex® Aurora.

1. Controles:

- a. Autofluorescencia: condrocitos sin tinción;
- b. TMRM: Condrocitos solo con la sonda TMRM;
- c. Sonda de viabilidad: Condrocitos solo con la sonda de viabilidad LIVE/DEAD NEAR IR.

2. Grupos experimentales:

- a. Condrocitos derivados de pacientes con OA sin y con TM artificial (proporción 1:100) con sonda de viabilidad y TMRM posterior a 24, 48 y 72 h.
- b. Condrocitos derivados de pacientes con OA sin y con TM artificial (proporción 1:100) con sonda de viabilidad y TMRM y CCCP posterior a 24, 48 y 72 h. Para esto se incubó con CCCP durante 5 minutos previo a la medición en el citómetro.

Análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OCR)

Se determinó el OCR de los condrocitos derivados de pacientes con OA en cultivo con la TM artificial de plaquetas (proporción 1:100). Para esto, se sembraron en una placa de 96 pocillos, 20.000 células por pocillo. Las células se mantuvieron en DMEM suplementado (10% FBS, 1% p/s, 1% L-glutamina y 1% piruvato de sodio). Una hora previa al ensayo, se reemplazó el medio de las células por medio IMDM sin rojo fenol (Gibco) pH 7.4. Se realizó el ensayo para Mito-estrés, utilizando los inhibidores de la respiración mitocondrial: 2 μ M Oligomicina (Inyección 1), 2,5 μ M FCCP (Inyección 2), 0,5 μ M Rotenona/Antimicina A (Inyección 3). El protocolo constó de 4 períodos de medición, cada uno con una duración de 18 minutos y 3 ciclos de medición. Las mediciones se realizaron en un analizador de flujo extracelular XFe96 (Seahorse Bioscience). La normalización se realizó en base al número de células por pocillo, por medio de fotografías tomadas previo al ensayo en el equipo Cytation 5. El número de células se determinó utilizando el software Ilastik Versión 1.3.3 para la segmentación del área celular y el software Fiji/Image J Versión 2.9.0 para la cuantificación del área celular.

Cuantificación de citoquinas por LUMINEX®

Se llevó a cabo un ensayo para la cuantificación de citoquinas utilizando los sobrenadantes del cultivo de condrocitos derivados de pacientes posterior 24 h de la mitocepción con una proporción de 1:100, utilizando como control el sobrenadante de condrocitos sin adición de mitocondrias. Para esto se utilizó el kit Human Luminex® (#LXSAHM, R&D Systems) para la determinación simultánea de las siguientes citoquinas y quimioquinas: CCL2, IL-1 β , IL-6, IL-10, Osteopontina (OPN), CCL-5, IL-1ra, IL-8, MMP-7, TNF- α . Se preparó una curva de estándar para cada analito, los sobrenadantes se diluyeron (1:2) de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Las lecturas se realizaron con el Equipo MAGPIX® (LUMINEX®) utilizando el software xPONENT 4.2. Los datos se determinaron utilizando la estandarización previa por medio del programa Milliplex Analyst. El análisis se realizó utilizando el software GraphPad Prism V8.

Análisis Estadístico

Los resultados se expresaron como promedio \pm desviación estándar (SD, del inglés *Standard deviation*). Se identificaron los valores atípicos con el método ROUT (*Robust outlier testing*) con GraphPad Prism. Para comparaciones entre 2 grupos, se realizaron las pruebas para determinar la normalidad de la distribución de los datos. Para aquellos que presentan una distribución normal, se realizó la prueba estadística *T-student* para datos pareados. Para aquellos que no presentan una distribución normal, se realizó la prueba *Wilcoxon* para datos pareados. Para el análisis de grupos de datos entre dos condiciones que no presentan una distribución normal, se llevó a cabo la prueba de *Mann-Whitney U* para datos no pareados. El análisis de los datos se realizó en el software GraphPad Prism V8.

Bioética

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad de los Andes (cec2021031). Se obtuvieron consentimientos informados de cada paciente y donador de sangre voluntario.

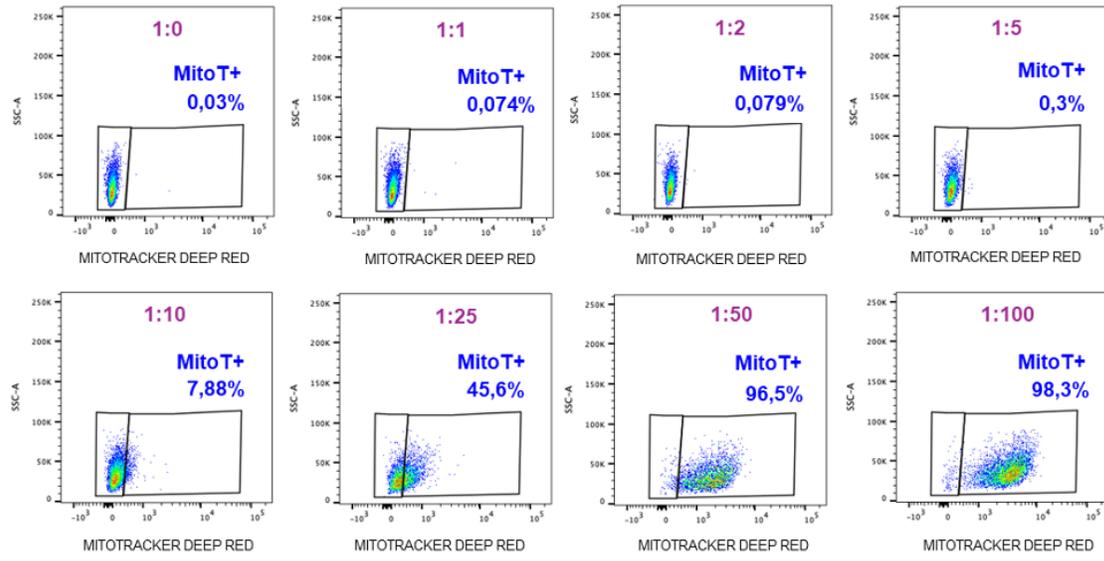
Resultados

La internalización de Mitocondrias derivadas de plaquetas en Condrocitos con OA es proporción dependiente

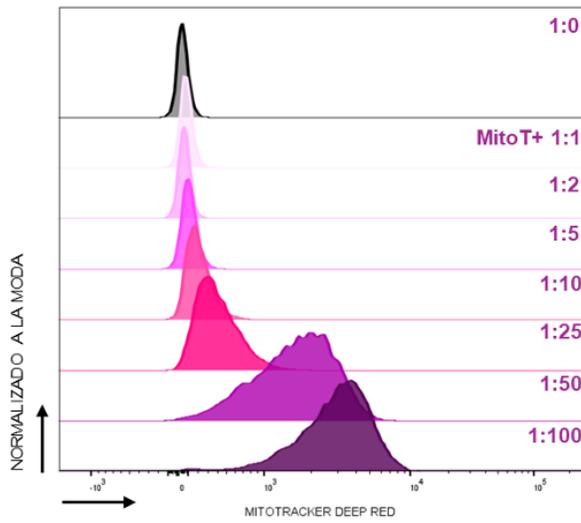
Se ha demostrado que los condrocitos son capaces de internalizar mitocondrias exógenas, ocurriendo este proceso por medio de co-cultivos o la administración directa de mitocondrias (Fahey et al., 2022; Korpershoek et al., 2022; Lee et al., 2022). De acuerdo a lo reportado, no se han utilizado otros donantes mitocondriales además de CMM y células musculares en condrocitos y resultados preliminares a este estudio demostraron que condrocitos de pacientes con OA son capaces de internalizar mitocondrias aisladas de plaquetas en cultivo por medio del protocolo de mitocepción descrito por Caicedo y cols (Caicedo et al., 2015) (Anexo 1), sin embargo, aún se desconoce la eficiencia en la internalización de las mitocondrias de plaquetas en condrocitos.

Para evaluar la capacidad de internalizar mitocondrias derivadas de plaquetas en condrocitos con OA, se determinó que efectivamente se estaban aislando plaquetas (Anexo 2) y se trabajó con distintas proporciones para la mitocepción, definiéndose estas cómo: por cada célula receptora (condrocitos con OA), las mitocondrias de un número de células donadoras (plaquetas). Para considerar un rango amplio de la respuesta se eligieron las siguientes proporciones: 1:1 (por cada condrocito, las mitocondrias de 1 plaqueta), 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100. Se realizó la TM artificial a condrocitos con OA en cultivo utilizando mitocondrias aisladas de plaquetas, previamente teñidas con MTDR, y se evaluó la población de condrocitos que adoptaron mitocondrias (MitoT+) posterior a 24 h de la mitocepción (Anexo 3). En cada proporción de mitocondrias de plaquetas añadidas, se observa que la respuesta es proporción-dependiente con una mayor población de condrocitos MitoT+ cuando la proporción de mitocondrias del donador aumenta (Fig. 1A, C). Además, hay un aumento en la cantidad de mitocondrias incorporadas, de acuerdo con los cambios de intensidad de la fluorescencia de la sonda sobre las poblaciones MitoT+ (Fig. 1B), observándose en la proporción 1:50 y 1:100 una incorporación cercana al 100%. Sin embargo, se puede observar que hay también una incorporación paciente-dependiente, lo anterior se puede observar en la Fig. 1C, en donde el paciente (triángulo) no responde al utilizar las proporciones 1:50 y 1:100. No se determinaron efectos sobre la viabilidad celular al aumentar las proporciones de mitocondrias a incorporar, siendo la variación en estos paciente-dependiente (Fig. 1D).

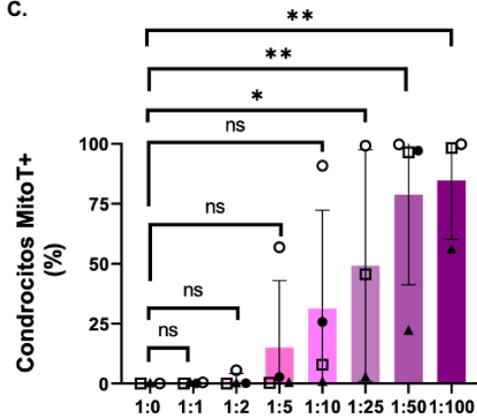
A.



B.



C.



D.

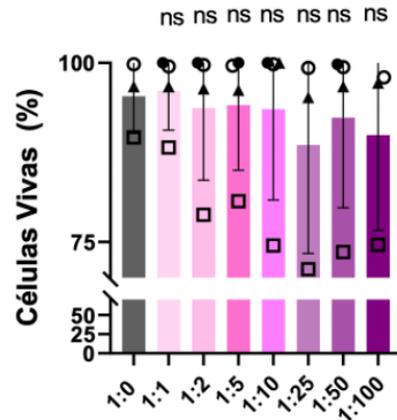


Figura 1. Internalización de mitocondrias de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA por citometría de flujo. Se realizó el protocolo de mitocepción en condrocitos derivados de pacientes con OA con distintas proporciones de mitocondrias de plaquetas teñidas previamente con MTDR: 1:0, 1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100 (número de condrocitos: mitocondrias de un número de plaquetas), y se evaluó por medio de citometría de flujo la incorporación de mitocondrias de plaquetas en condrocitos (definidos como MitoT+) tras 24 h luego de la mitocepción. **(A)** Gráfico de puntos representativo de las poblaciones de condrocitos en los umbrales definidos como MitoT+, se presenta la intensidad de fluorescencia de MTDR en función del área de dispersión lateral (SSC-A, del inglés *side scatter area*). En azul se indica la subpoblación (en porcentaje) positiva al umbral MitoT+, en morado las proporciones para la TM artificial. **(B)** Histograma representativo de las intensidades de fluorescencia de MTDR en condrocitos MitoT+ en función de la normalización a la moda del número de células. **(C)** Gráfico de los valores de las poblaciones de condrocitos MitoT+ (en porcentaje), de izquierda a derecha se disponen las distintas proporciones de TM artificial. **(D)** Gráfico de los valores de las poblaciones en porcentaje (%) de células vivas determinada por la sonda de viabilidad (LIVE/DEAD NEAR IR) posterior a la TM artificial, de izquierda a derecha se disponen las distintas proporciones de TM artificial. **(C-D)** Cada proporción fue evaluada en células provenientes del mismo paciente, cada símbolo corresponde a un paciente. Valores expresados como promedio \pm SD, fueron analizados utilizando la prueba para comparaciones múltiples Kruskal-Wallis seguido de un análisis *post-hoc* utilizando el test de Dunns. N = 4. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, ns: no significativo.

Los estudios de TM se apoyan en la visualización a través de técnicas de microscopía para validar la internalización efectiva en las células receptoras (Fahey et al., 2022; Levoux et al., 2021). Por lo tanto, se evaluaron las proporciones 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 y 1:100 para la mitocepción a través de microscopía confocal. Para poder determinar las mitocondrias exógenas, estas se incubaron previamente con la sonda MTDR. Además, para discriminar entre las mitocondrias propias de la célula receptora y la donadora, se realizó el marcaje de las mitocondrias totales utilizando anticuerpos para la proteína mitocondrial TOM20. Se observa que la señal de mitocondrias de plaquetas aumenta de forma proporción-dependiente, viéndose una mayor co-localización (blanco) en las razones 1:25, 1:50 y 1:100 (Fig. 2 y 3).

Además, para complementar, se evaluó la co-localización de las mitocondrias de plaquetas con aquellas señales positiva a TOM20, para confirmar que la señal es positiva a mitocondria y también se encuentra en el citoplasma celular (Fig. 3), esto similar a los análisis descritos en otros estudios (Lin et al., 2024; Needs et al., 2024). Se determina que efectivamente hay mitocondrias internalizadas desde la razón 1:50, dado por la co-localización entre las señales al evaluarse lo obtenido por célula (Fig. 3A), este resultado de co-localización además se complementa con el coeficiente de Pearson; donde se observa que la intensidad de señales entre mitocondrias totales y exógenas se relaciona

entre sí (Fig. 3E); siendo este valor independiente al tamaño de la célula (Fig. 3G). También se presentan los resultados de cada parámetro evaluado por paciente, en donde no se determinaron diferencias significativas.

Considerando la población de condrocitos MitoT+ y la internalización de mitocondrias en las distintas proporciones, tanto para citometría como para microscopía, se decidió trabajar con la proporción 1:100 para la TM artificial, para evaluar su efecto en los siguientes experimentos.

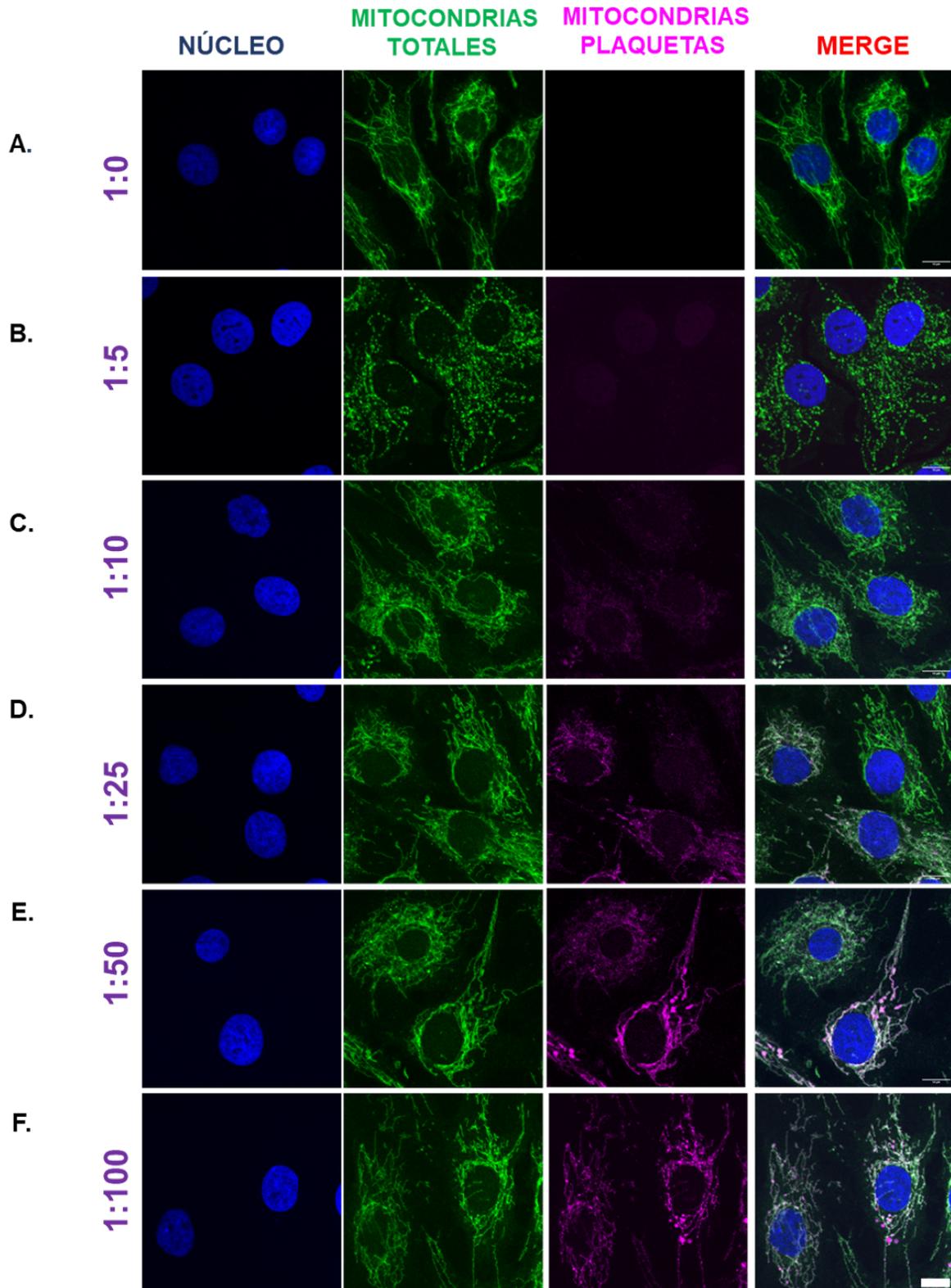


Figura 2. Internalización de mitocondrias de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA por microscopía de fluorescencia. Inmunofluorescencia de condrocitos derivados de pacientes con OA bajo distintas proporciones de mitocondrias de plaquetas teñidas con MTDR: 1:0, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 y 100 (número

de condrocitos: mitocondrias aisladas de un número de plaquetas, en morado). **(A-F)** Imágenes representativas de las proporciones de mitocondrias **(A)** 1:0, control **(B)** 1:5 **(C)** 1:10 **(D)** 1:25 **(E)** 1:50 **(F)** 1:100 tras 24 h post-mitocepción. Núcleo (DAPI azul), Mitocondrias totales (TOM20, verde), Mitocondrias de plaquetas (MTDR, rojo). Imágenes adquiridas en microscopio confocal Olympus FV1000. N = 3 experimentos independientes. Barra de escala = 10 μ M.

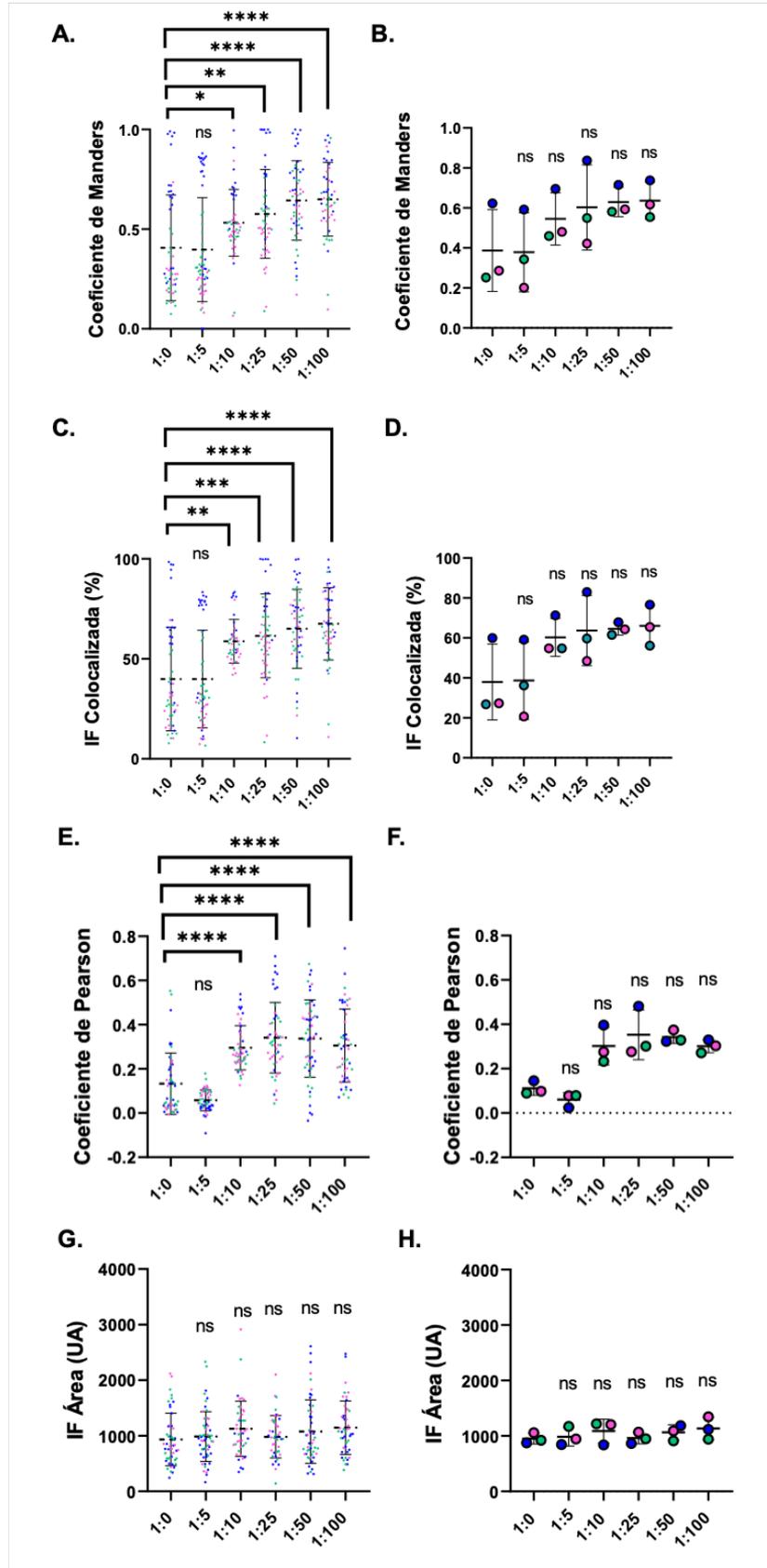


Figura 3. Análisis de internalización de mitocondrias de plaquetas en condrocitos de pacientes derivados con OA. Cuantificación del análisis de imágenes de condrocitos cultivados posterior a la mitocepción con mitocondrias derivadas de plaquetas para dar cuenta de la co-localización de mitocondrias derivadas de plaquetas (acorde al marcaje con MTDR) y mitocondrias totales (acorde al marcaje con TOMM20). **(A)** Coeficiente de Manders correspondiente a MTDR sobre TOMM20 (M2) por célula de cada experimento independiente. **(B)** Coeficiente de Manders correspondiente a cada paciente. **(C)** Intensidad de fluorescencia (IF) de las señales que colocalizan expresadas en porcentaje por célula de cada experimento independiente. **(D)** IF de las señales colocalizadas por cada paciente. **(E)** Coeficiente de Pearson para la señal de MTDR y TOMM20 por célula de cada experimento independiente. **(F)** Coeficiente de Pearson correspondiente a cada paciente. **(G)** IF en unidades arbitrarias (UA) de la señal por área celular por célula de cada experimento independiente. **(H)** IF en UA de la señal por cada paciente. Valores expresados como promedio \pm SD, fueron analizados utilizando la prueba para comparaciones múltiples Kruskal-Wallis seguido de un análisis *post-hoc* utilizando el test de Dunns. Cada paciente se indica con un color. N = 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns: no significativo.

Evaluación de TM artificial en los niveles de expresión de proteínas de la MEC y factores catabólicos

La internalización de mitocondrias ha demostrado tener efectos sobre la función de distintos tipos celulares (Borcherding & Brestoff, 2023). En OA, se ha descrito que hay una alteración en la función fisiológica; principalmente, la función secretora encargada de mantener la integridad de la MEC. Para evaluar si existen cambios en la función secretora cuando hay una adquisición de mitocondrias de parte de los condrocitos con OA, se llevó a cabo la mitocepción con la proporción (1:100) y se evaluó el efecto a 24, 48 y 72 h a través de RT-qPCR y microscopía confocal.

Se evaluó la expresión de genes asociados a la homeostasis de la MEC que se ven afectados en la patología, como lo son COL2, 1 y 10, ACAN y las MMPs -1 y -13. En primera instancia, se evaluaron los componentes de MEC, en donde, preliminarmente no se observan diferencias en la expresión de los genes asociados a MEC: COL2, ACAN y COL1, (Fig. 4A, B, D), ni tampoco en la razón de expresión COL2/COL1 (Fig. 4C).

También, se evaluó la expresión de genes de factores conocidos por ser "marcadores de hipertrofia" en condrocitos de pacientes con OA, tales como COL10, MMP-1 y -13, en donde su expresión da cuenta de este estado (Singh et al., 2019). En Fig. 4E, F, G, los datos sugieren que las TM artificial podría promover una disminución en la expresión de COL10 y MMP-1 y -13 en comparación con la condición sin tratamiento posterior a las 48 y 72 h.

Sin embargo, se requiere aumentar el número de réplicas biológicas para poder realizar conclusiones sobre el efecto de la TM artificial sobre estos factores catabólicos.

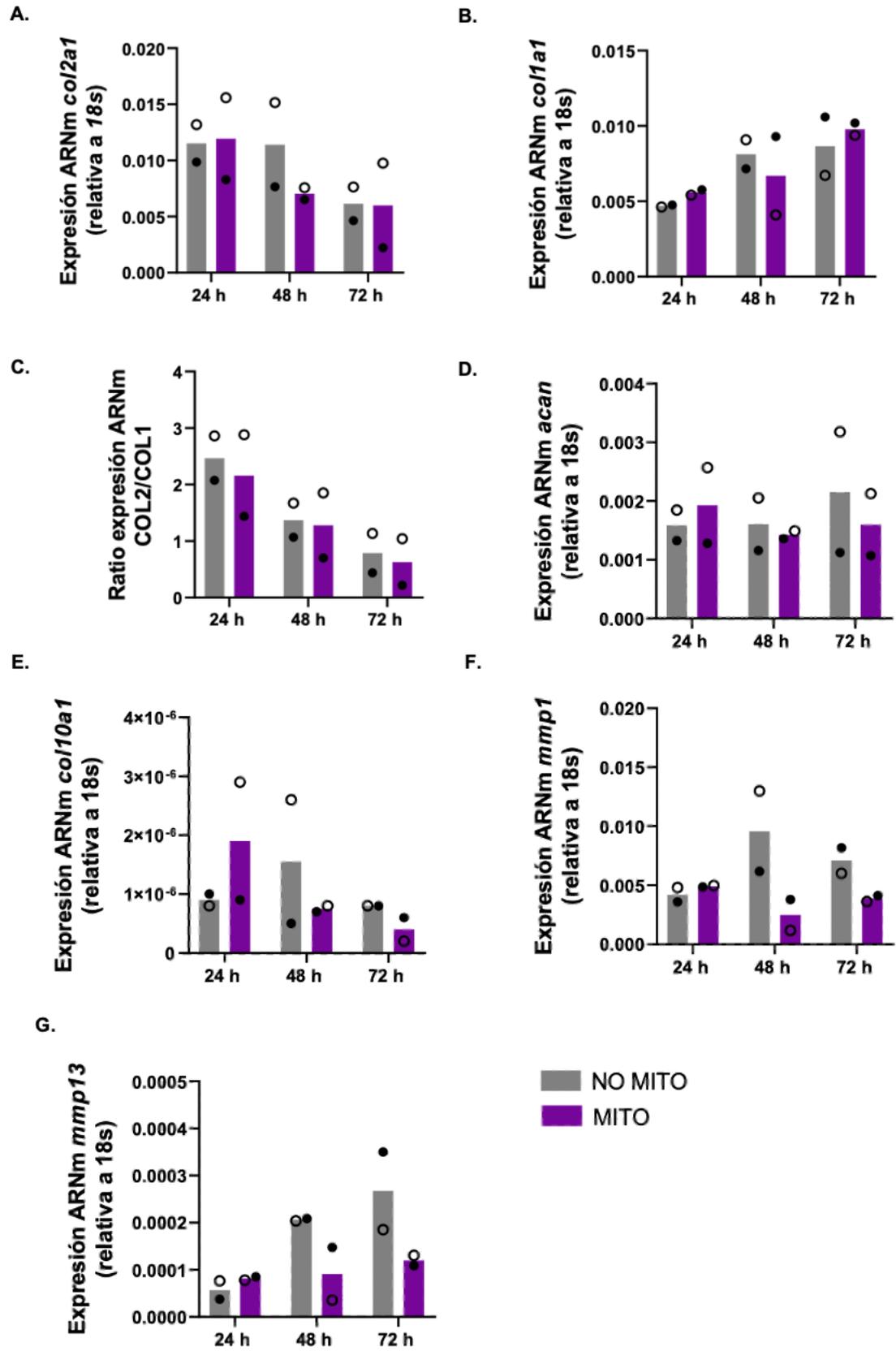


Figura 4. Expresión relativa de genes de condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas. RT-qPCR de condrocitos derivados de pacientes con OA con TM artificial de mitocondrias de plaquetas, en condiciones control (sin mitocondrias, barra gris) y con mitocondrias a una proporción de 1:100 (barra morada), evaluada en diferentes tiempos (24, 48 y 72 h post mitocepción). **(A-F)** Gráficos de la expresión relativa de los genes asociados a la función de condrocitos. **(A)** Colágeno tipo II (*col2a1*) **(B)** Colágeno tipo I (*col1a1*) **(C)** Ratio Expresión Colágeno tipo II (*col2a1*) / Colágeno I (*col1a1*) **(D)** Agrecano (*acan*) **(E)** Colágeno tipo X (*col10a1*) **(F)** MMP-1 (*mmp1*) **(G)** MMP-13 (*mmp13*) relativo al gen *housekeeping 18s* durante 24, 48 y 72 h posterior a la mitocepción. Ambas condiciones se evaluaron en células provenientes del mismo paciente, en donde cada símbolo corresponde a un paciente diferente. Datos expresados como Media. N = 2 experimentos independientes.

Para comprender si la función secretora en condrocitos derivados de pacientes con OA se ve comprometida frente a la TM, se evaluó por medio de inmunofluorescencia cambios en la secreción de productos de MEC como ACAN y COL2, con tratamiento de mitocondrias derivadas de plaquetas en una proporción 1:100. En la Fig. 5 se presentan imágenes representativas de los condrocitos con marcaje para ACAN (magenta) a través de distintos tiempos, el cual presenta una señal adyacente al núcleo celular (azul) y se extiende hacia la periferia celular. Además, es posible observar cambios en patrones de señal, habiendo patrones punteados o cúmulos de ACAN presentes en la condición MITO (Fig. 5). La cuantificación de la señal se llevó a cabo de dos formas: la primera, cuantificando el área de la MEC determinada por la señal de fluorescencia detectada y la segunda, cuantificando la intensidad de fluorescencia total del canal de la señal para ACAN (Fig. 6). El análisis de la señal demostró resultados similares, con cambios significativos en cuanto a la señal de las células para ACAN cuando se comparan las condiciones NO MITO y MITO a las 72 h posterior a la mitocepción (Fig. 6), el comportamiento de acuerdo a cada paciente se ilustra en Anexo 4.

En el caso de COL2, en las imágenes representativas se observan señales de mayor intensidad comparadas a las del control NO MITO (Fig. 7), específicamente a las 24 h posterior a la mitocepción lo que se complementa con los resultados de expresión génica (Fig. 4A). A pesar de esto, no se observan diferencias significativas en cuanto a la marca entre las distintas condiciones y tampoco en cuanto a la disposición de la señal en el espacio, habiendo marcas predominantes en las células que se extienden, al igual que ACAN, a las células cercanas. De acuerdo con la cuantificación, no se sugieren cambios frente a la presencia de COL2 al evaluar los comportamientos por célula (Fig. 8), esto también se observa en el comportamiento para cada paciente en Anexo 5. Con esto, se

sugiere que el tratamiento con mitocondrias podría estar promoviendo cambios, que podrían reflejarse cuando se aumente el número de repeticiones.

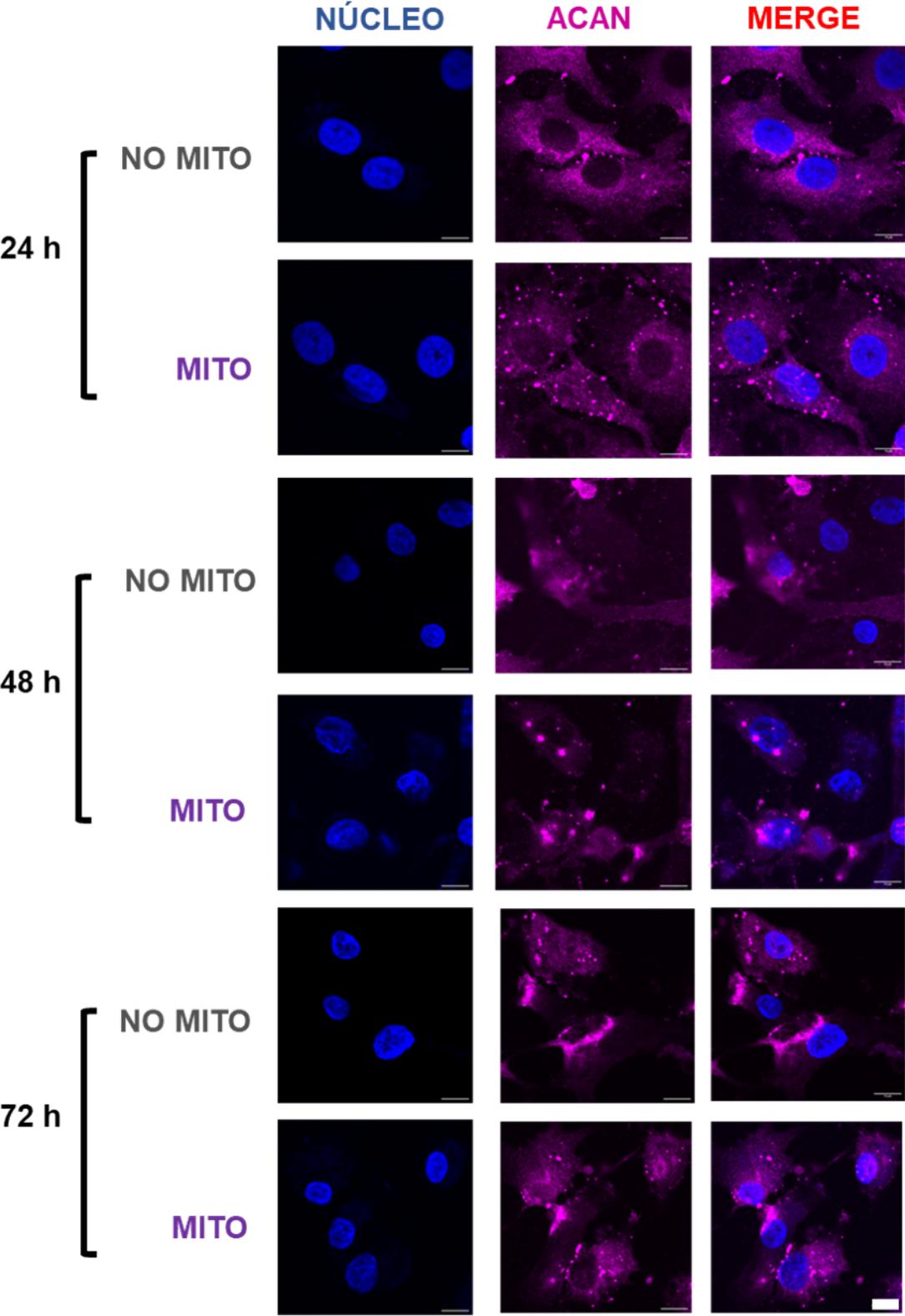


Figura 5. Expresión de ACAN en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas. Inmunofluorescencia de condrocitos derivados de pacientes con OA con TM artificial de mitocondrias de plaquetas, en condiciones control (NO MITO, gris) y con TM artificial a una proporción 1:100 (MITO, morado) a distintos tiempos (24, 48 y 72 h posterior a la mitocepción). **(A-C)** Imágenes representativas de un plano a **(A)** 24 h **(B)** 48 h **(C)** 72 h posterior a la mitocepción. Paneles superiores indican la condición NO MITO, paneles inferiores indican la condición MITO. Núcleo (azul), ACAN (magenta). Imágenes adquiridas en microscopio confocal Olympus FV1000. N = 2, condrocitos derivados de 2 pacientes. Barra de escala = 10 μM .

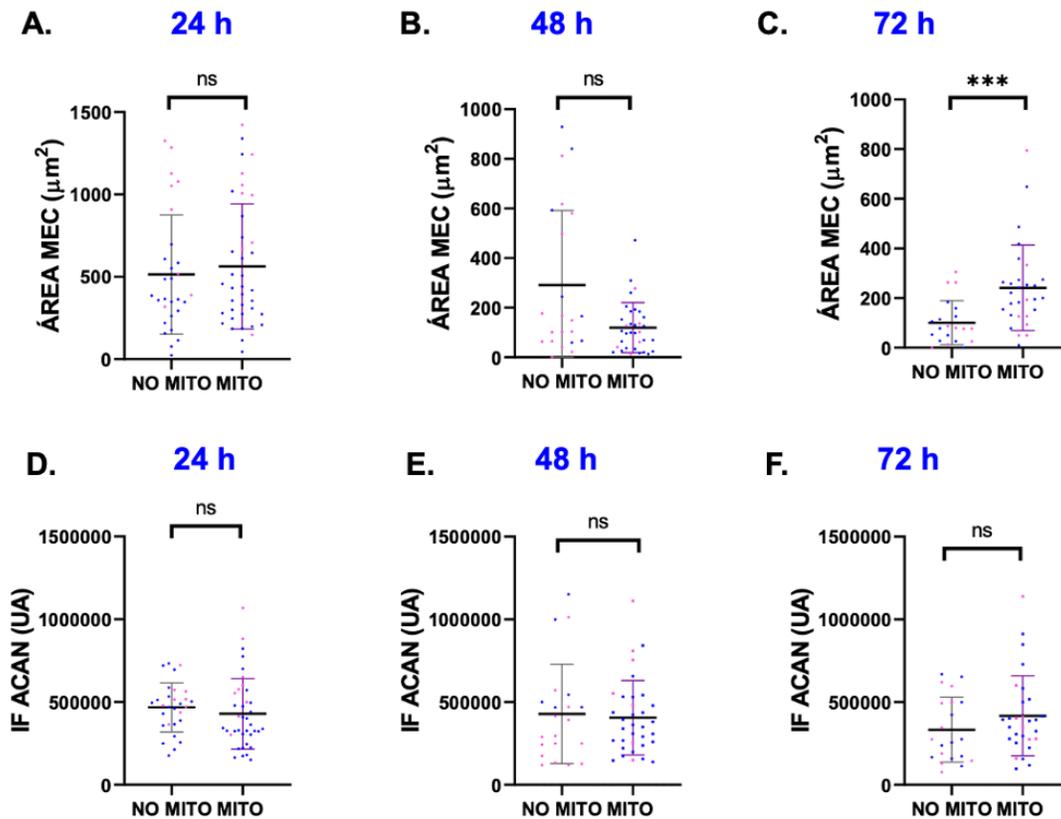


Figura 6. Cuantificación de ACAN posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (IF) obtenida por célula para la señal de ACAN en condiciones control (NO MITO, en gris) y con TM artificial (MITO, en morado) a distintos tiempos post mitocepción en azul expresado en horas (h). **(A-C)** Cuantificación del área de la señal de MEC (ACAN) en μm^2 por célula de **(A)** 24 h (NO MITO N = 69, MITO N = 40). **(B)** 48 h (NO MITO N = 22, MITO N = 33). **(C)** 72 h (NO MITO N = 29, MITO N = 28). **(D-F)** Cuantificación de la IF total asociada al canal de ACAN (magenta) a **(D)** 24 h (NO MITO N = 29, MITO N = 38). **(E)** 48 h (NO MITO N = 21, MITO N = 34). **(F)** 72 h (NO MITO N = 21, MITO N = 29). Cada punto corresponde a una célula analizada y cada color corresponde a un paciente diferente. Los resultados expresados como media \pm SD, fueron analizados con ensayo *Mann Whitney U* para datos no-pareados. N = al número de células analizadas y de al menos dos pacientes. *** $p < 0.001$, ns: no significativo.

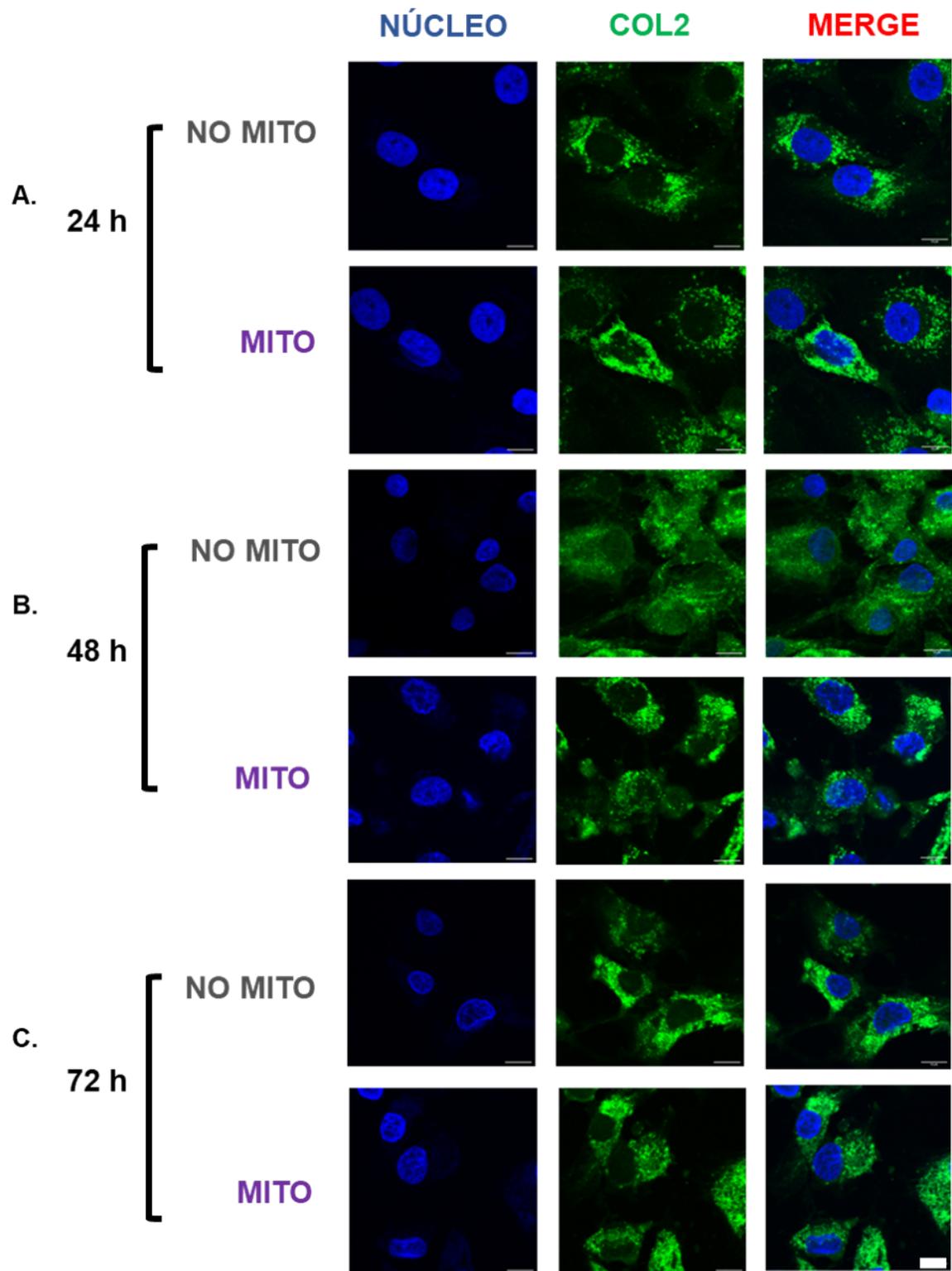


Figura 7. Expresión de COL2 en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas. Inmunofluorescencia de condrocitos derivados de pacientes con OA con TM artificial de mitocondrias de plaquetas, en condiciones control (NO MITO, en gris) y con TM artificial a una

proporción 1:100 (MITO, en morado) a distintos tiempos (24, 48 y 72 h posterior a la mitocepción). **(A-C)** Imágenes representativas de un plano posterior al tratamiento **(A)** 24 h. **(B)** 48 h. **(C)** 72 h posterior a la mitocepción. Paneles superiores indican la condición NO MITO, paneles inferiores indican la condición MITO. Núcleo (azul), COL2 (verde). Imágenes adquiridas en microscopio confocal Olympus FV1000. N = 2, condrocitos derivados de 2 pacientes. Barra de escala = 10 μ M.

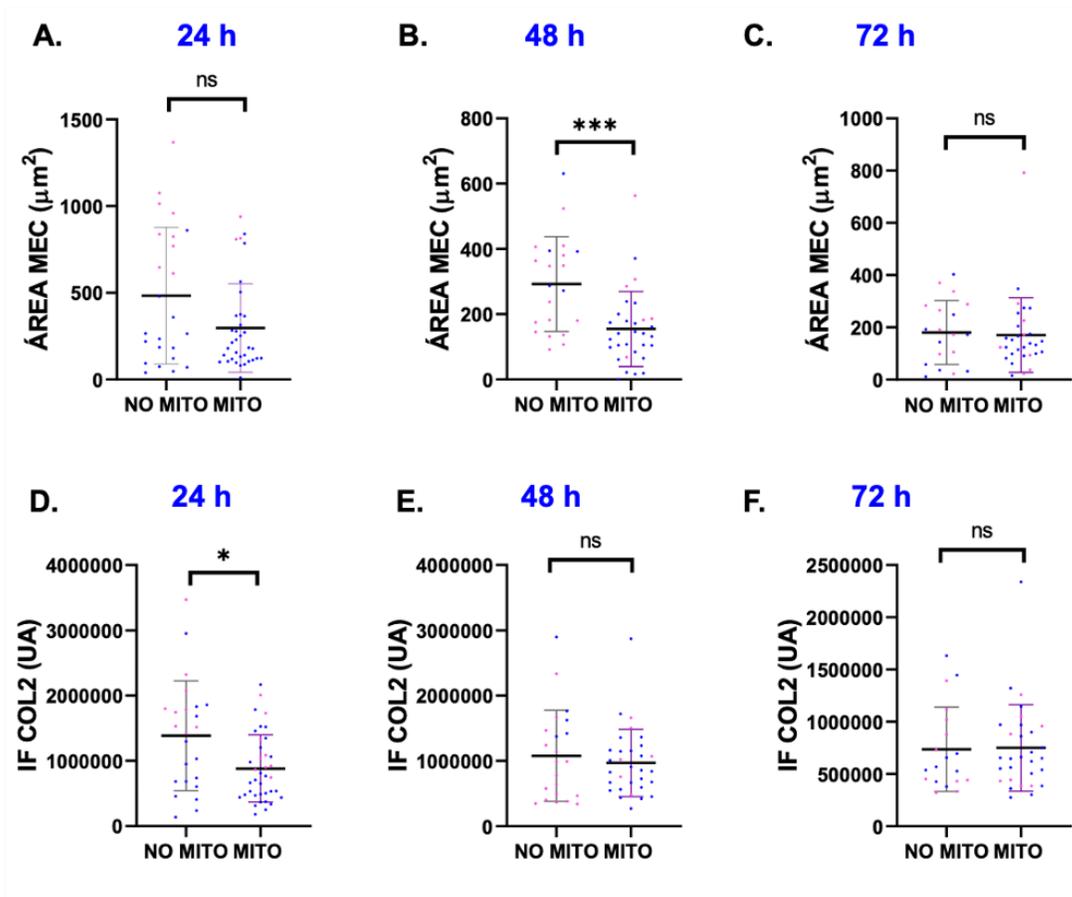


Figura 8. Cuantificación de COL2 en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (IF) obtenida por célula para la señal de COL2 en condiciones control (NO MITO, en gris) y con TM artificial (MITO, morado) a distintos tiempos post mitocepción en azul expresados en horas (h). **(A-C)** Cuantificación del área de la señal de MEC (COL2) en μm^2 por célula a **(A)** 24 h (NO MITO N = 24, MITO N = 35). **(B)** 48 h (NO MITO N = 21, MITO N = 30). **(C)** 72 h (NO MITO N = 19, MITO N = 29). **(D-F)** Cuantificación de la IF total asociada al canal de COL2 (verde) a **(D)** 24 h (NO MITO N = 24, MITO N = 38). **(E)** 48 h (NO MITO N = 22, MITO N = 30). **(F)** 72 h (NO MITO N = 19, MITO N = 29). Cada punto corresponde a una célula analizada y cada color corresponde a un paciente diferente. Los resultados expresados como media \pm SD, fueron analizados con ensayo *Mann Whitney U* para datos no pareados. N = células analizadas, de al menos dos pacientes. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, ns: no significativo.

La TM artificial disminuye la expresión de IL-1 β en condrocitos derivados de pacientes con OA

Para responder si la TM artificial tiene un efecto sobre respuesta inflamatoria en condrocitos derivados de pacientes con OA es que se evaluó la secreción de un panel de citoquinas (CCL2, IL-1 β , IL-6, IL-10, OPN, CCL-5, IL-1ra, IL-8, MMP-7, TNF- α) a través de LUMINEX. Se obtuvieron resultados significativos en cuanto a la disminución de IL-1 β , del mismo modo no se presentan diferencias significativas a pesar de ver una disminución en la concentración de las citoquinas asociadas a la inflamación como lo son: TNF- α , IL-6, OPN, sin embargo, no se observaron resultados similares con aquellas con un rol más regulador y antiinflamatorio como lo es IL-10 e IL-1Ra (Fig. 9). Por otro lado, no se pudo determinar: CCL2, IL-8, MMP-7 y CCL-5, ya que quedaron fuera de la curva de estandarización realizada.

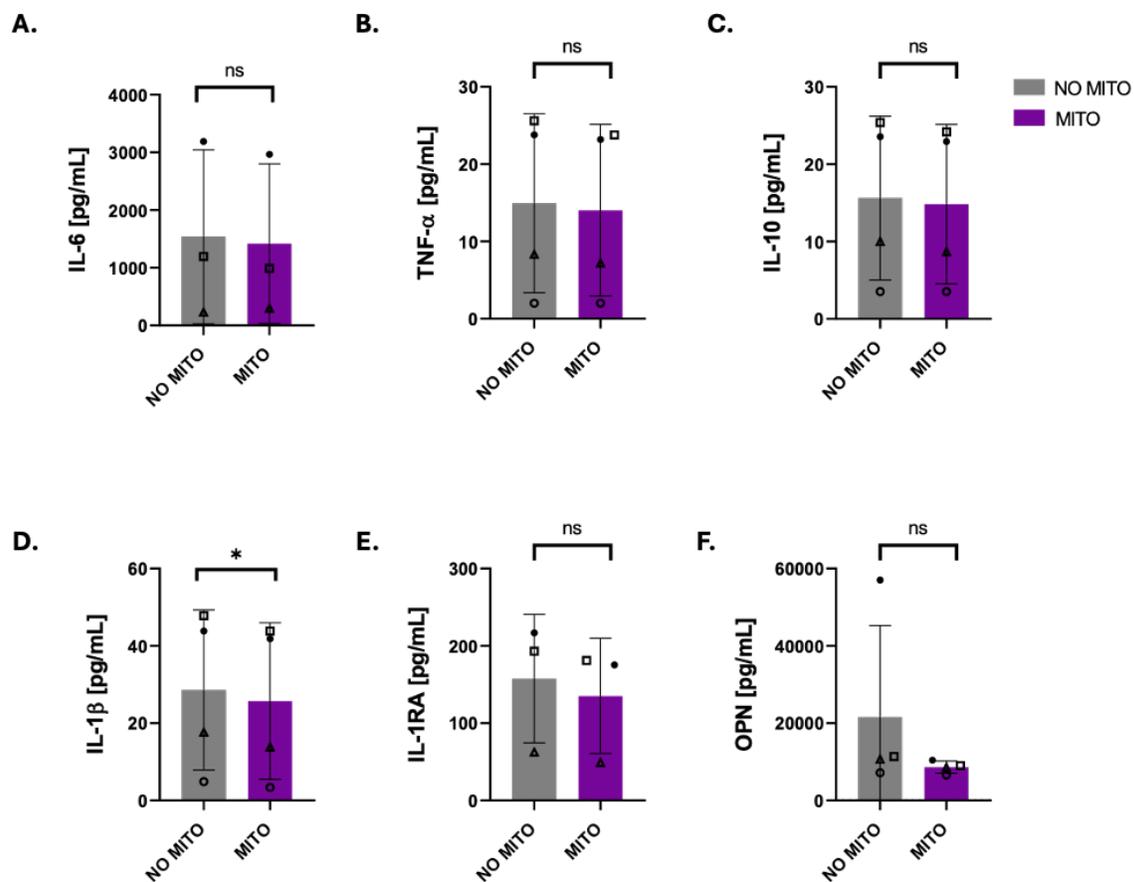


Figura 9. Cuantificación de citoquinas en sobrenadantes de condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial. Análisis multiplex por Luminex para la determinación de la concentración de citoquinas y quimioquinas liberados por condrocitos derivados de pacientes con OA en una condición control (sin mitocondrias, barra gris) y con TM artificial en una proporción de 1:100 (barra morada) en sobrenadantes recuperados tras 24 h post mitocepción. **(A-F)** Cuantificación de citoquinas y quimioquinas en sobrenadantes del cultivo de condrocitos derivados de pacientes con OA 24 h posterior a la mitocepción. **(A)** Interleuquina-6 (IL-6). **(B)** Factor de necrosis tumoral α (TNF- α). **(C)** Interleuquina-10 (IL-10). **(D)** Antagonista del receptor de

Interleuquina 1 (IL-1ra). (E) Osteopontina (OPN) (F) Interleuquina 1 β (IL-1 β). Ambas condiciones se evaluaron en células provenientes del mismo paciente, cada símbolo corresponde a un paciente. Los datos expresados como media \pm SD, fueron analizados con ensayo *T-student* para datos pareados. N = 4. *p<0.05, ns = no significativo.

Efectos de la TM artificial sobre el metabolismo mitocondrial en condrocitos derivados de pacientes con OA

En condrocitos derivados de pacientes con OA o bajo estímulos proinflamatorios (*like-OA*) se han reportado cambios metabólicos, específicamente, en la función mitocondrial (Wu et al., 2023). Dentro de los cambios, se describe que el PMM está disminuido en esta patología, favoreciendo el estado de estrés celular en los condrocitos. Considerando este antecedente, se evaluó el efecto de la TM artificial sobre el PMM utilizando la sonda dependiente de potencial TMRM. Para esto se llevó a cabo la mitocepción (proporción 1:100) en los condrocitos y se determinó el PMM a través de citometría de flujo posterior a 24, 48 y 72 h luego de la mitocepción. En la Fig. 10 A-C se presentan los histogramas de las temporalidades 24, 48 y 72 h luego de la mitocepción respectivamente, donde los cambios en la intensidad de fluorescencia de TMRM no presentan cambios observables, comparadas la condición MITO con NO MITO, por lo que no se sugieren cambios en el PMM posterior a la TM artificial (Fig. 10D)

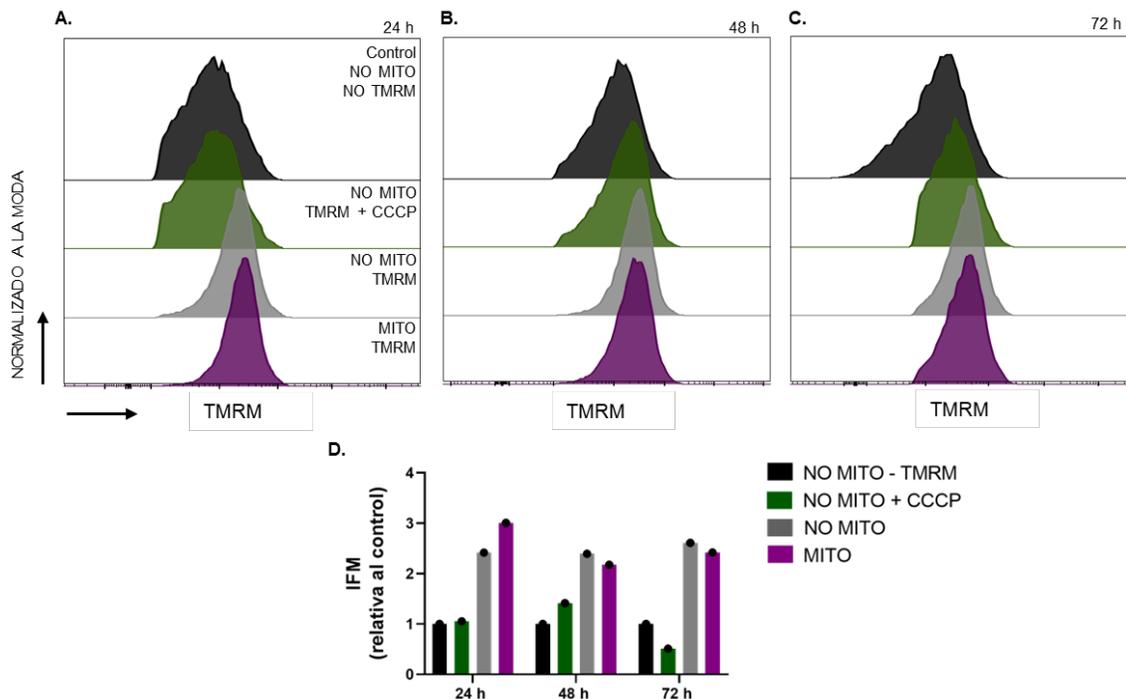


Figura 10. Determinación del potencial de membrana mitocondrial en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas. Evaluación del PMM en condrocitos derivados de pacientes con OA utilizando TMRM en citometría de flujo en una condición control (NO MITO, barra gris), con una proporción 1:100 (MITO, barra morada), además de los controles sin mitocondrias ni TMRM (NO MITO – TMRM, barra negra) y sin mitocondrias con TMRM y el desacoplante CCCP (NO MITO + CCCP, barra verde) tras 24, 48 y 72 h post mitocepción. **(A-C)** Histogramas representativos de la distribución de frecuencias de las intensidades de fluorescencia de TMRM en las distintas condiciones experimentales en función de la normalización a la moda del número de células. **(A)** 24 h. **(B)** 48 h. **(C)** 72 h posterior a la mitocepción. **(D)** Gráfica representativa de los valores de intensidad de fluorescencia media (IFM) de TMRM normalizada a los valores de IFM del control (NO MITO – TMRM) a 24, 48 y 72 h post mitocepción. Todas las condiciones se evaluaron en las células del mismo paciente. N = 1, condrocitos de un paciente.

Para dar cuenta de la función mitocondrial durante la TM artificial, es que se analizó la respiración mitocondrial en un analizador de flujo extracelular, desafiando la función de la CTE con las siguientes drogas: Oligomicina, inhibidor de la ATP sintasa, FCCP, desacoplante de protones y Rotenona/Antimicina AA (Rot/AA), inhibidores de los complejos I y III, respectivamente, comparando condiciones con TM artificial. En la Fig. 11A se presenta la OCR de la prueba de Mito-estrés, donde no se demostraron diferencias significativas en el consumo de oxígeno en el tiempo entre la condición control (NO MITO) y experimental (MITO) (Fig. 11B-D). En presencia de MITO no se obtienen cambios significativos a pesar de que se observa el aumento en la respiración basal al compararlo con las condiciones no tratadas (Fig. 11B), sin embargo, estos cambios no se replican para el OCR asociado la producción de ATP y la respiración máxima (Fig. 11C, D).

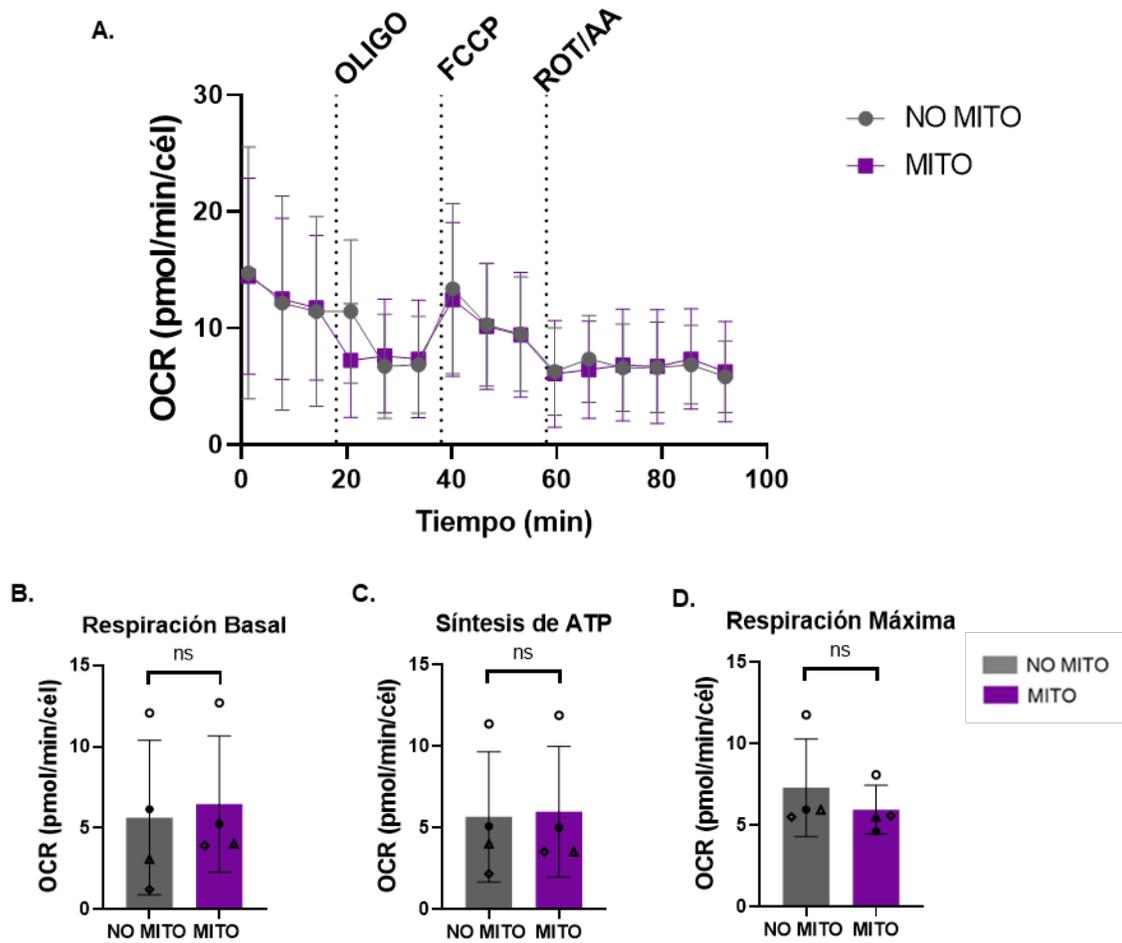


Figura 11. Análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial. Medición del OCR en condrocitos derivados de pacientes con OA en una condición control (NO MITO, en gris) y con TM artificial en una proporción de 1:100 (MITO, en morado) 24 h post mitocepción. **(A)** Gráfico representativo de la medición de OCR durante la prueba de Mito-estrés, se indica la inyección de 2 μM oligomicina (OLIGO), 2,5 μM FCCP, 0,5 μM Rotenona/Antimicina (Rot/AA) los datos de presentan como media \pm SD. **(B)** Respiración basal **(C)** OCR asociado a la síntesis de ATP. **(D)** Respiración Máxima. Ambas condiciones se evaluaron en células provenientes del mismo paciente, cada símbolo corresponde a un paciente. Los datos expresados como media \pm SD, fueron analizados con el ensayo Wilcoxon para datos pareados. Cada símbolo corresponde a un paciente diferente. N = 4, condrocitos de 4 pacientes diferentes. ns: no significativo.

Discusión

Considerando el nivel de envejecimiento que presenta la población (Partridge et al., 2018), el estudio de la OA y el desarrollo de nuevas estrategias para su tratamiento adquieren relevancia para mejorar la calidad de vida de quienes la padecen (Giorgino et al., 2023). Se ha demostrado previamente que la función mitocondrial desempeña un papel fundamental en la progresión de la OA (Liu et al., 2022; Qi et al., 2023). En consecuencia, la búsqueda de opciones terapéuticas ha llevado a proponer la TM artificial como una posible estrategia para tratar esta patología (Fahey et al., 2022). Aunque, diversos tipos celulares se ven afectados por esta enfermedad, los condrocitos son los más relevantes, ya que son responsables de mantener el cartílago articular, un tejido que se degenera progresivamente y carece de capacidad regenerativa (Primorac et al., 2020). Adicionalmente, en estas células, la disfunción mitocondrial juega un papel crítico en el desarrollo de la OA (Qi et al., 2023; Wu et al., 2023). Con estos antecedentes, en este trabajo se propuso evaluar una nueva estrategia para mejorar la disfunción mitocondrial en los condrocitos mediante la TM artificial, utilizando mitocondrias aisladas de plaquetas. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se ha demostrado que la TM desde CMM puede revertir el fenotipo patológico en condrocitos y mitigar el progreso de la enfermedad en un modelo murino de OA (trabajo en revisión). Sin embargo, la elección del donante más adecuado sigue siendo un tema controversial, por lo que es importante explorar fuentes alternativas de mitocondrias que permitan obtener un mayor número de estos organelos y así proponer tratamientos autólogos para futuras terapias de patologías como la OA (Bourebaba et al., 2022; Yamada et al., 2020).

Las plaquetas surgen como posibles donantes dadas características, que incluyen un metabolismo mitocondrial activo, la capacidad de liberar mitocondrias de manera espontánea, su abundancia y fácil obtención (Levoux et al., 2021). En este estudio, no se consideró la variable que implica utilizar plaquetas activadas, lo cual constituye una limitación que debería abordarse en investigaciones futuras, dado que su activación conlleva cambios metabólicos (Grichine et al., 2023). Es necesario evaluar entonces si existen diferencias entre el efecto de las mitocondrias derivadas de plaquetas activadas en comparación con las no activadas. A pesar de esto, investigaciones previas han determinado que el co-cultivo de plaquetas con las células de interés o el uso de sus mitocondrias aisladas exhiben efectos sobre el metabolismo y función celular considerando la activación de las plaquetas (Cereceda et al., 2024; Levoux et al., 2021).

En este trabajo, se logró demostrar que las mitocondrias de plaquetas son capaces de internalizarse en condrocitos derivados de pacientes con OA en condiciones *in vitro*, y que este proceso es proporción dependiente. Es decir, a mayor cantidad de mitocondrias de plaquetas, aumenta la internalización de estas en las células. Interesantemente, la internalización varía entre pacientes, es decir, la eficiencia de la TM artificial no es estable entre sujetos. Asimismo, se evaluó la viabilidad de las células sometidas a la TM artificial, ya que se desconoce si hay un efecto sobre esta a distintas razones de mitocondrias en especial en aquellas donde se llega a un punto de saturación, determinándose que esta no se ve afectada.

Si bien la citometría de flujo es uno de los métodos utilizados para determinar la presencia de mitocondrias, se utilizó microscopía para complementar y también evaluar la internalización de las mitocondrias (Lin et al., 2024; Needs et al., 2024). Una de las limitantes de trabajar con plaquetas como donadores mitocondriales, es que las opciones para el marcaje de mitocondrias se acotan a sondas que pueden estar sujetas a un *leaking*, por lo que su uso puede ser cuestionado como un marcaje no-específico. Por lo tanto, para evitar marcas no específicas, se realiza el marcaje de las mitocondrias totales. De esta forma, es posible confirmar la internalización mediante análisis de colocalización entre la marca mitocondrial proveniente de plaquetas y totales. Lo que en resumen permite confirmar que se internalizan mitocondrias y además se diferencian las dos poblaciones mitocondriales: aquellas propias de la célula receptora y donadora.

La TM artificial se propone como estrategia terapéutica ya que se han demostrado efectos favorables en la función celular en distintos contextos (Court et al., 2020; Levoux et al., 2021; Ma et al., 2020; Masuzawa et al., 2013; Shi et al., 2021) y en OA (Korpershoek et al., 2022; Lee et al., 2022; Wang et al., 2020). En condrocitos, la función secretora se ve comprometida en OA, por lo que en este estudio se evaluaron componentes de la MEC: COL2, 1 y 10, y ACAN, además de factores catabólicos y citoquinas que promueven su degeneración.

Según lo descrito en la literatura, la secreción anormal de productos de MEC por parte de los condrocitos en OA consiste en la disminución de COL2, ACAN, y en el aumento de COL1 y 10, otorgándole a la MEC un cambio en sus características biomecánicas, lo que

es crítico para el progreso de la enfermedad (Bačenková et al., 2023; Rim et al., 2020). Respectivo a COL2, no se determinaron cambios con el tratamiento, teniendo incluso una mayor presencia extracelular en casos donde no hay TM artificial, por lo que se sugiere que las mitocondrias exógenas no tendrían efectos sobre la síntesis de COL2. Al respecto, ya existe evidencia en cuanto el efecto de la TM artificial utilizando como células donantes a CMM sobre la expresión o secreción de COL2 con resultados contradictorios, debido a que aumenta o que no se determinan diferencias significativas al comparar con la condición sin tratamiento (Korpershoek et al., 2022; Wang et al., 2020), lo que refuerza la idea que el efecto es paciente-dependiente. Además, la variabilidad en el comportamiento de COL2, es de interés ya que nuevos estudios se han enfocado en determinar distintos fenotipos de condrocitos en el contexto de la patología, y se ha asociado una alta expresión de COL2 a fenotipos que aportan en el progreso de la OA (Chou et al., 2020). Esto además se apoya con lo obtenido al considerar el estado del cartílago, cuya composición se ve favorecida en fibrocartílago; que cuenta con propiedades más rígidas que el sano, esto considerando la razón COL2/1 (Bačenková et al., 2023).

Por otro lado, la evidencia disponible para ACAN, ha demostrado cambios favorables en su expresión génica a las 24 h tras TM artificial (Korpershoek et al., 2022; Lee et al., 2022), lo que avala lo obtenido. De forma paralela, estudios recientes en células progenitoras sinoviales han demostrado que en condiciones de OA lo que cambiaría, no sería la expresión génica, sino que los patrones de distribución intracelular de ACAN respecto a pacientes sin la patología, ya que se estaría viendo afectada la secreción de esta proteína (Krawetz et al., 2022). Estos cambios en la distribución también se observan, lo que estaría indicando que puede haber cambios en la secreción de ACAN en la TM artificial, lo cual podría dar indicios de efectos en la ruta secretora que no han sido estudiados en este proceso. Para ambos casos, COL2 y ACAN, uno de los puntos a considerar es que el comportamiento depende del paciente, lo que a la vez es consistente con la literatura (Korpershoek et al., 2022). Asimismo, se ha reportado que los estímulos mecánicos en OA son importantes en cuanto a la expresión de receptores de superficie y la modulación de vías de señalización para la secreción de MEC, por lo que se pueden considerar otros enfoques para el estudio *in vitro* de condrocitos (Bačenková et al., 2023; Primorac et al., 2020).

Otra de las características de la OA es la inflamación crónica, en la cual el aporte inflamatorio mayormente se asocia a células del sistema inmune residentes en la membrana sinovial como los macrófagos y otras células inmunes no-residentes (Chou et al., 2020). Aunque en menor proporción, los condrocitos también aportan al ambiente inflamatorio, secretando citoquinas proinflamatorias que además promueven el daño al cartílago por medio de la inducción de la expresión de factores catabólicos (Singh et al., 2019). Los hallazgos en cuanto al efecto sobre factores inflamatorios concuerdan con lo descrito en la literatura (Lee et al., 2022), dónde hay una disminución en la secreción de factores inflamatorios, destacando IL-1 β , el cual se ha descrito es de lo más relevantes en cuanto a expresión por parte de los condrocitos. Otras citoquinas que secretan los condrocitos como IL-6 y TNF- α no presentaron valores significativos a pesar de que se sugieran comportamientos a la baja, estos no pueden determinarse, las causas pueden asociarse a la variabilidad de las muestras respecto a su secreción o frente al efecto de la TM, el cual también es paciente-dependiente. De forma interesante, ocurre lo mismo con OPN, una proteína que se ha planteado como un regulador positivo de la OA, favoreciendo la inflamación y también la mineralización del hueso (Bai et al., 2022).

Más aún, se ha reportado que marcadores celulares de hipertrofia y muerte celular se ven disminuidos con el tratamiento de TM artificial en condrocitos bajo condiciones de inflamación (Lee et al., 2022). A su vez, se puede sugerir la disminución de la expresión de MMP-1 y -13, proteasas que degradan la MEC en nuestro modelo de estudio. Interesantemente, se ha descrito que la expresión de MMPs, depende del funcionamiento de la cadena respiratoria mitocondrial, en donde alteraciones en esta favorecen la aparición de estos factores catabólicos, por lo que cuando se recupera su función también disminuye la expresión de estos factores (Cillero-Pastor et al., 2013). Dada la variabilidad entre pacientes, es que es importante recalculer el tamaño muestral considerando la alta varianza que poseen los resultados obtenidos (Zhang & Hartmann, 2023).

Una de las interrogantes que quedan al estudiar la TM artificial es qué vías son las que se activan para que las mitocondrias exógenas lleven a cabo sus efectos en la célula receptora. Dentro de los roles de las mitocondrias se encuentra la síntesis de ATP mediante la respiración mitocondrial o fosforilación oxidativa, la cual se ve afectada en condiciones patológicas, siendo considerado un parámetro de importante en lo que respecta a la función mitocondrial. Del mismo modo, hay evidencia de que el tratamiento con factores

proinflamatorios en condrocitos como IL-1 β , simulando un estado inflamatorio *like*-OA, provoca una disminución en la respiración mitocondrial (Arra et al., 2020; Wu et al., 2023). Asimismo, la TM favorece el aumento de este parámetro en condrocitos bajo condiciones de estrés (Fahey et al., 2022). Si bien en este estudio no se proporciona evidencia respecto a cambios significativos en el OCR cuando se realiza la TM artificial, al evaluar cada parámetro de la respiración mitocondrial, se observan cambios solo en la respiración basal. Al evaluar las curvas de OCR por paciente se obtienen comportamientos similares (Anexo 6), por lo que el efecto paciente-dependiente es una variable de interés a considerar. Por lo tanto, las mitocondrias exógenas varían los efectos en la respiración celular de condrocitos derivados de pacientes con OA.

De la misma forma, la disfunción mitocondrial en OA involucra además la desregulación de otros parámetros, uno de ellos corresponde al PMM, el cual está disminuido en esta patología (Rim et al., 2020). En este estudio no se logró determinar que con la TM artificial ocurren cambios en el PMM, a diferencia de otros estudios en donde se ha determinado un aumento del PMM a las 24 h posterior el tratamiento (Lee et al., 2022). Esto último, podría dar indicios de cómo sería el mecanismo por el que las mitocondrias exógenas estarían teniendo efectos sobre las células receptoras pero no se ha corroborado en este trabajo. De este modo, las mitocondrias internalizadas podrían verse sometidas a otros procesos como los de la dinámica mitocondrial, donde la fusión y la mitofagia podrían estar teniendo roles importantes. Todo lo cual ya se ha descrito previamente en condrocitos y otros modelos celulares (Lee et al., 2022; Lin et al., 2024).

Finalmente, dentro de las limitantes de este estudio se encuentra la ausencia de controles sanos para evaluar los cambios en cuanto a las condiciones en estudio. Además, al ser una investigación en base a cultivos primarios derivados de pacientes, la variabilidad es un componente importante. En la misma línea, al ser un estudio *in vitro* no fue posible realizar un seguimiento para cada paciente, ya que el cultivo de los condrocitos y su expansión puede también afectar su fenotipo y metabolismo (Arra et al., 2020; Bačenková et al., 2023; Descalzi Cancedda et al., 1992).

Conclusiones y Proyecciones

En el contexto de una enfermedad relevante como la OA, este estudio evaluó el impacto de la TM artificial en condrocitos derivados de pacientes con OA, utilizando plaquetas como un novedoso donador mitocondrial, determinando efectos a nivel de la función celular y mitocondrial, obteniéndose las siguientes conclusiones:

- Los condrocitos derivados de pacientes con OA son capaces de internalizar mitocondrias aisladas de plaquetas, siendo este un proceso proporción-dependiente.
- La TM artificial utilizando mitocondrias aisladas de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA tiene efectos sobre factores catabólicos, disminuyendo la síntesis de IL-1 β , sin embargo, no se determinaron efectos en cuanto a la síntesis de MEC.
- No se sugieren cambios agudos sobre la función mitocondrial, en el PMM y la respiración mitocondrial, que pueden estar mediando la TM artificial en condrocitos derivados de pacientes con OA.

Por lo tanto, la hipótesis “La transferencia artificial de mitocondrias derivadas de plaquetas en condrocitos de pacientes con OA promueve efectos condrogénicos y un aumento del metabolismo oxidativo *in vitro*” es aceptada en parte, ya que se demostraron efectos condrogénicos, pero no se lograron determinar cambios en el metabolismo oxidativo.

Como proyección, se requiere complementar el estudio con un mayor número de réplicas biológicas y con la evaluación de otros parámetros de la función mitocondrial y metabolismo celular, además de elucidar los mecanismos por los cuales las mitocondrias estarían ejerciendo sus efectos. Sería destacable también utilizar modelos animales para evaluar la reproducibilidad y con ello su potencial como estrategia terapéutica en la OA, la variabilidad entre los efectos del nuevo donante mitocondrial y los donantes clásicos utilizados y la respuesta inmune.

Bibliografía

Al Amir Dache, Z., Otandault, A., Tanos, R., Pastor, B., Meddeb, R., Sanchez, C., Arena, G., Lasorsa, L., Bennett, A., Grange, T., El Messaoudi, S., Mazard, T., Prevostel, C., & Thierry, A. R. (2020). Blood contains circulating cell-free respiratory competent mitochondria. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(3), 3616-3630. <https://doi.org/10.1096/fj.201901917RR>

Arra, M., Swarnkar, G., Ke, K., Otero, J. E., Ying, J., Duan, X., Maruyama, T., Rai, M. F., O'Keefe, R. J., Mbalaviele, G., Shen, J., & Abu-Amer, Y. (2020). LDHA-mediated ROS generation in chondrocytes is a potential therapeutic target for osteoarthritis. *Nature Communications*, 11(1), 3427. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17242-0>

Bačenková, D., Trebuňová, M., Demeterová, J., & Živčák, J. (2023). Human Chondrocytes, Metabolism of Articular Cartilage, and Strategies for Application to Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms242317096>

Bai, R.-J., Li, Y.-S., & Zhang, F.-J. (2022). Osteopontin, a bridge links osteoarthritis and osteoporosis. *Frontiers in Endocrinology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1012508>

Borcherding, N., & Brestoff, J. R. (2023). The power and potential of mitochondria transfer. *Nature*, 623(7986), 283-291. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06537-z>

Boudreau, L. H., Duchez, A.-C., Cloutier, N., Soulet, D., Martin, N., Bollinger, J., Paré, A., Rousseau, M., Naika, G. S., Lévesque, T., Laflamme, C., Marcoux, G., Lambeau, G., Farndale, R. W., Pouliot, M., Hamzeh-Cognasse, H., Cognasse, F., Garraud, O., Nigrovic, P. A., ... Boilard, E. (2014). Platelets release mitochondria serving as substrate for bactericidal group IIA-secreted phospholipase A2 to promote inflammation. *Blood*, 124(14), 2173-2183. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-573543>

Bourebaba, L., Kornicka-Garbowska, K., Galuppo, L., & Marycz, K. (2022). Artificial Mitochondrial Transfer (AMT) for the Management of Age-related Musculoskeletal Degenerative Disorders: An Emerging Avenue for Bone and Cartilage Metabolism Regulation. *Stem Cell Reviews and Reports*, 18(6), 2195-2201. <https://doi.org/10.1007/s12015-022-10357-5>

Caicedo, A., Fritz, V., Brondello, J.-M., Ayala, M., Dennemont, I., Abdellaoui, N., de Fraipont, F., Moisan, A., Prouteau, C. A., Boukhaddaoui, H., Jorgensen, C., & Vignais, M.-L. (2015). MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Scientific Reports*, 5(1), 9073. <https://doi.org/10.1038/srep09073>

Cereceda, L., Cardenas, J. C., Khoury, M., Silva-Pavez, E., & Hidalgo, Y. (2024). Impact of platelet-derived mitochondria transfer in the metabolic profiling and progression of metastatic MDA-MB-231 human triple-negative breast cancer cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1324158>

Chang, J.-C., Wu, S.-L., Liu, K.-H., Chen, Y.-H., Chuang, C.-S., Cheng, F.-C., Su, H.-L., Wei, Y.-H., Kuo, S.-J., & Liu, C.-S. (2016). Allogeneic/xenogeneic transplantation of peptide-labeled mitochondria in Parkinson's disease: Restoration of mitochondria functions and attenuation of 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Translational Research: The*

Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 170, 40-56.e3.
<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2015.12.003>

Chen, R., & Chen, J. (2024). Mitochondrial transfer—A novel promising approach for the treatment of metabolic diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1346441>

Chou, C.-H., Jain, V., Gibson, J., Attarian, D. E., Haraden, C. A., Yohn, C. B., Laberge, R.-M., Gregory, S., & Kraus, V. B. (2020). Synovial cell cross-talk with cartilage plays a major role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Scientific Reports*, 10(1), 10868. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67730-y>

Cillero-Pastor, B., Rego-Pérez, I., Oreiro, N., Fernandez-Lopez, C., & Blanco, F. J. (2013). Mitochondrial respiratory chain dysfunction modulates metalloproteases -1, -3 and -13 in human normal chondrocytes in culture. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 14(1), 235. <https://doi.org/10.1186/1471-2474-14-235>

Cloer, C. M., Givens, C. S., Buie, L. K., Rochelle, L. K., Lin, Y.-T., Popa, S., Shelton, R. V. M., Zhan, J., Zimmerman, T. R., Jones, B. G., Lesesne, Z., Hogan, S. S., & Petersen, T. H. (2023). Mitochondrial transplant after ischemia reperfusion promotes cellular salvage and improves lung function during ex-vivo lung perfusion. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 42(5), 575-584. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2023.01.002>

Court, A. C., Le-Gatt, A., Luz-Crawford, P., Parra, E., Aliaga-Tobar, V., Bátiz, L. F., Contreras, R. A., Ortúzar, M. I., Kurte, M., Elizondo-Vega, R., Maracaja-Coutinho, V., Pino-Lagos, K., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2020). Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO Reports*, 21(2), e48052. <https://doi.org/10.15252/embr.201948052>

D'Amato, M., Morra, F., Di Meo, I., & Tiranti, V. (2023). Mitochondrial Transplantation in Mitochondrial Medicine: Current Challenges and Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 1969. <https://doi.org/10.3390/ijms24031969>

Descalzi Cancedda, F., Gentili, C., Manduca, P., & Cancedda, R. (1992). Hypertrophic chondrocytes undergo further differentiation in culture. *Journal of Cell Biology*, 117(2), 427-435. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.2.427>

Ding, Y., Gui, X., Chu, X., Sun, Y., Zhang, S., Tong, H., Ju, W., Li, Y., Sun, Z., Xu, M., Li, Z., Andrews, R. K., Gardiner, E. E., Zeng, L., Xu, K., & Qiao, J. (2023). MTH1 protects platelet mitochondria from oxidative damage and regulates platelet function and thrombosis. *Nature Communications*, 14(1), 4829. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-40600-7>

Emani, S. M., Piekarski, B. L., Harrild, D., Nido, P. J. del, & McCully, J. D. (2017). Autologous mitochondrial transplantation for dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 154(1), 286-289. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2017.02.018>

Fahey, M., Bennett, M., Thomas, M., Montney, K., Vivancos-Koopman, I., Pugliese, B., Browning, L., Bonassar, L. J., & Delco, M. (2022). Mesenchymal stromal cells donate mitochondria to articular chondrocytes exposed to mitochondrial, environmental, and mechanical stress. *Scientific Reports*, 12(1), 21525. <https://doi.org/10.1038/s41598-022->

Garcia-Souza, L. F., & Oliveira, M. F. (2014). Mitochondria: Biological roles in platelet physiology and pathology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *50*, 156-160. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.02.015>

Giorgino, R., Albano, D., Fusco, S., Peretti, G. M., Mangiavini, L., & Messina, C. (2023). Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/ijms24076405>

Grichine, A., Jacob, S., Eckly, A., Villaret, J., Joubert, C., Appaix, F., Pezet, M., Ribba, A.-S., Denarier, E., Mazzega, J., Rinckel, J.-Y., Lafanechère, L., Elena-Herrmann, B., Rowley, J. W., & Sadoul, K. (2023). The fate of mitochondria during platelet activation. *Blood Advances*, *7*(20), 6290-6302. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023010423>

Guo, Y., Chi, X., Wang, Y., Heng, B. C., Wei, Y., Zhang, X., Zhao, H., Yin, Y., & Deng, X. (2020). Mitochondria transfer enhances proliferation, migration, and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell and promotes bone defect healing. *Stem Cell Research & Therapy*, *11*(1), 245. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01704-9>

Jin, P., Pan, Q., Lin, Y., Dong, Y., Zhu, J., Liu, T., Zhu, W., & Cheng, B. (2023). Platelets Facilitate Wound Healing by Mitochondrial Transfer and Reducing Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2023*, 2345279. <https://doi.org/10.1155/2023/2345279>

Kim, S., Kim, Y., Yu, S.-H., Lee, S.-E., Park, J. H., Cho, G., Choi, C., Han, K., Kim, C.-H., & Kang, Y. C. (2022). Platelet-derived mitochondria transfer facilitates wound-closure by modulating ROS levels in dermal fibroblasts. *Platelets*, *34*(1), 2151996. <https://doi.org/10.1080/09537104.2022.2151996>

Korpershoek, J. V., Rijkers, M., Wallis, F. S. A., Dijkstra, K., Te Raa, M., de Knijff, P., Saris, D. B. F., & Vonk, L. A. (2022). Mitochondrial Transport from Mesenchymal Stromal Cells to Chondrocytes Increases DNA Content and Proteoglycan Deposition In Vitro in 3D Cultures. *Cartilage*, *13*(4), 133-147. <https://doi.org/10.1177/19476035221126346>

Krawetz, R. J., Wu, Y. E., Bertram, K. L., Shonak, A., Masson, A. O., Ren, G., Leonard, C., Kapoor, M., Matyas, J. R., & Salo, P. T. (2022). Synovial mesenchymal progenitor derived aggrecan regulates cartilage homeostasis and endogenous repair capacity. *Cell Death & Disease*, *13*(5), 470. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04919-1>

Lee, A. R., Woo, J. S., Lee, S.-Y., Na, H. S., Cho, K.-H., Lee, Y. S., Lee, J. S., Kim, S. A., Park, S.-H., Kim, S. J., & Cho, M.-L. (2022). Mitochondrial Transplantation Ameliorates the Development and Progression of Osteoarthritis. *Immune Network*, *22*(2), e14. <https://doi.org/10.4110/in.2022.22.e14>

Léger, J. L., Soucy, M.-F. N., Veilleux, V., Foulem, R. D., Robichaud, G. A., Surette, M. E., Allain, E. P., & Boudreau, L. H. (2022). Functional platelet-derived mitochondria induce the release of human neutrophil microvesicles. *EMBO Reports*, *23*(11), e54910. <https://doi.org/10.15252/embr.202254910>

Levoux, J., Prola, A., Lafuste, P., Gervais, M., Chevallier, N., Koumaiha, Z., Kefi, K., Braud, L., Schmitt, A., Yacia, A., Schirmann, A., Hersant, B., Sid-Ahmed, M., Ben Larbi, S., Komrskova, K., Rohlena, J., Relaix, F., Neuzil, J., & Rodriguez, A.-M. (2021). Platelets Facilitate the Wound-Healing Capability of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer and Metabolic Reprogramming. *Cell Metabolism*, 33(2), 283-299.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.12.006>

Li, S., Cao, P., Chen, T., & Ding, C. (2023). Latest insights in disease-modifying osteoarthritis drugs development. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 15, 1759720X231169839. <https://doi.org/10.1177/1759720X231169839>

Lin, R.-Z., Im, G.-B., Luo, A. C., Zhu, Y., Hong, X., Neumeyer, J., Tang, H.-W., Perrimon, N., & Melero-Martin, J. M. (2024). Mitochondrial transfer mediates endothelial cell engraftment through mitophagy. *Nature*, 629(8012), 660-668. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07340-0>

Liu, D., Cai, Z.-J., Yang, Y.-T., Lu, W.-H., Pan, L.-Y., Xiao, W.-F., & Li, Y.-S. (2022). Mitochondrial quality control in cartilage damage and osteoarthritis: New insights and potential therapeutic targets. *Osteoarthritis and Cartilage*, 30(3), 395-405. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2021.10.009>

Liu, D., Gao, Y., Liu, J., Huang, Y., Yin, J., Feng, Y., Shi, L., Meloni, B. P., Zhang, C., Zheng, M., & Gao, J. (2021). Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 1-18. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00440-z>

Ma, H., Jiang, T., Tang, W., Ma, Z., Pu, K., Xu, F., Chang, H., Zhao, G., Gao, W., Li, Y., & Wang, Q. (2020). Transplantation of platelet-derived mitochondria alleviates cognitive impairment and mitochondrial dysfunction in db/db mice. *Clinical Science*, 134(16), 2161-2175. <https://doi.org/10.1042/CS20200530>

Masuzawa, A., Black, K. M., Pacak, C. A., Ericsson, M., Barnett, R. J., Drumm, C., Seth, P., Bloch, D. B., Levitsky, S., Cowan, D. B., & McCully, J. D. (2013). Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 304(7), H966-H982. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00883.2012>

Matas, J., Orrego, M., Amenabar, D., Infante, C., Tapia-Limonchi, R., Cadiz, M. I., Alcayaga-Miranda, F., González, P. L., Muse, E., Khoury, M., Figueroa, F. E., & Espinoza, F. (2019). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) for Knee Osteoarthritis: Repeated MSC Dosing Is Superior to a Single MSC Dose and to Hyaluronic Acid in a Controlled Randomized Phase I/II Trial. *Stem Cells Translational Medicine*, 8(3), 215-224. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0053>

McCully, J. D., Cowan, D. B., Pacak, C. A., Toumpoulis, I. K., Dayalan, H., & Levitsky, S. (2009). Injection of isolated mitochondria during early reperfusion for cardioprotection. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 296(1), H94-H105. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00567.2008>

Needs, H. I., Glover, E., Pereira, G. C., Witt, A., Hübner, W., Dodding, M. P., Henley, J. M., & Collinson, I. (2024). Rescue of mitochondrial import failure by intercellular organellar

transfer. *Nature Communications*, 15(1), 988. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45283-2>
Partridge, L., Deelen, J., & Slagboom, P. E. (2018). Facing up to the global challenges of ageing. *Nature*, 561(7721), 45-56. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0457-8>

Primorac, D., Molnar, V., Rod, E., Jeleč, Ž., Čukelj, F., Matišić, V., Vrdoljak, T., Hudetz, D., Hajsok, H., & Borić, I. (2020). Knee Osteoarthritis: A Review of Pathogenesis and State-Of-The-Art Non-Operative Therapeutic Considerations. *Genes*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/genes11080854>

Qi, Z., Zhu, J., Cai, W., Lou, C., & Li, Z. (2023). The role and intervention of mitochondrial metabolism in osteoarthritis. *Molecular and Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1007/s11010-023-04818-9>

Rim, Y. A., Nam, Y., & Ju, J. H. (2020). The Role of Chondrocyte Hypertrophy and Senescence in Osteoarthritis Initiation and Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2358. <https://doi.org/10.3390/ijms21072358>

Rustom, A., Saffrich, R., Markovic, I., Walther, P., & Gerdes, H.-H. (2004). Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5660), 1007-1010. <https://doi.org/10.1126/science.1093133>

Shi, C., Guo, H., & Liu, X. (2021). Platelet Mitochondria Transplantation Rescues Hypoxia/Reoxygenation-Induced Mitochondrial Dysfunction and Neuronal Cell Death Involving the FUNDC2/PIP3/Akt/FOXO3a Axis. *Cell Transplantation*, 30, 9636897211024210. <https://doi.org/10.1177/09636897211024210>

Singh, P., Marcu, K. B., Mary B. Goldring, & Otero, M. (2019). Phenotypic instability of chondrocytes in osteoarthritis: On a path to hypertrophy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1442(1), 17-34. <https://doi.org/10.1111/nyas.13930>

Spurgeon, B. E. J., Linden, M. D., Michelson, A. D., & Frelinger, A. L. (2021). Immunophenotypic Analysis of Platelets by Flow Cytometry. *Current Protocols*, 1(6), e178. <https://doi.org/10.1002/cpz1.178>

Steinmetz, J. D., Culbreth, G. T., Haile, L. M., Rafferty, Q., Lo, J., Fukutaki, K. G., Cruz, J. A., Smith, A. E., Vollset, S. E., Brooks, P. M., Cross, M., Woolf, A. D., Hagins, H., Abbasi-Kangevari, M., Abedi, A., Ackerman, I. N., Amu, H., Antony, B., Arabloo, J., ... Kopec, J. A. (2023). Global, regional, and national burden of osteoarthritis, 1990–2020 and projections to 2050: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*, 5(9), e508-e522. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(23\)00163-7](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(23)00163-7)

Taninaka, A., Kabata, T., Hayashi, K., Kajino, Y., Inoue, D., Ohmori, T., Ueoka, K., Yamamuro, Y., Kataoka, T., Saiki, Y., Yanagi, Y., Ima, M., Iyobe, T., & Tsuchiya, H. (2023). Chondroprotective Effects of Chondrogenic Differentiated Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Sheet on Degenerated Articular Cartilage in an Experimental Rabbit Model. *Bioengineering*, 10(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10050574>

Thomas, M. A., Fahey, M. J., Pugliese, B. R., Irwin, R. M., Antonyak, M. A., & Delco, M. L. (2022). Human mesenchymal stromal cells release functional mitochondria in extracellular vesicles. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 870193. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.870193>

Valenti, D., Vacca, R. A., Moro, L., & Atlante, A. (2021). Mitochondria Can Cross Cell Boundaries: An Overview of the Biological Relevance, Pathophysiological Implications and Therapeutic Perspectives of Intercellular Mitochondrial Transfer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8312. <https://doi.org/10.3390/ijms22158312>

Wang, R., Maimaitijuma, T., Ma, Y.-Y., Jiao, Y., & Cao, Y.-P. (2020). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells to chondrocytes protects against cartilage degenerative mitochondrial dysfunction in rats chondrocytes. *Chinese Medical Journal*, 134(2), 212-218. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000001057>

Wu, X., Liyanage, C., Plan, M., Stark, T., McCubbin, T., Barrero, R. A., Batra, J., Crawford, R., Xiao, Y., & Prasad, I. (2023). Dysregulated energy metabolism impairs chondrocyte function in osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 31(5), 613-626. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2022.11.004>

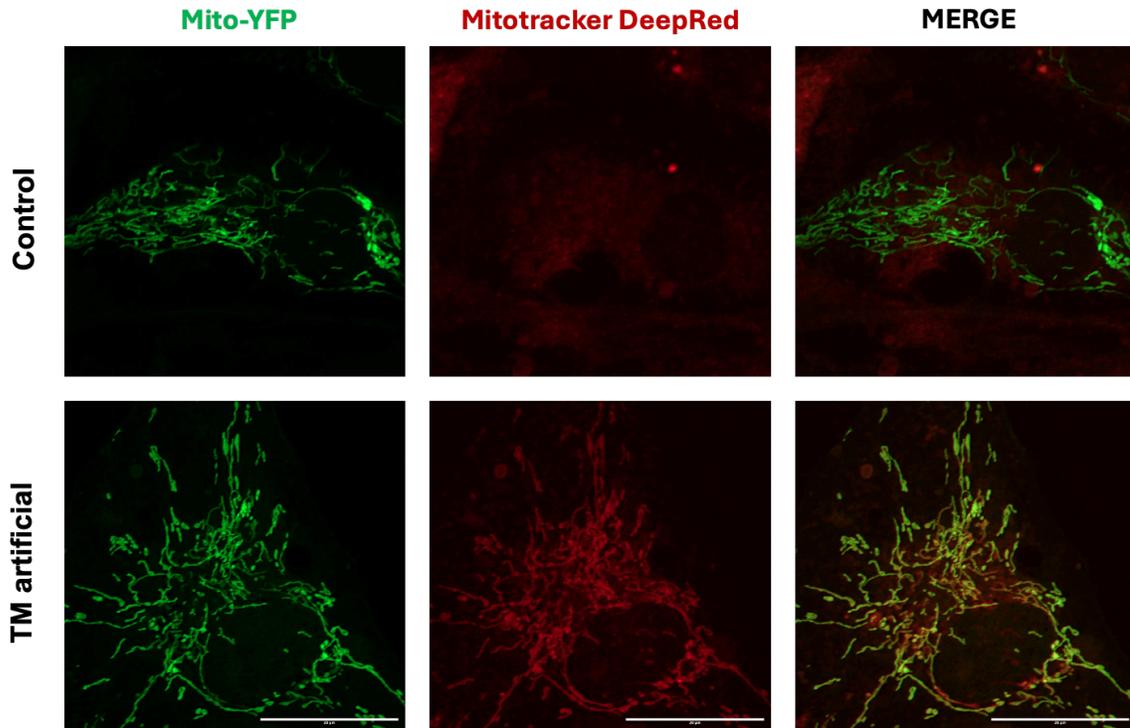
Yamada, Y., Ito, M., Arai, M., Hibino, M., Tsujioka, T., & Harashima, H. (2020). Challenges in Promoting Mitochondrial Transplantation Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6365. <https://doi.org/10.3390/ijms21176365>

Zhang, X., & Hartmann, P. (2023). How to calculate sample size in animal and human studies. *Frontiers in Medicine*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1215927>

Zhao, Z., Zhang, J., & Dong, J. (2021). Platelets fuel mesenchymal stem cells by providing live mitochondria. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 19(7), 1603-1606. <https://doi.org/10.1111/jth.15295>

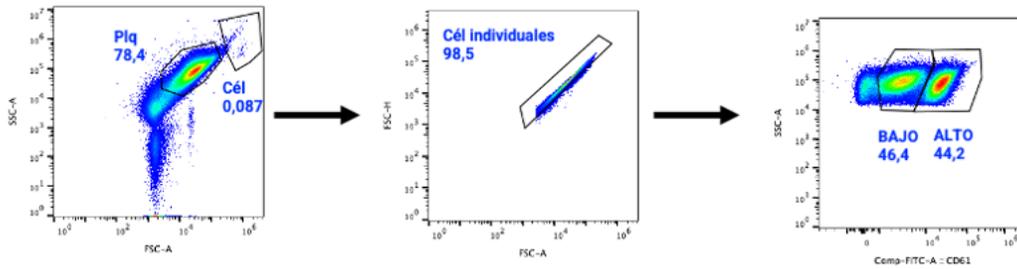
Zong, Y., Li, H., Liao, P., Chen, L., Pan, Y., Zheng, Y., Zhang, C., Liu, D., Zheng, M., & Gao, J. (2024). Mitochondrial dysfunction: Mechanisms and advances in therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 1-29. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01839-8>

Anexos

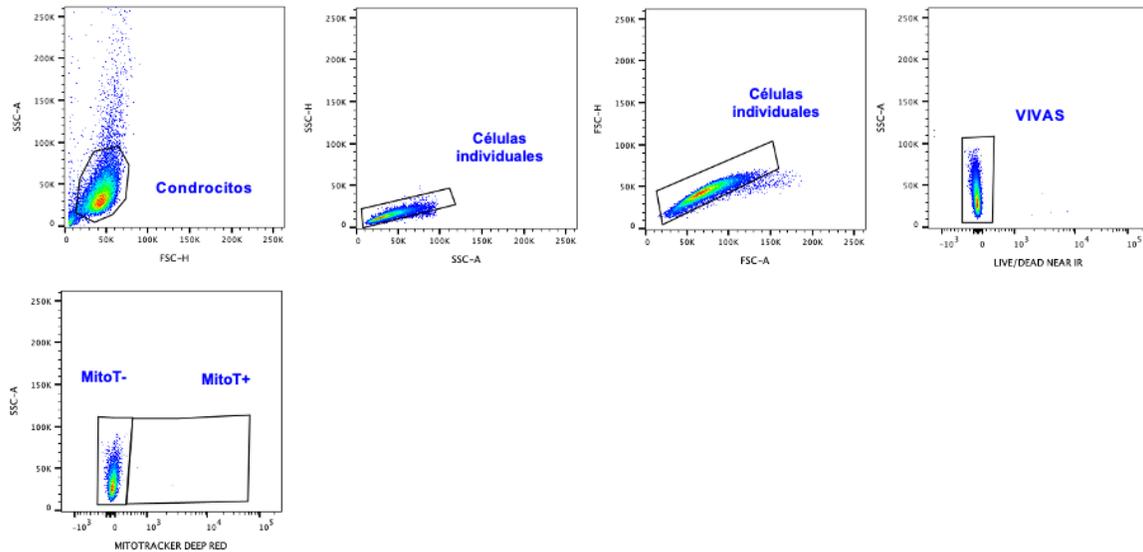


Anexo 1. Condrocitos derivados de pacientes son capaces de internalizar mitocondrias de plaquetas.

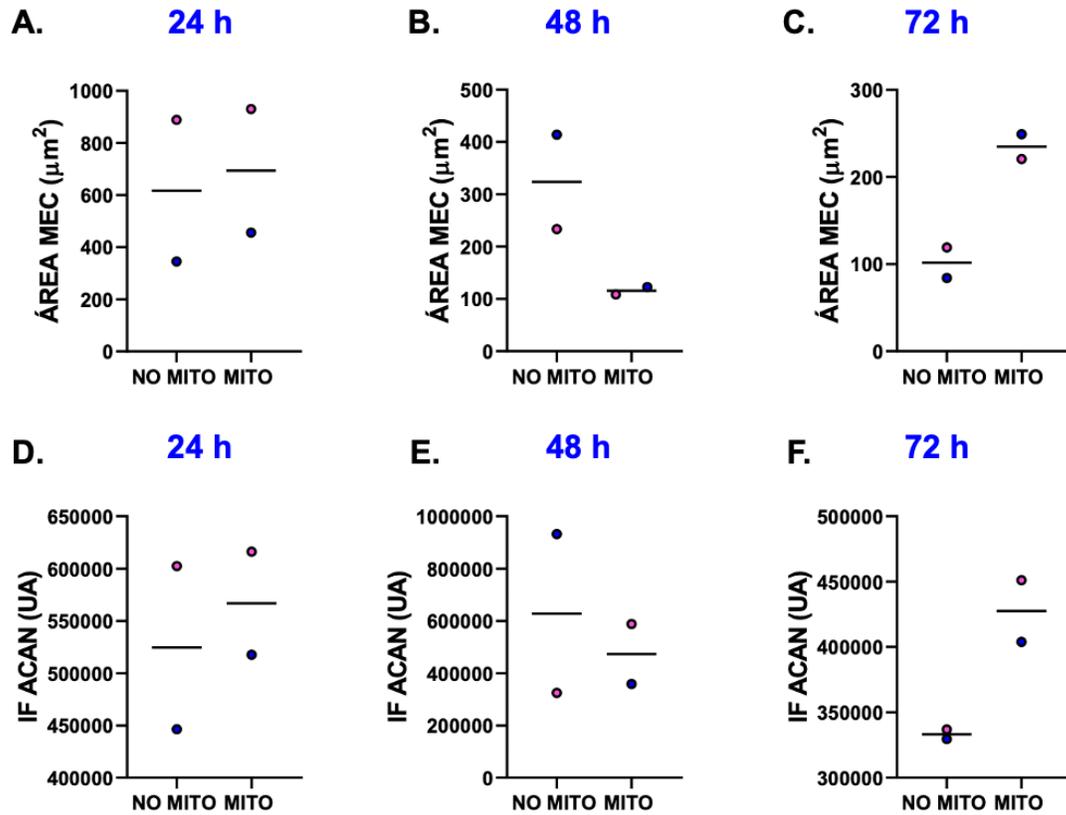
Para evaluar si los condrocitos derivados de pacientes con OA son capaces de internalizar mitocondrias derivadas de plaquetas, se realizó la TM artificial con el protocolo de mitocepción. Para determinar la fuente mitocondrial, se transfectaron los condrocitos con un plasmidio mito-dirigido (MITO-YFP). En los paneles superiores se observa la condición control, sin adición de mitocondrias exógenas. En los paneles inferiores se observa la condición con TM artificial de mitocondrias plaquetas. Mitocondrias de condrocitos (plasmidio MITO-YFP, en verde). Mitocondrias derivadas de plaquetas (Mitotracker Deep Red, en rojo). Barra de escala = 20 μ M. La imágenes fueron adquiridas en el microscopio confocal Zeiss LSM 900 con módulo Airyscan 2.



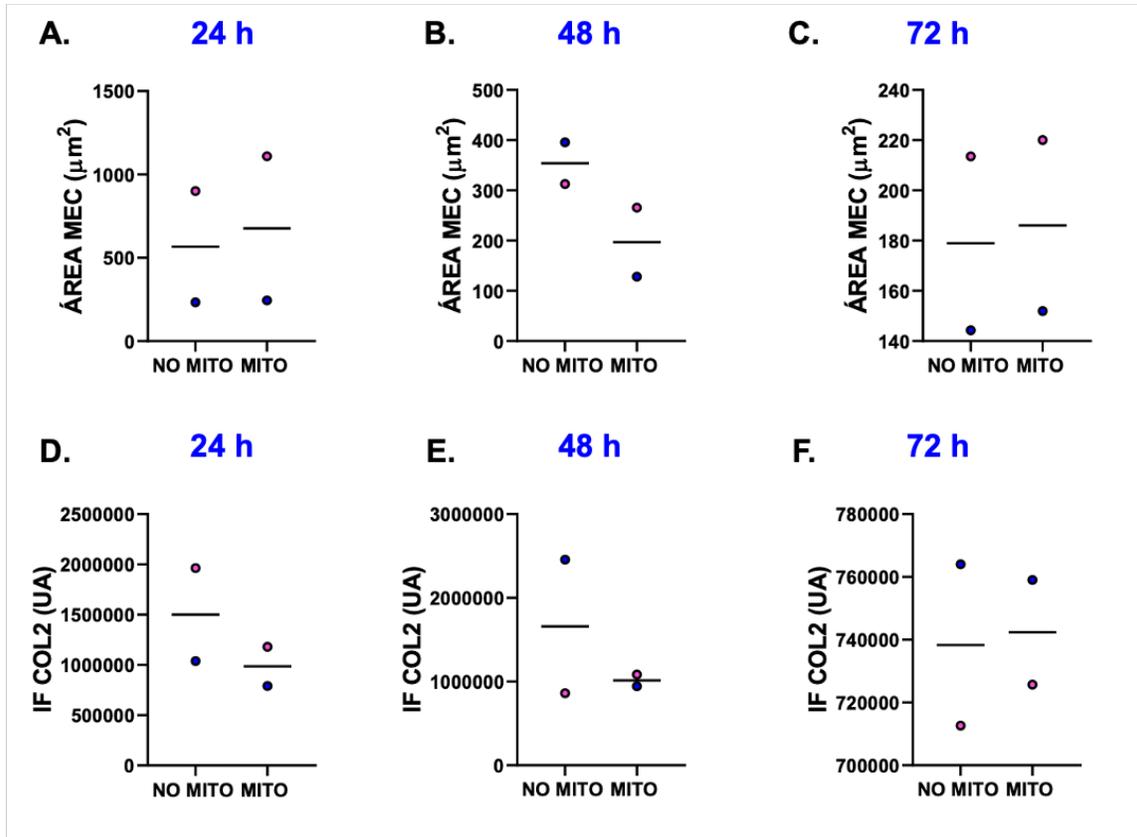
Anexo 2. Estrategia de análisis para determinar el enriquecimiento de plaquetas. Se presenta la estrategia de umbrales para el análisis de los eventos de obtenidos en el enriquecimiento de plaquetas, de izquierda a derecha, se identifica la subpoblación de plaquetas (Plq) y células (Cél) a partir de la dispersión lateral (SSC) en base a la dispersión frontal (FSC). A partir de la población de plaquetas, se identifican las células individuales de acuerdo con FSC, luego se identifican las poblaciones positivas a CD61, en este umbral se determinan dos umbrales correspondientes a la baja expresión de CD61 (bajo) y alta expresión de CD61 (alto). En azul se indican los umbrales utilizados para el análisis.



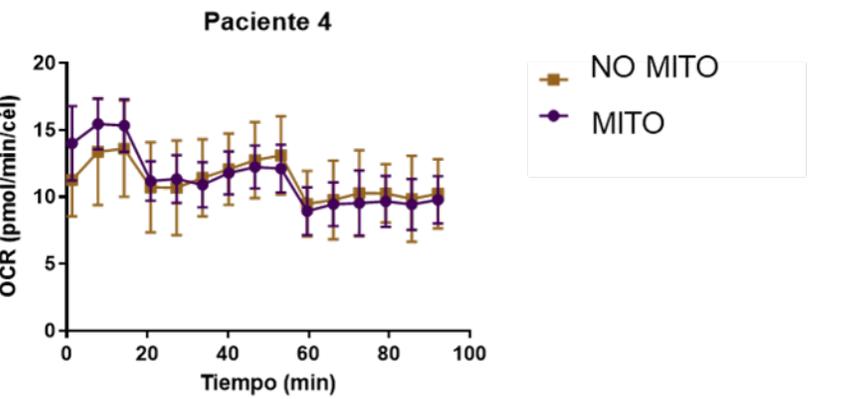
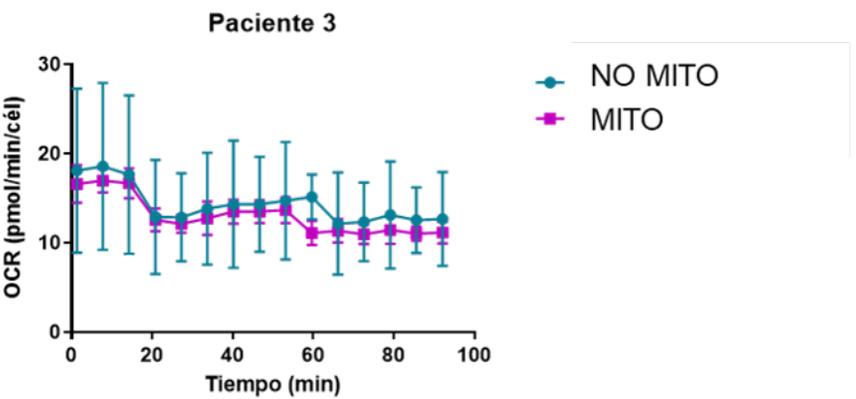
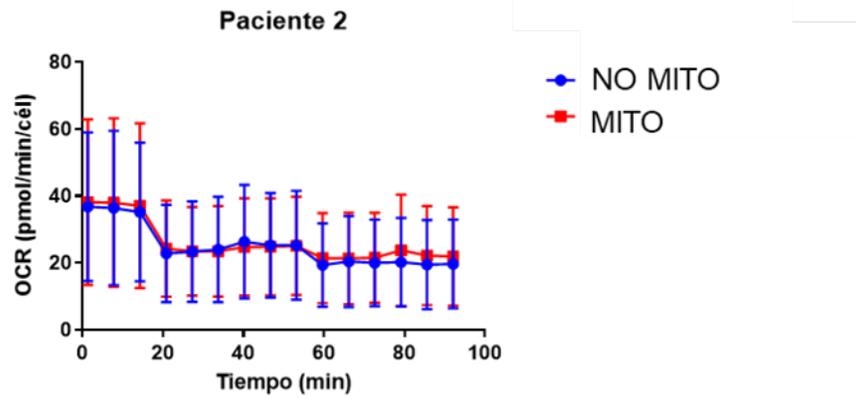
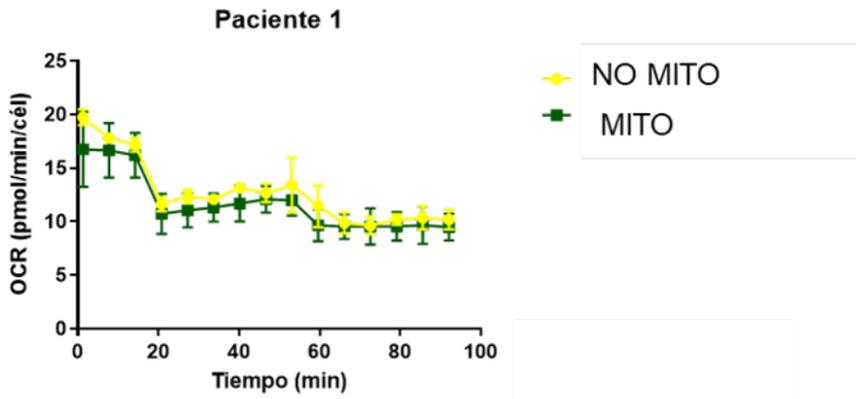
Anexo 3. Estrategia de análisis de internalización de mitocondrias plaquetas en condrocitos derivados de pacientes en citometría de flujo. Se presenta la estrategia de umbrales para el análisis de los eventos de condrocitos de interés, de izquierda a derecha, se identifica a la subpoblación de condrocitos, luego la subpoblación de células individuales en función de la dispersión lateral (SSC), células individuales de acuerdo a la dispersión frontal (FSC), la población de células vivas (Sonda LIVE/DEAD NEAR IR) y las subpoblaciones de condrocitos sin mitocondrias de plaquetas (MitoT-) y con mitocondrias (MitoT+). En azul se indican los umbrales utilizados para el análisis.



Anexo 4. Cuantificación de ACAN por paciente posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas en condrocitos derivados de pacientes con OA. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia obtenida por paciente para la señal de ACAN en condiciones control (NO MITO, en gris) y con TM artificial (MITO, en morado). **(A-C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (IF) de acuerdo con el área de la señal por célula de **(A)** 24 h. **(B)** 48 h. **(C)** 72 h. **(D-F)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total asociada al canal de ACAN a **(D)** 24 h. **(E)** 48 h. **(F)** 72 h. Cada color corresponde a un paciente. Resultados expresados como media. N = 2.



Anexo 5. Cuantificación la expresión de COL2 por paciente en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial de mitocondrias de plaquetas. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia (IF) obtenida por paciente para la señal de COL2 en condiciones control (NO MITO, en gris) y con TM artificial (MITO, morado). **(A-C)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de acuerdo con el área de la señal por célula a **(A)** 24 h. **(B)** 48 h. **(C)** 72 h. **(D-F)** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia total asociada al canal de COL2 a **(D)** 24 h. **(E)** 48 h. **(F)** 72 h. Cada color corresponde a un paciente. Resultados expresados como media. N = 2.



Anexo 5. Análisis por paciente del OCR en condrocitos derivados de pacientes con OA posterior a la TM artificial. Medición del OCR en condrocitos derivados de pacientes con OA en una condición control (NO MITO) y con TM artificial en una proporción de 1:100 (MITO) tras 24 h. **(A)** Gráfico representativo de la medición de OCR durante la prueba de Mito-estrés, se indica la inyección de 2 μ M oligomicina (OLIGO), 2,5 μ M FCCP, 0,5 μ M Rotenona/Antimicina (Rot/AA), los datos se presentan como media \pm desviación estándar **(A)** Paciente 1. **(B)** Paciente 2. **(C)** Paciente 3. **(D)** Paciente 4.