

Universidad Nacional Autónoma de México



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Evaluación por citometría de flujo de la transferencia génica mediante adenovirus en células aisladas de cartílago articular de caballo”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

VALENTÍN MARTÍNEZ LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ

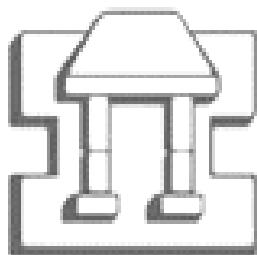
REVISORES DE TESIS:

DR. J. CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN

DR. DIEGO J. ARENAS ARANDA

M. EN C. RAMÓN V. MORENO TORRES

DR. SERGIO VACA PACHECO



Iztacala

LOS REYES IZTACALA , EDO. DE MÉXICO NOVIEMBRE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicatoria

A mis Padres: María Eugenia y Luis, esta meta es fruto de su infinita paciencia, confianza, aliento y amor, los cuales no podré retribuir jamás y de ninguna forma.

A mi Hermano: Juan Antonio, por su forma singular de motivarme, ayudarme y expresar su cariño.

A mis Hermanas: Agelina, Luz y Francisca.

A toda la Familia: Sobrinas (os), primos (as), y tíos (as)

Agradecimientos

Dr. Clemente Ibarra Ponce de León, ya que me permitió llevar a cabo esta tesis en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Centro Nacional de Rehabilitación, Sector Salud, por haberme hecho sentirme parte del mismo, permitirme participar en los proyectos del laboratorio, su revisión del trabajo y sobre todo su cálida amistad.

M. en C. Cristina Velasquillo Martínez, por haberme aceptado y recibido en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos. El permitirme realizar este trabajo bajo su dirección. A la gran paciencia, ayuda, innumerables enseñanzas e impulso para llegar al fin, a toda a su confianza, que espero no defraudar.

Dr. Andrés A. Gutiérrez López y a toda la Unidad de Terapia Celular, en primera instancia por el haber facilitado el Adenovirus-EGFP para este trabajo, y por la accesoria técnica, sus comentarios y su amistad.

Dr. Diego J. Arenas Aranda, M. en C. Ramón V. Moreno Torres y Dr. Sergio Vaca Pacheco, por su revisión de este trabajo y a sus comentarios al mismo.

M. en C., M. V. Z. Germán Lombardero Goldaracena, por su ayuda en la obtención de las muestras y a la fraternidad demostrada durante el tiempo compartido en el trabajo.

M. en C., M. V. Z. María Masri Daba, por su ayuda en la obtención de las muestras y su apoyo para la beca de PAPIIT.

A los todos mis Compañeros: Hugo, Rigoberto, Octavio y a los “Juanos” (as) por su amistad y compañía durante la carrera

A todas mis compañeras: Ana, Clara, Elisa, Wendy por su amistad y compañía durante la carrera

A mis Amigos : Cesar, Miguel, Nazario y Raúl.

Índice

I. Introducción	
A. Terapia génica	1
B. Vectores en terapia génica	1-2
C. Vectores adenovirales	2-3
D. Marcadores de transfección: Green fluorescent protein (GFP)	3
E. Citometría de flujo	3-4
F. Lesiones y enfermedades articulares	4-5
II. Antecedentes	6-7
III. Objetivo General	8
IV. Objetivos Particulares	8
V. Material y Métodos	
A. Aislamiento de células articulares de caballo	9
B. Infección celular de Adenovirus- EGFP	9-10
C. Análisis de la expresión de EGFP y evaluación del ciclo celular	10
VI. Resultados	11-14
VII. Discusión	15-18
VIII. Conclusiones	19
IX. Referencias	20

I. Introducción

A. Terapia génica e ingeniería de tejidos

En los últimos quince años la terapia génica se desarrollo en el campo de la investigación, debido al avance en la clonación y manipulación de genes, con el fin de entender los aspectos biológicos relacionados con estos (Robbins D. P., 1998). Mas aun, se ha trasladado a la clínica con el tratamiento de una gran variedad de enfermedades genéticas, como por ejemplo, la fibrosis quística, la deficiencia de adenosin deaminasa (ADA), o enfermedades degenerativas como osteoartritis, artritis, cáncer, hipertensión, arterosclerosis, diabetes, etc (Russell J.S., 1997).

La terapia génica puede definirse como el tratamiento o prevención de enfermedades, mediante la transferencia de genes terapéuticos a células somáticas o estaminales. Actualmente existen dos tipos de estrategias, el método directo o *in vivo* y el indirecto o *ex vivo*. El método *in vivo* implica la inyección directa de un cassette de expresión, compuesto por uno o más genes y un elemento regulador; mediante un vector estos componentes son directamente expuestos a las células o tejido blanco (Russell J.S., 1997). En el método indirecto las células blanco son modificadas en el laboratorio para su posterior administración o trasplante al individuo receptor (Crystal G.R., 1995). El método *ex vivo* puede combinarse con otra disciplina innovadora, la ingeniería de tejidos, que implica la utilización de materiales biológicos o sintéticos, biodegradables y biocompatibles, sembradas con células, modificadas o no genéticamente, para crear trasplantes biológicos que restauren, mantengan y/o mejoren la funcionalidad del tejido (Vacanti J.P. and Langer R. 1999).

B. Vectores en terapia génica

Una de las mayores limitantes en terapia génica es la habilidad de liberar de manera eficiente el apropiado gen al tejido o célula deseado, por lo que resulta de gran trascendencia el vector para tal propósito (Robbins D. P., et al., 1998). Un vector, es un vehículo que transporta y libera de manera eficiente y precisa el gen o genes terapéuticos, junto con un elemento regulador dentro de las células blanco de interés (Russell J.S. 1997). El vector ideal debe ser capaz de liberar un paquete de expresión con el gen (s) del tamaño necesario para las aplicaciones clínicas, debe de ser específico para las células blanco, no ser reconocido por el sistema inmune, estable y de fácil reproducción, además de ser producido en grandes cantidades y a altas concentraciones; por ultimo debe de ser seguro para el individuo recipiente y su medio ambiente.

Los vectores en terapia génica se agrupan en virales y sintéticos o no virales. Los vectores sintéticos están basados en lípidos o liposomas, partículas virales inactivadas y cristales de fosfato de calcio. Las ventajas que ofrecen estos sistemas de transferencia son el tamaño ilimitado del gene o genes, su relativa facilidad de construcción, causan nula respuesta inflamatoria o inmune, no se replican o recombinan, por lo que no tienen efectos patológicos, ya que su acción es epicromosomal; la principal y gran desventaja de estos vectores es la baja eficiencia en su transferencia de genes y especificidad a ciertas líneas celulares (Crystal G.R., 1995) (Naxin and Ataii, 2000).

En el segundo grupo de vectores en terapia génica se incluyen los virales, cualquier virus puede ser utilizado como vector, siempre y cuando los genes virales se puedan remover, permitan la inserción del gen (s) de interés y sea incapaz de replicarse en las células blanco. Actualmente son cuatro tipos virales empleados en los protocolos de terapia génica: retrovirus, herpes simple virus, adenovirus y virus asociados a adenovirus.

De estos vectores el más utilizado, con un 56%, son los retrovirales, los cuales necesitan células con una alta actividad proliferativa para una infección estable, lo que limita las líneas celulares susceptibles para su uso (Russell J.S., 1997) (Robbins P.D., et al 1998). Su transferencia génica puede ser mantenida durante el tiempo de vida del hospedero, debido a que se integra a su genoma, por lo cual los hace ideales para terapias de cáncer o enfermedades hereditarias. Esta última característica de los vectores basados en retrovirus puede ser contraproducente y de alto riesgo, ya que puede también ser causa de la activación de un oncogene e iniciar un proceso de tumorigénesis. (Friedman T. et al., 2003).

Los vectores basados en Herpes simple virus, permiten la integración de una gran cantidad de genes 30 kb, infectan una gran variedad de células, pero su principal desventaja es la alta toxicidad de algunos genes de la región EI (Immediate early), que también codifica algunos genes implicados en la replicación viral, y aunque se ha reducido dramáticamente la citotoxicidad de estos, se disminuye la capacidad de producir grandes cantidades de virus. (Naxin and Atai, 2000) (Robbins D. P., et al., 1998).

C. Vectores Adenovirales

Los adenovirus humanos son uno de los mejores sistemas vehículos de liberación desarrollados hasta la fecha. La habilidad de los adenovirus de introducir y expresar genes especialmente *in vitro*, ha sido ampliamente demostrada y documentada desde hace 15 años (Russell C. W., 2000).

Los adenovirus pertenecen a la familia *Adenoviridae*, que consta de 3 géneros y 6 subgéneros o subdivisiones A, B, C, D, y F. Su clasificación histórica en serotipos humanos esta basada en criterios inmunológicos. Los serotipos 5 y 2 del subgrupo C son los principalmente utilizados en terapia génica. Su estructura esta compuesta de una capsida proteica icosaédrica de 70-100 nm diámetro, su genoma es de aproximadamente de 36 Kb, es una doble cadena de ADN, en el contexto de la terapia génica el hexón, la fibra y la base pentano son las principales proteínas que conforman la cápsida. (Smith T. N. and Lasic D.D. 2000)

Las unidades de transcripción del genoma viral esta dividido en dos etapas, la temprana y la tardía, la primera a su vez esta separada en cuatro unidades mas, por sus siglas en ingles son : E1, E2A, E3 y E4. En el contexto de la terapia génica para producir adenovirus como vectores las secuencias E1 y E3 son eliminados ($\Delta E1$, $\Delta E3$). La región E1 controla la replicación y expresión de otros genes tempranos, la región E3 no participa en la producción viral, pues codifica en la evasión del sistema inmunológico de hospedero, su eliminación da mayor espacio al vector. De esta forma, los adenovirus $\Delta E1$ y $\Delta E3$ solo se pueden replicar en líneas celulares específicas con la secuencia E1 en su genoma, produciendo partículas virales incapaces de replicarse en las células blanco.

Entre los criterios para la utilización de los adenovirus como vector en la terapia génica se encuentra el poder obtener altos niveles de transducción en una gran variedad de estirpes celulares, incluyendo tanto células en división, como células quiescentes.

Se puede introducir una gran cantidad de secuencias transgénicas más de 10kb. Otra propiedad de los adenovirus es la de poder ser amplificado en altos títulos, dando como resultado preparaciones en grado clínico $\approx 10^3$ partículas virales por mililitro. No se integra al ADN de hospedero, su acción es epicromosomal por lo que en teoría, no modifica el genoma de su célula blanco (Wu N. and Atai M.M., 2000).

D. Marcadores de transfección: Green fluorescent protein (GFP)

Las investigaciones de transferencia genética están centradas en dos categorías, los estudios terapéuticos y de marcación, estos últimos permiten identificar y seguir a las células modificadas genéticamente para monitorear la capacidad de transfección y evaluar su seguridad; así como el destino final de las células infectadas (Ronald C. et al., 1995), para lo cual se utilizan vectores con genes reporteros como la B-Galactocidasa, lucifesa, cloranfenicol acetil transferasa (CAT) y la proteína verde fluorescente (Smith T. et al., 2000). GFP es una proteína de 238 aminoácidos, que absorbe luz azul a una longitud de onda de 395 nm con un pequeño pico a 407 nm, emite luz verde a una longitud de onda de 508 nm, no necesita ningún otro cofactor o sustrato, dado que el cromóforo es generado por una ciclización y oxidación interna de los aminoácidos Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷. El gen de la proteína verde fluorescente se aisló de la medusa *Aequorea victoria*, la clonación de su cADN (*gfp10*) a principios de los sesenta despertó un gran interés, ya que la expresión de este gen, tanto en células procariontes y eucariontes, produce una proteína fluorescente (Cubitt A.B. et al, 1995), por lo que no requiere de ningún otro producto genómico de *A. victoria* para la formación del cromóforo, siendo este producto de una autocatálisis o por uso intrínseco de los componentes celulares. (Chalfie M. et al, 1994)

Por otro lado, *gfp* es un gen pequeño en comparación con otros genes reporteros como β -Galactocidasa o fostranferasa neomisina, que ocupan mucho del espacio dentro del vector. Por esta y las anteriores razones GFP lo hace el reportero ideal en estudios de marcaje, ya que simplemente las células tranfectadas necesita ser irradiadas con luz ultravioleta o luz azul para su detección, tanto *in vitro* como *in vivo* (Chalfie M. et al., 1994)

E. Citometría de Flujo

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrica rutinariamente aplicada en laboratorios de investigación y clínicos. Su fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas normalmente células de forma individual por una fuente de luz (Láser de 480nm). La intersección de cada célula con la luz provoca la emisión de una serie de señales luminosas que permite diferenciar poblaciones celulares por su tamaño relativo, su granularidad relativa y por la intensidad de fluorescencia relativa. Es un método que permite analizar y cuantificar desde cientos hasta millares de células en tan solo unos minutos (5000 partículas/segundo), tiene mayor sensibilidad y objetividad que la microscopía de fluorescencia; además de ser un método de análisis cuantitativo.

De este modo la citometría de flujo puede ser una herramienta muy útil en los estudios *in vitro* de transferencia genética de marcación, ya que una muestra de una población celular transfectada con GFP, emitirá señales de fluorescencia procedentes y de la célula.

Por lo que cada señal de fluorescencia es indicativo de una transfección celular y la intensidad de fluorescencia puede ser proporcional a la cantidad de la proteína generada, por lo que estos datos son detectados y cuantificados por los citómetros de flujo estándar (Cheng L. et al.,1996)

El evaluar la seguridad de la transferencia génica mediante un vector es planteada en cualquier protocolo de terapia génica; un análisis de la cuantificación de ADN por CMF puede ser una alternativa para tal meta, ya que este método es utilizado tanto en estudios de investigación como clínicos para obtener la distribución del ciclo celular y el estado de ploidía tanto en tumores como en otros procesos proliferativos.

En los análisis del contenido de ADN las células son teñidas con un fluorocromo que se intercala de forma constante a las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos, comúnmente se usa el yoduro de propidio, al ser iluminadas con un láser de 480nm las células o núcleos emiten fluorescencia cuya intensidad relativa es directamente proporcional al contenido de ADN. La cantidad de ADN nuclear refleja la posición de una célula dentro del ciclo celular, así las células maduras en las fases G1-G0 que se encuentran en reposo o en la transición hacia la síntesis de ADN poseerán un contenido de DNA igual a 2N o diploide. Durante la fase de S o síntesis en la cual se va duplicando el ADN, incrementándose durante la progresión de esta, las células tienen una cantidad de ADN intermedia entre 2N y 4N. Después de que el ADN se a duplicado, las células entran en la fases llamadas G2-M en la que contienen cuatro copias del genoma 4N o diploide. En este comparativo la CMF puede hacer una discriminación entre las fases G1-G0, S, G2-M por la intensidad de fluorescencia; así las células aneupolides tendrán un cambio en el contenido de ADN mostrando una intensidad de fluorescencia anormal debido al cambio a nivel cromosomal. Por lo la CMF permite conocer la distribución de una población celular a lo largo de las distintas fases del ciclo celular (G1-G0, S, G2-M), así como la existencia o no de aneuploidias de ADN (Darzynkiewicz Z. et al., 2001) (Longonbardi G. A.,1992).

F. Lesiones y enfermedades articulares

El número de pacientes con lesiones en las articulaciones se ha incrementado en los últimos años, principalmente a causa de la expansión de la población mayor y a los numerosos pacientes con lesiones deportivas, siendo las lesiones traumáticas del cartílago un factor que predispone al desarrollo de osteoartritis (Minas T. and Nehrer S. 1997). El problema de este tipo de lesiones y enfermedades es la poca o nula reparación espontanea, debido a que el cartílago articular carece de vasos sanguíneos, no esta enervado y el mecanismo normal de reparación de un tejido, que involucra el reclutamiento de nuevas células en la zona del daño, no ocurre (Hardingham T. et. al., 2002).

Las estrategias terapéuticas en el tratamiento de lesiones articulares y la osteoartritis incluyen la utilización de antiinflamatorios, inyecciones intrarticulares de esteroides u otros agentes, intervenciones quirúrgicas como microfracturas, abrasión por artroplastía, etc, con resultados poco satisfactorios, siendo el común denominador la formación de fibrocartílago, un tejido que no tiene las mismas características físicas, estructurales y fisiológicas del cartílago articular.

Por lo que el tratamiento con células y tejido autólogo ha dado mayores esperanzas en el campo de la reparación condral (Minas T. and Nehrer S. 1997)(Hunziker E.B. 2001).

Recientemente la aplicación de la ingeniería de tejidos en el tratamiento de este tipo de enfermedades ha tenido un gran impacto. El desafío en ingeniería de tejidos para cartílago es el producir un tejido cartilaginoso con la estructura y propiedades parecidas a las *ex vivo*, que pueda ser implantado dentro de la articulación para proveer una reparación condral, además del lograr integrarse al tejido del paciente (Hardingham T. et. al. 2002).

Durante el proceso de creación *in vitro* del tejido, las células deben de ser obtenidas y expandidas a partir de una pequeña muestra, siendo un importante factor el gran número de células para formar el neo- tejido. La expansión de esta población celular puede realizarse en condiciones de cultivo en monocapa, pero durante el proceso los condrocitos, células componentes de cartílago articular, sufren un proceso de desdiferenciación, dando como resultado células alargadas y parecidas a los fibroblastos, quienes pierden su perfil de expresión proteico de la matriz extracelular, de la cual dependen la propiedades físicas del cartílago articular. Varias moléculas, factores de crecimiento y genes son utilizados como condroprotectores o condrogénicos, estos elementos a largo plazo también pudieran conducir a un proceso de desdiferenciación.

Aunque la desdiferenciación no es un sinónimo de un proceso carcinogénico, es un proceso que puede acompañar a el desarrollo de algunas neoplasias en el cartílago articular (Aigner T. and Unni K.K. 1999).

La investigación en la reparación de lesiones condrales con animales de laboratorio es muy amplia, pero no así, utilizando una especie con natural incidencia en enfermedades articulares, por lo que el caballo es una especie ideal para estudios de enfermedades articulares debido a su tamaño, la habilidad de realizar ejercicios controlados y una natural incidencia al igual que el hombre a tener lesiones traumáticas de cartílago, no solo en individuos de edad avanzada, sino también en deportistas (Frisbie D.D. and MacIlwraith W. 2000), por lo tanto, un modelo experimental equino puede ser benéfico para probar protocolos terapéuticos de terapia génica e ingeniería de tejidos en la reparación de lesiones articulares.

De esta manera, el usar células de cartílago articular equino cultivadas *in vitro* con una modificación genética mediante un adenovirus para mejorar sus características condrogénicas, implica el conocer la factibilidad de transfección del vector relacionada con los índices de multiplicidad de infección, utilizando como gen reportero GFP que permite detectar, cuantificar de forma objetiva y rápida las células transfectadas mediante CMF, además de esta manera se puede evaluar la seguridad de la transfección, no solo por el efecto del adenovirus, sino también por el proceso de expansión en cultivo monocapa y el de desdiferenciación; descartando la aparición de un proceso proliferativo mediante un análisis de DNA por CMF en células transfectadas con adenovirus y cultivadas a diferentes pases, para emplear en un futuro estas células en la formación de un neo-tejido de trasplante que repare lesiones articulares.

I. Antecedentes

La transducción de células primarias de cartílago articular ha sido previamente realizada por varios grupos y utilizando varios vectores. Los vectores no vírales han mostrado una baja eficiencia de transducción, los grupos de Dinser (2001) y Goommer (2001) han tratado de mejorar la eficiencia de estos vectores en células primarias de cartílago. El primero grupo utiliza tres diferentes plasmidos bajo el control del mismo promotor que codifican el mismo gen reportero, la variante EGFP (enhancer green fluorescent protein). Utilizando una base no-liposomal llamada Fungene6, la cual incrementa la transfección de los plasmidos, obtienen del 30-40% de células primarias de cartílago articular bovino transfectadas. El segundo grupo combina liposomas catiónicos con ligandos receptores policatiónicos, aumentando la eficiencia de transfección con el gen Lac Z hasta un 70% en células de cartílago articular de conejo, ambos grupos su análisis de células transfectadas es realizado por microscopia. Aunque estos resultados son alentadores aun no logran obtener una población celular totalmente transfectada con los vectores sintéticos.

La búsqueda de mejores porcentajes de transducción lleva a Hirschmann et al. (2002) a probar como alternativa el vector más común, un retrovirus, tomando un EGFP como marcador de transferencia, su grupo utiliza células de cartílago articular de cuatro diferentes especies: humano, cordero, conejo y ternero. Las células de cartílago humano muestran el mayor porcentaje de transducción con un 70%, estos resultados son obtenidos hasta los pases posteriores al tercero debido a la baja actividad proliferativa de los condrocitos. Estas células están modificadas genéticamente permanentemente con este vector retroviral al proliferar, las células hijas lo estarán también, mediante un sorting por CMF, aislaron y obtuvieron una población cien por ciento transfectada que expresaba GFP. Estos vectores el único y gran inconveniente se presenta en un probable proceso tumorigénico, por la integración de su genoma a los cromosomas de su hospedero

Arai y colaboradores (2000) utilizan otro vector, adenovirus asociado, con acción epicromosomal. Células recién aisladas de cartílago articular humano son transfectadas con una variante de GFP como gen reportero, su expresión fue observada por microscopía de fluorescencia durante un periodo de tiempo máximo de siete días. Con 30000 moi's, obteniendo un 95% de células transfectadas. Ulrich-Vinther (2002) emplean el mismo vector y gen reportero un AAV-GFP (adenovirus asociado) para infectar células recién aisladas de cartílago articular humano, las células son irradiadas con luz UV para incrementar el índice de transducción y reducir la cantidad de virus. El análisis de transducción es confirmado por CMF, en el cual muestran índices del 100% de transfección con el tratamiento de 200J/m² y 1000 moi's, sin tratamiento de luz UV solo la mitad de las células expresan GFP, por lo que los dos grupos mencionan que los adenovirus asociados muestran una clara dependencia a altas dosis virales necesitando mas 10³mois, pero Ulrich-Vinther al irradiar las células con UV para mejorar la transferencia de genes, tienen el riesgo de la aparición de neoplasias por la tautomerización de bases de ADN o la generación de radicales libres.

Los adenovirus han sido utilizados en estudios preclínicos de terapia génica tanto en problemas de artritis reumatoide como de osteoartritis, y el uso de este vector a sido exitoso en la liberación de genes tanto en tejidos intrarticulares incluyendo el sinovial, meniscos, ligamentos y cartílago (Evans H.C., et al., 2001). Los estudios realizados en cartílago, las células provienen de una gran variedad de fuentes, en humano, son tomadas tanto del hombro como de la rodilla, al igual que de líneas celulares ya establecidas, también se han liberado genes en condrocitos articulares tomadas del hombro, rodilla o de las costillas de conejo, cerdo y bovinos.

Todos los estudios con adenovirus como vector, el principal gen utilizado para comprobar la transfección es Lac Z, que codifica la enzima β -Galactosidasa, posteriormente las células son teñidas con el sustrato X gal y visualizadas por microscopia óptica, de este modo se estima los porcentajes de transducción. Los grupos de Arai (1997) y Shuler (2000) reportan que al utilizar 50 moi's se obtiene la mayoría o prácticamente todas las células son transfectadas. Otros dos grupos el de Smith y Doherty mencionan la utilización de adenovirus con el gen Lac Z, pero con mayor número de moi's, 300 y 1000 respectivamente con este reportero.

El trabajo realizado por Dinser (2001) y colaboradores utilizan finalmente la variante EGFP, para monitorear la transfección de una nueva generación de adenovirus, reportan que el 82% de condrocitos son transfectados con 100 moi's, al igual que todos los grupos mencionados el porcentaje es obtenido por microscopia, pero en este caso de fluorescencia, y mediante una cámara de Neubauer.

Solo dos grupos contemplan la terapia génica en equinos para el tratamiento de enfermedades o lesiones articulares. Pero MacIlwrait et al (2000) transfecta células de la membrana sinovial. Por lo que el único real antecedente con células primarias de cartílago articular de equino y terapia génica es el trabajo realizado por Nixon (2000) y colaboradores, por medio adenovirus recombinante como vector, realizando una trasducción estable de GFP, LacZ y/o un factor de crecimiento. Sus resultados solo mencionan que muchos de los condrocitos primarios en cultivo en monocapa fueron transducidos mediante adenovirus que expresan la proteína verde fluorescente y visualizados por microscopía de epifluorecencia. Por lo que no hay resultados mediante un método cuantitativo, analítico y objetivo de la transducción mediante adenovirus de células de cartílago articular, no solo en caballo, sino también en otras especies, y los ya existentes con otros vectores necesitan un a gran cantidad de virus, elevando su costo, o hay una probable incidencia de un proceso neoplásico.

Finalmente el grupo de Kamil, Vacanti et al (2002), plantea la necesidad de explorar por citometría de flujo, el riesgo teórico de una transformación maligna por la estimulación de factores de crecimiento en condrocitos en cultivo para la formación de un neo-tejido, ya que aneuploidias han sido detectados en tumores cartilagosos. Este mismo riesgo puede aplicarse a todo estudio de terapia génica.

III. Objetivos Generales

- Evaluar por citometría de flujo la eficiencia de la transferencia génica adenoviral *in vitro* con el gen reportero EGFP (enhancer green fluorescent protein) en células aisladas de cartílago articular de caballo.
- Estudiar el ciclo celular en células cartilaginosas de caballo posterior a la transferencia génica con Ad GFP por citometría de flujo.

IV. Objetivos particulares

- Cuantificar y determinar por citometría de flujo los índices de infección con Ad EGFP en células aisladas de cartílago de caballo a diferentes pases de cultivo.
- Analizar por citometría de flujo las fases del ciclo celular en células aisladas de cartílago articular de caballo transfectadas con Ad EGFP, en cultivo primario, primer y segundo pase.

V. Material y Métodos

A. Aislamiento de células articulares de caballo

Se obtuvieron siete rodillas de caballos sacrificados o muertos por causas ajenas a la articulación y clínicamente sanas de la Clínica de Equinos, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootécnica de la UNAM, las rodillas se limpiaron y lavaron antes de ser disecadas para obtener la muestra de cartílago articular en condiciones estériles. El tejido se colocó dentro de un tubo cónico de poliestireno con 5 ml de PBS (Solución buffer de fosfatos, pH 7.2) y antibiótico al 10% (penicilina, estreptomycin y anfotericina), para ser transportado al laboratorio y se mantuvieron a 4 ° C hasta ser procesado. Para obtener el número de condrocitos necesario la muestra de cartílago fue fragmentada dentro de una campana de flujo laminar con ayuda de un bisturí, los fragmentos se colocaron en tubos cónicos de poliestireno con 5 ml de una solución de Colagenasa tipo I (Worthington) a una concentración de 0.3 % en medio de cultivo M199 estéril, se mantuvo en incubación con agitación constante de 3-4 horas a 37 ° C. Después del tiempo de incubación, el tejido fue resuspendido y filtrado en una maya de nylon estéril con poros de 0.5 mm de diámetro, en los casos en el que el tejido presentaba fragmentos aun visibles. Posteriormente las células ya en suspensión se centrifugaron por 12 minutos a 1200 r.m.p, se desechó el sobrenadante y el botón celular se lavó dos veces más con medio de cultivo M199 suplementado con antibiótico 1% (penicilina, estreptomycin y anfotericina). La viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión de azul de tripano al 0.4% en una cámara de Neubauer y un microscopio invertido (Axiovert 25, Zeiss).

Con una viabilidad de más del 90% la muestra fue dividida en dos partes, la primera sembrándose en una caja de seis pozos de poliestireno a una concentración de 2×10^5 células por pozo, tomando a estas como un cultivo primario, la segunda parte de la muestra, 1×10^6 células se sembraron en una caja de poliestireno para cultivo de 75 cm^2 , ambas se cultivaron en medio M199 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), antibiótico 1% y en CO_2 al 5%, a 37° C y 85% de humedad.

A cada muestra de cultivo primario se le hicieron dos pases más, para lo cual los cultivos primarios en confluencia de la caja de 75 cm^2 se cosecharon con tripsina 0.25% en EDTA 0.1mM, se incubaron por 5 minutos y se lavaron con 5 ml de M199 y antibiótico al 1% centrifugándose a 1200 r.p.m. por 10 minutos, el botón celular se lavó en dos ocasiones más, resuspendiendo en 5 ml de M199 y antibiótico al 1% y centrifugándose a 1200 r.p.m. por 12 minutos. Nuevamente se sembraron en las mismas condiciones que el cultivo primario, 2×10^5 células por pozo y 1×10^6 células en una caja de cultivo de 75 cm^2 . Este proceso se realizó en otra ocasión, para obtener finalmente células cartílago de caballo en cultivo primario, primer y segundo pase.

B. Infección celular con Adenovirus-EGFP

El Adenovirus-EGFP (Ad-EGFP) con replicación deficiente producido con AdEasy system, fue proporcionado por el Laboratorio de Terapia Génica Celular del Centro Nacional de Rehabilitación. El Ad-EGFP es un adenovirus basado en el serotipo humano tipo 5 ($\Delta\text{E}1\text{a}$, $\Delta\text{E}1\text{b}$ parcialmente, $\Delta\text{E}3$), con un promotor de Citomegalovirus (CMV) para controlar la expresión del gen, en este caso de una variante de GFP silvestre llamado EGFP-C1 (Chuan H. T., et al., 1998) optimizada para fluorecer con mayor intensidad y

mejor expresión en células de mamíferos. El título viral del lote utilizado fue calculado por unidad infecciosa por el método en placa, el cual fue de 5×10^9 pfu/ml.

Transcurridos dos días de cultivo los pozos con 2×10^5 células se infectaron, para los cual se lavaron con 5 ml de PBS y se les agrego la suspensión viral, 500 μ l de medio M199 suplementado con 1% de SBF, 1% de antibiótico y el Ad-EGFP a 25 y 50 MOI's (múltiplos de infección viral, por sus siglas en ingles, o como se les denomino múltiplos de transfección viral). A las células control sin transfectar solo se les agrego 500 μ l M199 suplementado con 1% de SBF y 1% de antibiótico. Los pozos se incubaron por 2 horas a 37°C, con CO₂ al 5%, agitando suavemente cada 15 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación la suspensión viral se desecho, las células se lavaron con PBS y se dejaron en cultivo por 48 horas en medio M199 suplementado con 10% de suero bovino fetal, antibiotico1% y CO₂ al 5% y a 37° C. Este procedimiento se hizo para el cultivo primario, primer pase y segundo pase

C. Análisis de la expresión de EGFP y evaluación del ciclo celular

Durante las 48 horas de cultivo, posterior a la infección adenoviral las células fueron monitoreadas para verificar la expresión de EGFP, para lo cual se observaron en un microscopio invertido de fluorescencia con un filtro de 480 nm (Axiovert 25, Zeiss). Una vez transcurridas las 48 horas las células fueron desprendidas de los pozos de cultivo mediante tripsina 0.25% EDTA 0.1mM, lavadas con M199 suplementado antibiotico1% y centrifugando a 1200 r.p.m. 12 min, un segundo lavado con PBS e igualmente centrifugando a 1200 r.p.m. 10 min. En este punto la muestra se divido en dos fracciones: a la primera (1×10^5 células) se les cuantifico la expresión de EGFP, a estas células se les agregará 5 μ l de yoduro de propidio para determinar la viabilidad, finalmente se fijaron en 900 μ l de formaldehído al 4 %, la segunda fracción 1×10^5 células se les evaluó el ciclo celular, para lo cual se trataran con el kit de DNA Cycle Test Plus según las indicaciones del productor, Becton & Dickinson. La citometría de flujo se realizo en un FACS Calibur flow cytometer y se analizó con ayuda del Cell Quest Software y Modfit Cell Cycle Analysis Software. Para el análisis de la transducción un mínimo de 10,000 células fueron analizadas y 30,000 células o núcleos para la evaluación del ciclo celular.

VI. Resultados

Las células aisladas de cartílago articular de caballo después de la transfección con Ad-EGFP a 25 y 50 múltiplos de transfección a diferentes pases al momento de ser observados al microscopio invertido durante el monitoreo mostraban una morfología constante y similar a las células control, no se encontraron células flotando o muertas, tampoco objetos o partículas extrañas entre las células y en el medio de cultivo. Las células se veían refringentes y redondeadas durante el cultivo primario, más triangulares o fusiformes en los cultivos posteriores, la membrana celular se observaba bien limitada y poco o nada vacuoladas. La expresión de EGFP no se limitaba a un área celular en específico, lo cual permitió ver muchas de ellas polinucleadas, las cuales estaban siempre bien adheridas al sustrato. (Ver figura 1)

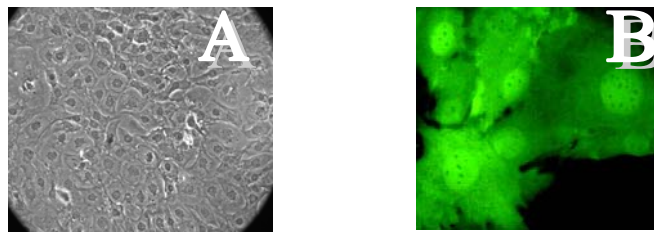


Figura 1 A) Células de cartílago articular de caballo en monocapa 100X B) Células de cartílago articular de caballo trasfectadas a 25 moí's 400X

Para determinar la eficiencia de transducción del Ad-EGFP mediante citometría de flujo, en primer lugar se gráfico el tamaño relativo contra granularidad relativa celular, la cual fue de alrededor de 200-400, seleccionado la población celular en una región de análisis, siendo la misma para todas las muestras, tanto células sin transfección como transfectadas. (Ver Figura 1).

Las células de la región de análisis posteriormente se analizaron en un gráfico entre los canales de emisión FL1, utilizado para medir la fluorescencia del rango de emisión verde alrededor de los 500 nm como el de EGFP de 507 nm, y el canal de emisión de FL3, este para monitorear la fluorescencia de yoduro de propidio 550-600 nm en el espectro de emisión rojo en el caso de células muertas. Para poder comparar los perfiles de fluorescencia celular, el gráfico fue dividido en cuatro cuadrantes, tomando como origen el punto de intersección de 30 de FL1 y FL3 (Ver Figura 2); así las células sin transfectar o control fueron ajustadas electrónicamente para estar en la región inferior izquierda, las células que expresaran EGFP o transfectadas se encontraron en el cuadrante inferior derecho, y en los cuadrantes superiores las células muertas tanto sin transfección como las transfectadas respectivamente. Este paso fue realizado principalmente para ajustar la autofluorescencia de las células sin modificación genética o control, la fluorescencia del yoduro de propidio así como de EGFP, y determinar la viabilidad.

Finalmente se gráfico un histograma FL1 contra el número de eventos, en el eje de FL1 a partir del punto en donde terminaba la emisión de fluorescencia de las células control se dividió el mismo, tomando hasta la marca de la primera década de la fluorescencia como EGFP negativas y posterior a ella como EGFP positivas (Ver Figura 2). Por lo que el

determinar la eficiencia de la transducción del Ad-EGFP fue tomada como el porcentaje de células EGFP positivas. Por otro lado, la intensidad de fluorescencia detectada es proporcional a la cantidad del fluorocromo en la célula, por lo tanto, igual a la cantidad de EGFP que se estaría expresando, este dato es calculado de forma automática por el software Cell Quest como la intensidad de fluorescencia media en la zona EGFP positiva.

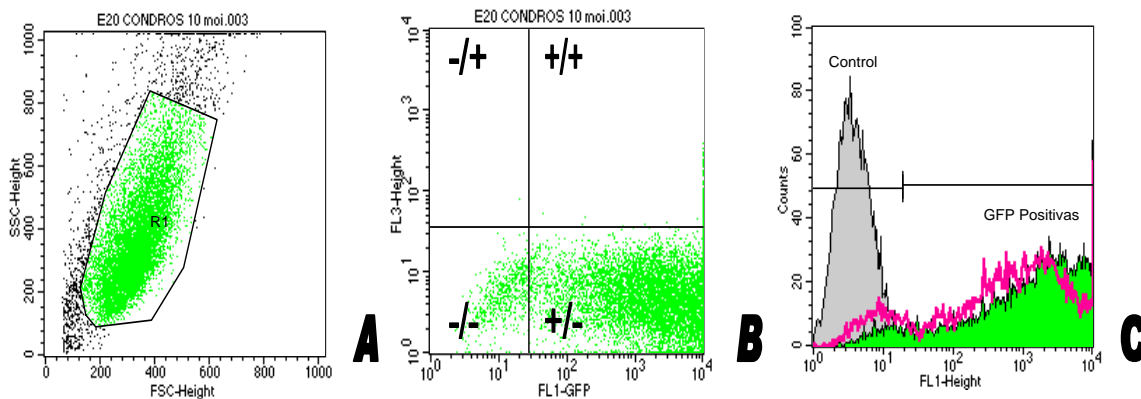


Figura 2. Análisis por citometría de flujo de la transfección y expresión de EGFP A) Selección de la población celular en la región R1 de análisis, se muestra un gráfico de puntos en donde FSC= tamaño relativo y SSC= granularidad relativa B) Patrones de fluorescencia FL1 vs FL3 de la población seleccionada, gráfica de puntos dividida en cuatro cuadrantes en donde el cuadrante -/- son las células sin trasfectar y sin teñir de yoduro de popidio o vivas, -/+ son las células muertas teñidas con yoduro de propidio pero sin trasfectar, ++ células trasfectadas con EGFP pero muertas y +/- células trasfectadas con EGFP y vivas. C) Histograma del porcentaje de células de caballo en cultivo trasfectadas con Ad-EGFP. Se muestran en color gris las células control sin trasfectar, en rosa las células trasfectadas con 25 moi's y en verde células trasfectadas con 50 moi's.

De esta forma el porcentaje obtenido de células EGFP positivas con 25 múltiplos de transfección en cultivo primario tuvo un promedio del 85% y del 90% en primer y segundo pase respectivamente (Ver Tabla 1). Se observó un ligero aumento aunque no significativo con 50 múltiplos de transfección en el cultivo primario con un promedio del 93% de células positivas para EGFP y un 96% para los cultivos en primer y segundo pase (Ver Tabla 1). Solo el 0.66% de las células trasfectadas fueron positivas para yoduro de popidio, lo que se interpreta que el 99% de las células trasfectadas estaban vivas al momento de ser adquiridas. (Ver Tabla 1)

La intensidad de fluorescencia media en cultivo primario y primer pase muestra un incremento significativo dependiente de la dosis de virus, 2198 y 2397 a 25 múltiplos de transfección, 3532 y 3612 a 50 múltiplos de transfección (Ver Tabla 1). Sin embargo en el segundo pase no hubo diferencias de expresión génica entre 25 y 50 múltiplos de transfección, así como tampoco las hubo a 50 múltiplos de transfección en los tres diferentes pases. (Ver Tabla 1)

Cultivo primario		Primer Pase		Segundo Pase	
25 MOI's	50 MOI's	25 MOI's	50 MOI's	25 MOI's	50 MOI's
Porcentaje de Células EGFP Positivas					
84.79	93.03	90.51	96.07	90.48	96.25
(+/-) 4.08	(+/-) 2.9	(+/-) 3.3	(+/-) 3.4	(+/-) 4	(+/-) 2.2
Intensidad de Fluorescencia Media					
2198	3532	2397	3612	1751	2839
(+/-) 511	(+/-) 698	(+/-) 458	(+/-) 474	(+/-) 434	(+/-) 728
Porcentaje de Células IP y EGFP Positivas					
Total	0.66				
(+/-) 0.33					

Tabla 1) Eficiencia de la transfección con Ad-EGFP en células articulares de equino a 25 y 50 múltiplos de transfección en cultivo primario, primer y segundo pase. Se muestran las medias geométricas y intervalo de confianza de las células EGFP positivas $\alpha=0.05$, la intensidad de fluorescencia y el porcentaje de células EGFP positivas e yoduro de propidio (IP) positivas o células muertas

Para evaluar la seguridad de la transferencia génica mediante adenovirus en los análisis de ciclo celular por citometría de flujo, se calculó la intensidad de la fluorescencia de las células teñidas con yoduro de propidio, proporcional a la cantidad de DNA; para lo cual en un histograma se gráfico en número las células o núcleos contra el canal de emisión FL2-Área en una escala linear, FL2 A determina la intensidad de fluorescencia del espectro de emisión rojo del yoduro de propidio y calcula en número de células en un canal determinado, así las células en la fase G1-G0 (2N) fueron asignadas al canal de fluorescencia de 100, las células G2-M se encontraron en el canal de fluorescencia 200 (4N) y la fase de síntesis S entre los canales 100 y 200, estas de acuerdo a los controles de calidad establecidos con linfocitos y las células sin transfectar (Ver figura 3). El análisis del porcentaje de células en las distintas fases de ciclo celular fue estimado de acuerdo el software Modfit Cell Cycle Analysis automáticamente aplicando el modelo matemático de histograma. El coeficiente de variación siempre fue menor al 5% para todos los casos.

Con los porcentajes de células en las fases G0-G1, S y G2-M se realizó una prueba de distribución de diferencia entre dos medias para corroborar si habría cambios significativos en las fases en la células transfectadas a 25 y 50 moi's con respecto a su control tanto en los cultivos primarios, así como los del primer y segundo pase. Por lo que con un nivel del 95% las células transfectadas a 25 y 50 moi's son estadísticamente iguales en las fases del ciclo celular G0-G1, S y G2-M a las células sin transfección. Aunque si se encontró un aumento de la fase de síntesis de los cultivos en el segundo pase con respecto al cultivo primario (Ver Tabla 2) Para todas las muestras, tanto las que no fueron transfectados mediante el Ad-GFP como lo fueron, mantuvieron un contenido de DNA 100% diploide. (Ver figura 3)

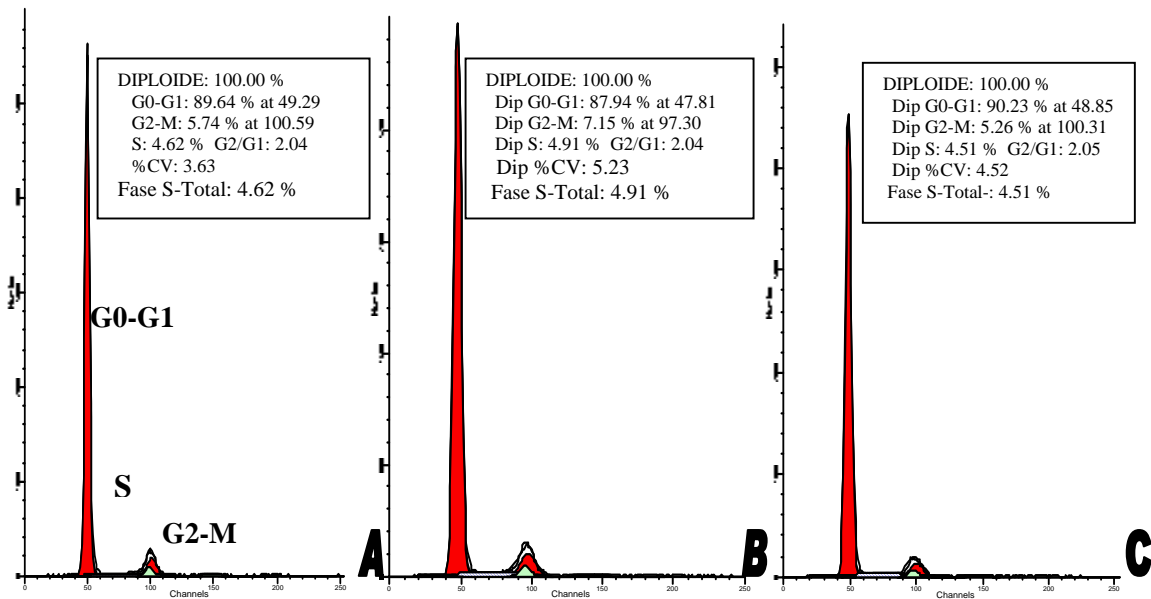


Figura 3. Histogramas del contenido de ADN generados por células articulares de caballo en cultivo A) Control, B) 25 múltiplos de transfección C) 50 múltiplos de transfección, se muestran los porcentajes de las fases G0-G1, S y G2M. El eje horizontal representa la intensidad de fluorescencia relativa proporcional al contenido de DNA en cada canal de emisión de FL2- A, en el primer canal se localiza la fase G0-G1, en el segundo G2-M y entre ambos la fase de síntesis (S) de ADN.

Cultivo Primario			Primer Pase			Segundo Pase		
Control	25 MOI	50 MOI	Control	25 MOI	50 MOI	Control	25 MOI	50 MOI
G0-G1								
89.16	88.12	88.73	86.08	87.75	87.76	82.63	88.96	87.32
(+/-) 2.76	(+/-)2.24	(+/-) 2.91	(+/-) 5.36	(+/-) 4.38	(+/-) 4.11	(+/-)5.20	(+/-) 3.96	(+/-) 4.10
Fase S Total								
4.6	5.1	5.1	7.2	5.3	5.3	12.1	6.9	7.3
(+/-) 0.36	(+/-)0.31	(+/-) 0.39	(+/-)1.46	(+/-) 0.93	(+/-) 0.78	(+/-)1.38	(+/-) 0.91	(+/-) 0.91
G2-M								
5.65	6.42	5.88	5.79	5.91	5.68	4.27	3.11	4.29
(+/-) 1.80	(+/-)1.43	(+/-) 1.76	(+/-)1.86	(+/-)1.92	(+/-) 2.15	(+/-)1.95	(+/-) 1.61	(+/-) 1.80

Tabla 2) Porcentajes de las fases del ciclo celular de células de cartílago articular equino en cultivo primario, primer y segundo pase. Se calculo el error típico de la diferencia de medias en las células control y las transfectadas con Ad EGFP a 5 y 10 moi's con un $\alpha=0.05$, sin encontrar diferencias significativas con respecto al control. Se muestran la media geométrica y el intervalo de confianza $\alpha=0.05$ de las fases GO-G1, S y G2-M del ciclo celular

VIII. Discusión

En los protocolos de terapia génica un vector viral para uso clínico invariablemente antes pasa por una serie de pasos, como es el estudio de la factibilidad de la transfección de las células apropiadas *in vitro*, seguido por la aplicación en un modelo animal. Teniendo una buena transfección, la siguiente meta es tener una exitosa expresión transgénica. Por tanto, los porcentajes de transfección mediante adenovirus en cultivo primario o células primarias de cartílago articular equino del 85% a 25 moi^{-1} y 90% a 50 moi^{-1} (Ver tabla 1), son mas altos que los resultados obtenidos con los vectores retrovirales en condrocitos articulares de bovino con un 25%, del 45% en conejo, 41% en borrego y del 5% de células transfectadas en humano (Hirschmann F. et al., 2002), también muestran mayor eficiencia que los vectores no-virales con un 42% en células humanas (Dinser R. et al., 2001) y 70% de conejo (Goomer S. G. et al., 2000). Esto permite que estos vectores sean considerados una buena alternativa para el seguimiento de células cartílago articular *in vitro* o *in vivo* a corto plazo.

La eficiencia de la liberación de los genes y su expresión esta en función de la distribución de los receptores vírales del modelo (Russell C. W., et al., 2000). Lo que explicaría los resultados óptimos de transfección ya que la transferencia de genes mediante adenovirus esta sujeta a los mecanismos de unión e internalización del virus a las células blanco, por lo tanto, a los niveles de expresión de los receptores adenovirales. Se ha observado que la proteína fibra de la capsida viral en la región C-terminal tiene una alta afinidad a los receptores celulares llamados CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor, por sus siglas en ingles) en mas del 50 % de los serotipos humanos incluyendo los 5 y 2 del subgrupo C utilizados en terapia génica . Una correlación directa entre los niveles de expresión de CAR y la eficiencia de la transferencia génica adenoviral a sido encontrada en diferentes tipos celulares incluyendo células musculares maduras, macrófagos alveolares y monocitos derivados de células dendríticas. Igualmente deficiencias de CAR resultan en bajos niveles de transfección génica mediante adenovirus. Por otro lado, CAR es una proteína altamente conservada (Kransykh V.N., et al., 2000)(Bewley C.M. et al., 1999) (Bergelson M.J et al., 1997).

Las células aisladas de cartílago articular equino, al tener altos niveles de transfección detectados mediante citometría de flujo, 90% de células EGFP positivas en primer pase y del 96% en primer y segundo pase (Ver tabla 1), también pudieran presentar altos niveles de expresión de CAR, que se mantiene mas o menos constantes por lo menos durante los cultivos primarios, primer y segundo pase. Esta expresión se podría analizar por CMF en un estudio de inmunofenotipo y que se encuentra en proceso en laboratorio.

Igualmente se obtuvo una exitosa expresión transgénica, ya que encontramos que hay mejor expresión EGFP, con un 37% mas que con un vector viral de adenovirus asociado (AAV) en células de cartílago humano con un promotor TRUF, ya que con el AAV se obtiene una intensidad de fluorescencia media de 1300 (Ulrich V. M. et al., 2002) y con adenovirus es de 3700, en ambos casos por citometría de flujo mas de 90% de las células eran EGFP positivas. La mejor expresión de un transgénico es debida principalmente al promotor utilizado. Un promotor fuerte tiene una alta afinidad a la ARN polimerasa, en consecuencia la región adyacente corriente abajo es frecuentemente transcrita, y por ende el gen marcador bajo el control de este promotor tiene una expresión alta. (Glick R. B. et al, 1998) (Russell C.W. et al., 2000).

Los datos *in vitro* de la factibilidad y eficacia de adenovirus necesitan ser comparados e interpretados por un método objetivo para tener un sustento y una justificación en la aplicación clínica. La inspección visual por microscopía, que no es el método con la mayor sensibilidad y exactitud, impide hacer una comparación, predicción y extrapolación, ya que con el gen Lac-Z como marcador de transferencia génica mediante adenovirus en células de cartílago articular, se observa variabilidad en la concentración viral utilizada para transfectar células primarias de cartílago articular. Mas del 90% o todas las células son transfectadas con 50 y 1000 moi's para humano (Aira J. et al.,1997) (Doherty J. P. et al.,1998), 20-50 moi's en cerdo (Kuboki T. et al.,1999), 50 (Shuler D.F. et al.,2000) y 300 moi's (Smith P. et al., 2000) son reportados en la transfección celular en conejo. Con el gen GFP igualmente hay diferencias, con 100 moi's transfectan el 82% de las células de cartílago articular bovino, con 10 moi's se ha observan muchas las células de cartílago equino transfectadas, pero concluyendo que 500 moi's es la concentración optima (Nixon J. A. et al,2000).

En nuestro estudio por el contrario, se pudo hacer una comparación por CMF mas precisa del número de células transfectadas mediante adenovirus con una concentración de 25 y 50 múltiplos de transfección, teniendo una diferencia poco significativa, pero distinguible entre estas dos concentraciones, como ya se menciona del 85% a 25 moi's, 90% a 50 moi's en cultivo primario, del 90 % 25 moi's y 96 % a 50 moi's en el primer y segundo pase (Ver tabla 1). Más aun, con datos preliminares, estos resultados son similares a los obtenidos con células humanas, ya que con 50 múltiplos de transfección mas del 90 % de las células son transducidas en cultivo primario. De igual forma se pudo cuantificar la expresión transgénica, con un aumento en la en la intensidad de fluorescencia a 50 moi's, mayor que con 25 moi's (Ver tabla 1), diferencia cuantitativa y no cualitativa como se realiza por microscopia de fluorescencia.

Al mismo tiempo por CMF también evaluamos la seguridad de la transfección adenoviral en las células de cartílago articular de caballo en cultivo primario, primer y segundo pase, cuantificando el contenido de DNA, analizado el ciclo celular y el estado de ploidia.

Se encontró que todos lo cultivos analizados mantuvieron una cantidad normal de DNA.

Presentaron un estado diploide o euploide.

La aneuploidía pare ser un excelente marcador en poblaciones de células malignas, ya que del 70% de los tumores analizados por citometría de flujo una población celular aneuploide es consistentemente reportada (Melamed R. M., et al., 1991),En condrosarcomas de alto grado aproximadamente el 30% es aneuploide y condrosarcomas del bajo grado el 11% de las células son tratraploides (Alho A. et al, 1983). De igual manera una especifica forma de desdiferenciación se presenta en condrocitos cultivados en monocapa, similares cambios en forma y expresión génica han sido observados en condrosarcomas de alto grado. Aunque la desdiferenciación no es un sinónimo de un proceso carcinogénico, es un proceso que puede acompañar al desarrollo de algunas neoplasias en el cartílago articular (Aigner T. and Unni K.K. 1999). También se puede establecer una correlación entre la distribución en el ciclo celular y la malignidad de una población celular, ya que entre mas células se encuentren en la fase S mas activo o de mayor grado es probable que sea el tumor (Clayer M., 2001). Aunque se ha encontrado que la proteína adenoviral E1A tiene propiedades

oncogénicas, ya que activa la fase de síntesis de ADN mediante la unión a diferentes coactivadores transcripcionales (Russell C.W. et al., 2000); E1A también participa en la replicación y producción de las partículas vírales, por lo que E1A es suprimida en los vectores adenovirales, por lo tanto, como se esperaba no hubo cambios significativos durante las fases G0-G1, S y G2-M por la transferencia de genes mediante adenovirus o algún producto adenoviral (Ver Tabla 2). Por este motivo el incremento de la fase S observado del cultivo en segundo pase no es debido a la transferencia génica, sino a un incremento en la proliferación debido a la desdiferenciación.

En muchos tipos celulares se ha observado que la proliferación y la diferenciación son procesos inversamente correlacionados. El mantener un arresto del ciclo celular es importante para mantener la arquitectura y funciones del tejido en células diferenciadas (Zhu L. and Skoultchi A. I. et al., 2001). Condrocitos en cartílago regenerado por enfermedades articulares como la osteoartritis y artritis reumatoide muestran valores elevados de S-G2, por lo que estos condrocitos proliferan activamente para la regeneración (Kususaki et. al., 2001), pero el tejido de reparación inicialmente consiste de forma predominantemente de colágeno tipo I, de fibrocartílago (Minas T., and Nehrer.,1997). Este mismo patrón es observado durante el cultivo en monocapa, los condrocitos articulares desdiferencian a una forma fibroblástica, acompañados en un cambio de expresión específico de los condrocitos, tal como es la colagena tipo II y agregan, los cuales decrecen con el tiempo de cultivo, mientras la expresión fibroblástica aumenta, por ejemplo el aumento de colagena tipo I (Hardingham T. et al., 2002) (Schnabel M. et al., 2002).

En cultivos en monocapa, el medio de cultivo es suplementado con suero bovino fetal o suero humano adulto que contiene una gran variedad de factores de crecimiento que estimulan la proliferación. Condrocitos articulares de conejo cultivados por 3 días con medio de cultivo más suero bovino fetal al 2% tiene un pequeño estado de división celular, pero cuando la concentración de suero es incrementada al 10% entran a una fase exponencial proliferativa, incrementándose la fase de síntesis de DNA (Vivien D. et al., 1991). Por otro lado, en las enfermedades o lesiones articulares llegan a penetrar hasta el hueso o la medula ósea, se liberan una gran cantidad de factores de crecimiento.

Por lo anterior, el incremento en la fase de S que refleja un incremento proliferativo es debido a las condiciones del cultivo en monocapa que conllevan a una estrés mitogénico por los factores de crecimiento del suero bovino fetal (ver material y métodos), con un decremento en la diferenciación celular cartilagosos.

Puesto que las células aisladas de cartílago articular equino muestran gran factibilidad y eficiencia de la transferencia génica mediante adenovirus, y no presentan aneuploidias o tetraploidias por citometría de flujo, y dado que el caballo tiene una natural incidencia al igual que el hombre a enfermedades articulares como la osteoartritis y a lesiones articulares en individuos deportistas, nos da muchas esperanzas de la aplicación en un modelo in vivo, prerequisite si se desea pasar a un tratamiento clínico. De igual forma para la evaluación del trasplante tanto de condrocitos autólogos o de neotejidos construidos por ingeniería de tejidos como alternativas terapéutica en enfermedades y lesiones articulares, es importante seguir el curso de las células implantadas dentro de la articulación. Para estas alternativas terapéuticas es necesario un gran número de células cultivadas *in vitro* para su expansión sobre el curso de dos o tres generaciones, aproximadamente 9000 por mm³. (Hunziker E.B. et al., 2001). Para lograr esta meta, una población marcada de manera homogénea y que exprese eficientemente el gen marcador en cualquiera de estas etapas de cultivo, como lo

obtenido mediante el adenovirus con la proteína verde fluorescente, son necesarios para distinguir las células implantadas de las células endógenas de la articulación.

Finalmente se ha observado en la ingeniería de tejidos que el sustrato o matriz de andamio de las células es un importante factor en el crecimiento, la adhesión y diferenciación celular del fénotipo deseado. Las células de caballo modificadas genéticamente mediante adenovirus y que producen EGFP pudieran también ser seguidas *in vitro* mediante microscopios convencionales de fluorescencia y microscopios confocales con software de análisis, lo que brindaría la oportunidad de localizar y observar la distribución y crecimiento de estas células en diferentes cultivos en tercera dimensión o matrices biodegradables y biocompatibles, y así evaluar el grado de diferenciación *in vivo*, sin la necesidad de fijar las células. Pero esta posibilidad es solo factible si tenemos la certeza de tener una población marcada de manera homogénea y determinada por un método cuantitativo, objetivo y rápido como se ha mostrado por citometría de flujo y la proteína verde fluorescente como marcador de transferencia génica; además de tener un vector seguro, que no tenga efectos citotóxicos, no producir cambios genómicos como mutaciones o aneuploidias, por lo tanto, que no se integre al genoma viral, por último que transfecte células tanto en división celular como en un estado quiescente, pueda ser producido en grandes cantidades y para varias dosis. Todas estas características se encuentran en los vectores adenovirales y han sido corroboradas algunas de ellas en este trabajo en células aisladas de cartílago articular de caballo, teniendo excelentes porcentajes de transfección y expresión de EGFP sin ningún estado neoplásico en los tres estadios de cultivo análisis por citometría de flujo.

VIII. Conclusiones

- La transferencia y expresión de EGFP en células aisladas de cartílago de caballo mediante adenovirus pudo ser cuantificada por citometría de flujo.
- Con una concentración viral de 50 múltiplos de transfección se pueden obtener 90 % de células de cartílago articular equino transfectadas en cultivo primario y 96 % en primer y segundo pase, también se logrando una mejor expresión de EGFP.
- Los altos porcentajes de transfección mediante adenovirus en células aisladas de cartílago articular equino pudieran reflejar elevados niveles de expresión de CAR en su membrana celular.
- La transferencia génica adenoviral con 25 y 50 múltiplos de transfección no afectan la viabilidad celular.
- La infección con Ad-EGFP en cultivos primarios, primer y segundo pase no produce cambios proliferativos y no afecta estado de ploidia de las células articulares de caballo.
- Las condiciones de cultivo *in vitro* en monocapa incrementan la actividad proliferativa de los condrocitos articulares de caballo con un probable decremento en la diferenciación celular.

IX. Referencias

1. Aigner T and Unni K.K. (1999) IS DEDIFFERENTIATED CHONDROSARCOMA A “DE-DIFFERENTIATED” CHONDROSARCOMA? *Journal Pathology*, Vol. 189, pp:445-447
2. Alho A., Connor J. K., A. B., Mankin H. J., SchillerA. L. and Campbell C. J. (1983) Assessment of Malignancy of Cartilage Tumors using Flow Cytometry. *The Journal of Bone and Join Surgery*, Vol. 65-A (6): pp 779-785
3. Arai J., Kubo T., Fushiki S., Mazda O., Iwaki Y., Imanishi J. and Hirasawz Y. (2000) Gene Delivery to human Chondrocytes by Adeno Asociated Virus Vector. *The Journal of Rheumatology*, Vol 27 (4) : pp 979-972
4. Arai J., Kubo T., Kobayashi K., Takeshita K., Takahashi K., Ikeda T., Imanishi J., Takigawz M. and Hirasawa Y. (1997) Adenovirus Vector-Mediated Gene Transduction to Chondrocytes: *In Vitro* Evaluation of Therapeutic Efficacy of Transforming Growth Factor β -1 and Heat Shock Protein 70 Gene Transduction. *The Journal of Rheumatology*, Vol. 24 (9) : pp 1787-1795
5. Bergelson M.J., Cunningham A.J., Droguett G., Kurt-Jones A.E., Krithivas A., Hong S.J., Horwtz S.M., Crowell L. R. and Finberg W R. (1997) Isolation of Common Receptor for Coxsackie B Viruses and Adenoviruses 2 and 5. *Science*, Vol. 275: pp1320-1323
6. Bewley C.M., Springer K., Zhang BY., Freimuth P. and Flanagan M.J.(1999) Structural Analysis of the Mechanism of Adenovirus Binding to its human Cellular Receptor, CAR. *Science*, Vol. 286: pp1579-1583.
7. Clayer M. (2001) The molecular biology of musculoskeletal tumors. *Current Orthopaedics*, Vol 15: pp 428-432.
8. Crystal G.R. (I995) Transfer of genes to humans: Early Lessons and Obstacles to Success, Vol. 270: pp 404-410
9. Cubitt A.B., Heim R., Adams SR., Boyd A.E., Gross L. A. and Tsien R. Y. (1995) Understanding, improving and using fluorescent protein. *Trends in Biotechnology Science*, Vol. 20: pp 448-445.
10. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. (1994) Green Fluorescent Protein as a Marker of Gene Expression. *Science*, Vol. 296: pp 802-805
11. Cheng L. and Kain E. (1995) Analysis of GFP and RSGFP Expression in Mammalians Cells by Flow Cytometry. *CLONTECHniques*, pp20.
12. Cheng L., Fu j., Tsukamoto A, Hawley R. G. (1996) Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells. *Nature in Biotechnology*, Vol. 14 (5): pp 606-609.
13. Chuan H. T., Zhou S., Da Costa T. L., Yu J., Kinzlee W. K., and Vogelstein B. (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natural Academy of Sciencies USA*, Vol. 95, pp. 2509-2514.
14. Darzynkiewicz Z., Bedner E. and Smolewski P. (2001) Flow Cytometry in Analysis of Cellular Cycle and Apoptosis. *Seminars in Hematology*, Vol. 38 (2): pp 179-193
15. Dinser R., Kreppel F., ZauckeF., Blank C., Paulsson M., Kchanek S. and Maurer P. (2001) Comparison of long-term transgene expression after non-viral and

- adenoviral gene transfer onto primary articular chondrocytes. *Histochemical Cell Biology*, Vol. 116: pp 69-77
16. Doherty J. P., Zhang H., Tremblay L., Monolopoulos V. and Marshall W. K. (1998) Resurfacing of articular cartilage with genetically-modified human chondrocytes *in vitro*. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 6 (3): pp 153-160
 17. Evans H.C., Ghivizzani C. S., Oligino A.T. and Robbins D.P.(2001) Future of adenovirus in the gene therapy of arthritis. *Arthritis Research*, Vol. 3: pp 142-146.
 18. Friedman T. (2003) Gene Therapy's New Era : A Balance of Unequivocal Benefit and Unequivocal Harm. *Molecular Therapy*, Vol. 8 (2): pp 5-7.
 19. Frisbie D.D. and MacIlwraith W. (2000) Evaluation of Gene Therapy as a Treatment for Equine Traumatic Arthritis and Osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 379 supplement: pp S273-S287
 20. Glick R. B. and Pasternak J. J. (1998) *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA*. Ed. ASM Press, Washington D.C. Second Edition: pp 683.
 21. Goomer S. R., Deftos J. L., Terkeltaub R., Maris T., Lee C. M., Harwood L. F. and Amiel D. (2001) High-efficiency non-viral transfection of primary chondrocytes and perichondrial cells for *ex-vivo* gene therapy to repair articular cartilage defects. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 9 (3): pp 248-256
 22. Hardingham T., Tew S. and Murdoch A. (2002) Tissue engineering: chondrocytes and cartilage, Vol. 4 ,supplement 3: pp S63-S68
 23. Hirschmann F., Verhoeyen E., Wirth D., Bauwens S., Hauser H. and Rudert M. (2002) Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 10 (2): pp109-118
 24. Hunziker E.B. (2001) Articular cartilage repair: basis science and clinical progress. A review of current status and prospects, Vol. 10 : pp 432-463
 25. Kamil H.S., Aminuddin S. B., Bonnasar J. L., Arevali S. A. C., Weng Y., Woda M., Vacanti A. C., Eavery D. R. and Vacanti P. M. (2002) Tissue-Engineered Human Articular Cartilage Demeostred Euploidy by Cytometry. *Tissue Engineering*, Vol. 8 (1): pp 85- 92
 26. Kransykh V.N., Douglas J.T., Van Beusechem V. W. (2000) Genetic Targeting of Adenoviral Vectors. *Molecular Therapy*, Vol. 1, (5): pp 391-405.
 27. Kususaki K., Sugimoto S., Takeshita H., Murata H., HashiguchiS., Nosaki T., Emoto K., Ashihara T. and Hirasawa Y. DNA cytofluorometric analysis of chondrocytes in articular cartilages under normal aging or arthritic conditions. *Osteoarthritis and Cartilage*, Vol. 9: pp 664-660
 28. Longonbardi G. A. (1992) *Flow Cytometry: First principles*. Wiley-Liss, USA
 29. Martínez B. C. (2002) *Estadística y muestreo*. Ecoe, Bogota Colombia, p 879
 30. Melamed M. R., Lindmo T. and Mendelshon L. M. (1991) *Flow Cytometry and Sorting*. Wiley-Liss, USA, Second Edition
 31. Minas T. and Nehrer S. 1997 Current Concepts in the Treatment of Articular Cartilage Defects. *Ostopahedics*. Vol. 20, (6): pp 525-538.
 32. Nixon J. A, Brower-Toland D. B., Bent J.S., Saxer A. R., Wilke J.M. and Robbins D. P. (2000) Insulinlike Growth Factor-I Gene Therapy Applications for cartilage

- Repair. *Clinical Orthopaedics And Related Research*, Vol. 379 supplement: S201-S213
33. Robbins D. P., Takahara H. and Ghivizzani S.C. (1998) Viral vector for gene therapy. *Trens in Biotechnology*, Vol.16:pp 35-40.
 34. Russell J.S.(1997) Science, medicine, and de future: Gene therapy. *British Medical Journal*, Vol. 315: pp 289-I292.
 35. Russell C.W. (2000) Update on adenovirus and its vectors. *Journal of General Virology*, Vol. 81: pp 2573-2604
 36. Schnabel M., Marlovits S., Eckhoff G., Fichtel I., Gotzen L., Vécsei V. and Schlegel J. (2002) Osteoarthritis and Cartilage, Vol. 10: pp 62-70
 37. Shuler D. F., Georgescu I. H., Niyibizi C., Studer K. R., Mi Z., Johnstone B., Robbins D. P., and Evans H. C. (2000) Increased Matrix Synthesis Following Adenoviral Transfer of a Transforming Growth Factor β -1 Gene into Articular Chondrocytes. *Journal of Orthopedics Research*, Vol.8 : pp 585-592
 38. Smith P., Shuler D. F., Georgescu I. H., Ghivizzani C. S., Johnstone B., Niyibizi C., Robbins D. P., and Evans H. C. (2000) Genetic Enhancement of Matrix Synthesis By Articular Chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism*, Vol. 43 (5): pp. 1156-1164
 39. Smith T. N. and Lasic D.D. 2000. *Gene Therapy Therapeutic Mechanics and Strategies*. Marcel Dekker, United Estates of America, pp 1-40.
 40. Ulrich V. M., Maloney M. D., Goater J. J., Soballe K., Goldring B. M., O'Keefe J. M. and Schwarz M. E. (2002) Light-Activated Gene Transduction Enhances Adeno-Associated Virus Vector- Mediated Gene Expression in human Articular Chondrocytes, Vol. 46 (8): pp 2095-2104
 41. Vacanti J.P. and Langer R. (1999) Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Molecular Medicine*, Vol. 354: pp 332-334
 42. Vivien D., Galera P., Loyau G., Pujol J. P. (19991) Differential response of culture rabbit chondrocytes (RAC) to transforming growth factor β (TGF- β) – evidence for a role of serum factors. *European Journal of Cell Biology*, Vol. 54: pp 217-223
 43. Wu N. and Ataa M.M. (2000) Production of viral for gene therapy applications. *Biochemical engineering. Curr. Opin Biotech*, Vol. 11(2): pp 205-208.
 44. Zhu Liang and Skoultchi I. A. (2001) Coordinating cell proliferation and differentiation. *Current Opinion in Genetics and Development*, Vol.10:pp 91-97.