



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**DETECCIÓN DE COLÁGENA TIPO II, AGRECANO, SOX 9 Y COLÁGENA TIPO
I, ANÁLISIS MOLECULAR COMPARATIVO DE CARTÍLAGO ARTICULAR
NORMAL Y CONDROCITOS EN DOS TIPOS DE CULTIVO PRIMARIO.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ERIKA MIREYA FLORES ESPITIA

TUTOR:

JOSÉ CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN

COMITE TUTORAL:

MARGARITA VALDÉS FLORES

GILBERTO CHAVEZ GRIS



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

Esta dedicado a Alma Delia, mi hermanita, mejor amiga, y fuente de inspiración, mi modelo a seguir porque es el mejor ser humano que conozco de este mundo, quién nunca duda en ayudar a los demás, en cualquier situación, sin esperar si quiera un gracias.

Porque es la persona más inteligente, noble, ética y apasionada de la vida, porque siempre tiene ideas nuevas, porque siempre encuentra la solución, porque persigue y alcanza sus metas. Porque disfruta cada instante y siempre te motiva y te contagia la felicidad.

Gracias por ser mi hermana y que en todo momento has estado para apoyarme, cuidarme y ayudarme.

A Sebastián, mi sobrino que pronto nacerá y que ha sido un motor para impulsarnos.

También lo dedico a los caballitos y burritos del mundo, quienes son mi más grande pasión.

*Los sueños pueden realizarse si tú piensas que quieres de la vida.
Conócete a ti mismo, descubre quién eres, selecciona tus metas, sé honesto contigo mismo, cree siempre en ti, encuentra muchos intereses y persíguelos.
Aprecia todo lo que tienes y vive tu vida plenamente.
Otórgate la libertad de probar cosas nuevas, de crear tus propios sueños y suéñalos hasta que se vuelvan realidad.*

AGRADECIMIENTOS

A Alma Delia García, gracias porque sin ti, no hubiera llegado tan lejos, gracias por creer en mi, por estar conmigo en todo momento, gracias por la beca.

A la División de estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM; especialmente a Dr. Francisco Monroy, Dr. Edgar Alfonseca Dr. Francisco Suárez Güemes, gracias por todo su apoyo.

Sr. José García y Sr. Leonardo Marquina, del Rastro “Río Frío”, gracias por permitirme trabajar dentro del rastro, porque ningún caballo tuvo que morir por causa de esta investigación.

Instituto Nacional de Rehabilitación; a Dr. J. Clemente Ibarra Ponce de León y MC Cristina Velasquillo, Laboratorio de Ingeniería de Tejidos-INR, proyecto CONACYT salud 2003-CO1-98, gracias por esta oportunidad.

Dra. Margarita Valdés Flores, laboratorio de genética-INR, gracias por todas sus aportaciones y ser mi tutora.

Un agradecimiento muy especial a Dr. Francisco Martínez Flores, QFB Luisa Sandoval, Laboratorio de Biomedicina Molecular-INR, gracias por su colaboración científica, por sus contribuciones de material y reactivos para finalizar este proyecto. Gracias por permitirme trabajar en su laboratorio.

Gracias a los laboratorios de Anatomía Patología, Tec. en Histología Enrique Alvarez, Dra Eréndira Estrada, Dra Leticia Baena, Enrique Gómez y de Microscopía Electrónica, Dra. Rosario Neri, Tec. en Histología Bertha Vargas, B. Lilia Solis y B. Alma Hernández, por toda su colaboración y enseñanza.

Enf. Guadalupe Ramos, Jefa del Centro de Equipos y Esterilización, gracias por el apoyo para tener mi material siempre listo y estéril.

Lic. Mónica Higuera Castro, Lic. Verónica Gutiérrez, gracias, porque siempre me ayudaron a saltar los obstáculos y a resolver los imprevistos.

Dra. María Masri Daba, Depto. de Équidos, FMVZ-UNAM, Gracias por inducirme a esta estupenda línea de la investigación. Dr. Gilberto Chávez Gris, mi tutor, Depto Patología, FMVZ-UNAM. Gracias por su apoyo.

Dr. Alejandro Rodríguez Monterde, Jefe del Depto. de Équidos FMVZ-UNAM, gracias a usted me dedique al 100% a mi investigación, sinceramente gracias.

A Mr. Rob Nichols Head of Overseas, The donkey sanctuary, MC Mariano Hernández Gil, Team Leader DS-ILPH-UNAM, mis mejores amigos, gracias por el apoyo que me brindaron durante esta etapa, gracias por sus sabios consejos, me servirán para toda la vida, gracias por alentarme y por su amistad.

Gracias a Dr. Ramiro Calderón Villa, Dr. Carlos Hernández Garibay, Dr. Horacio Chavira Sevilla, jefes, profesores y maestros de la vida, mis amigos, que no dejaron de apoyarme. Ing. José Luis Pablos Hach, Dr. Gerardo Perera Marín, MC. Gonzalo Villar Patiño, Dr. Carlos Galina Hidalgo, Dra. Hilda Castro Gamez, Dra. Rosa María García Escamilla, Dra. Lourdes Juárez, mis profesores. Gracias por compartir conmigo sus conocimientos.

Gracias a mis amigos, los de toda la vida y los que llegaron poco a poco para quedarse: Justin Mbimbi Ndamamba, Edith Osorio, Juan Carlos Díaz, Alex Neri, José Becerra, Adrián Ayala, Nayelli Popoca, Bibiana Meza, Elcira Alva, Fiamma Gómez, Alma Ruiz, Ruth Camacho, Elizabeth Simeón, Paola Flores, Cinthia Vargas, Karen García, Alfredo Canela, Carmen Valle, Martín Maquivar, Erika María Tabares, José Luis Velásquez, Dolores Ramos, Marco Torres, Colleen Gladson, Abdou Fadika, Aytzee Piñón, Lety Zavalza, Eloisa Ramírez, Laura Colín, Gabriela López, Ricardo Zamudio, Alma Lascurain, Luisa Sandoval, Antonio Fernando, Germán Lombardero, Tania Gómez, Alejandro Sigler, Paola Mérida, Cesar Núñez, Arturo León, Luis Huerta, quienes han estado en diferentes momentos de mi vida y son muy importantes para mi.

Gracias a mis compañeros y amigos del INR: MC. Leafar Pérez, Dr. Sandino Estrada, MC Carmen Parra Cid, Dr. René Abarca Buis, Dr. David Garcíadiego, Dra. Rocío Aguilar, B. Valentín Martínez, quienes hicieron que esta experiencia sea inolvidable.

Gracias a María Espitia, Ruth Moreno, Lety Moreno, Alma Delia, por ser mi familia.

RESUMEN

La ingeniería de tejidos es una estrategia experimental utilizada en la reparación del cartílago en algunos padecimientos articulares, esto debido a que este tejido tiene una limitada capacidad de auto reparación. La inestabilidad fenotípica del condrocito en el cultivo es un reto para la ingeniería de tejidos, pues durante su mantenimiento *in vitro*, disminuye la síntesis de colágena tipo II y agrecano, marcadores típicos del cartílago articular e incrementa la síntesis de colágena tipo I, marcador de desdiferenciación, esta relacionado a la reducción de expresión del factor de transcripción sox9, donde finalmente la célula se desdiferencia al fenotipo fibroblástico. La finalidad del trabajo fue realizar un análisis en cartílago articular normal de equinos y de condrocitos en dos tipos de cultivo primario, con el fin, de conocer los niveles de expresión de los genes de Colágena tipo II, Agrecano, Sox9 y Colágena tipo I, mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (RT-PCR). Además por medio de histología se analizó la morfología del cartílago y del cúmulo celular obtenido de los cultivos (pellet). La histología reveló similitudes entre el pellet y el cartílago normal. La FISH permitió detectar de manera cualitativa la expresión de agrecano, colágena II y sox9 en pellet y en el cartílago. Los resultados de las PCR y RT-PCR mostraron diferencias significativas de la expresión de colágena I entre ambos cultivos. Concluyendo, el cultivo en pellet conserva las características moleculares del cartílago normal, sin embargo su inestabilidad durante el cultivo sugiere que esta técnica requiere el uso de andamios para su posterior implantación, y las técnicas utilizadas en el análisis son de gran utilidad para evaluar constructos antes de su implantación.

Palabras Clave: Cartílago, Agrecano, Colágena II, Sox-9, FISH, RT-PCR

ABSTRACT

Tissue engineering is an experimental strategy used to repair cartilage; which has a low capacity for self-repair. The phenotypic instability of the chondrocyte in culture, has been a great challenge for tissue engineering, since, during culture of the chondrocytes, the synthesis of the typical markers for articular cartilage collagen type II and aggrecan diminish, the loss is related to the reduction of the expression of the transcription factor Sox9. While in culture the synthesis of collagen type I increases, this is typical for dedifferentiation, where the cells are finally de-differentiated into fibroblasts phenotype. The aim of this study was to analyse two chondrocytes culture techniques, with the purpose to define the expression level of collagen type II, sox9, aggrecan and collagen type I, by means of fluorescent *in situ* hybridization (FISH), polymerase chain reaction (PCR) and real time polymerase chain reaction (RT-PCR). Moreover, was analyzed histologically the morphology and the cellular accumulation of cartilage obtained on the pelleted culture and the normal cartilage. The histology revealed similarities between the pelleted and the normal cartilage. FISH allows qualitative detection of Aggrecan, Collagen type II and Sox9 on the pellet and on the cartilage. The results of PCR and RT-PCR show significant differences in the expression of Collagen type I between the two cultures. The conclusion was, pelleted retains molecular characteristics like normal cartilage but its instability during culture suggests the use of scaffolds for its posterior implantation and the use of these techniques are useful for evaluating the constructs prior to implantation.

Key words: Cartilage, Aggrecan, Collagen type II, Sox-9, FISH, RT-PCR.

CONTENIDO.

RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Generalidades.	6
2.1.1 Articulaciones Sinoviales.	6
2.1.2 Anatomía de la articulación del menudillo torácico.	8
2.1.3 Cartílago articular.	10
2.2 Composición del Cartílago Hialino.	10
2.2.1 Condrocitos.	10
2.2.1.1 Características morfológicas.	11
2.2.1.2 Características metabólicas.	12
2.2.1.3 Origen celular y diferenciación.	12
2.2.1.4 Funciones del condrocito.	13
2.2.2 Matriz Extracelular.	14
2.2.2.1 Agua.	14
2.2.2.2 Colágena.	15
2.2.2.3 Proteínas no colágenas.	16
2.2.2.4 Lípidos.	17
2.2.2.5 Proteoglucanos.	17
2.2.2.6 Agrecano.	18
2.2.3 Arquitectura del cartílago hialino.	21
2.2.3.1 Zona superficial o tangencial.	21
2.2.3.2 Zona intermedia o transicional.	21
2.2.3.3 Zona profunda o radial.	22
2.2.3.4 Zona calcificada.	22
2.2.4 Regiones del cartílago.	22
2.2.4.1 Matriz pericelular.	22
2.2.4.2 Matriz territorial.	23
2.2.4.3 Matriz interterritorial.	23
2.2.5 Histología del cartílago articular.	23
2.2.6 Metabolismo del cartílago hialino.	25
2.3 Biología molecular del cartílago hialino.	25
2.3.1 Condrogénesis	25
2.3.2 Sox9	27
2.4 Generalidades de cultivo celular.	28
2.4.1 Tipos de cultivo.	28
2.4.2 Viabilidad celular.	29
2.4.3 Curvas de proliferación celular.	29
2.4.4 Cultivo de condrocitos.	30
2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	30
2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR).	31
2.7 Principios de la Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).	32
III. HIPÓTESIS.	35

IV. OBJETIVOS.	36
4.1 Objetivo General.	36
4.2 Objetivos Específicos.	36
V. MATERIAL Y MÉTODOS	38
5.1 Toma de muestras.	38
5.2 Protocolo para cultivo primario de condrocitos.	40
5.2.1 Protocolo para cultivo en monocapa.	40
5.2.1.1 Lavado.	40
5.2.1.2 Disgregación mecánico-enzimática.	40
5.2.1.3 Re suspensión celular.	40
5.2.1.4 Conteo y viabilidad celular.	40
5.2.1.5 Cultivo.	41
5.2.2 Protocolo para cultivo en pellet.	41
5.2.2.1 Lavado.	41
5.2.2.2 Disgregación mecánico-enzimática.	41
5.2.2.3 Re suspensión celular.	41
5.2.2.4 Conteo y viabilidad celular.	42
5.2.2.5 Cultivo.	42
5.3 Protocolo de preparación de células en cultivo primario para hibridación <i>in situ</i> fluorescente.	43
5.3.1 Protocolo para fijación de cultivos.	43
5.3.2 Protocolo para deshidratación de cultivos.	43
5.3.3 Protocolo para inclusión de cultivos en pellet.	43
5.4 Protocolo de preparación de cartílago para hibridación <i>in situ</i> fluorescente.	43
5.4.1 Protocolo para fijación y descalcificación de cartílago.	43
5.4.2 Protocolo para deshidratación de cartílago.	44
5.4.3 Protocolo para inclusión de cartílago.	44
5.5 Protocolo de tinciones histológicas.	45
5.5.1 Protocolo de tratamiento de laminillas con TESPAs.	45
5.5.1.1 Soluciones.	45
5.5.1.2 Preparación.	45
5.5.2 Protocolo de cortes histológicos de pellet y de cartílago.	45
5.5.3 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E).	46
5.5.4 Tinción con safranina.	47
5.6 Protocolo de extracción y análisis de ARN.	49
5.6.1 Protocolo de extracción de ARN de cartílago y de condrocitos en cultivo.	49
5.6.1.1 Homogenización	49
5.6.1.2 Separación	49
5.6.1.3 Precipitación del ARN.	50
5.6.1.4 Lavado del ARN.	50
5.6.1.5 Re-dilución del ARN.	50
5.6.1.6 Cuantificación del ARN.	50
5.6.2 Protocolo Gel desnaturalizante de ARN.	51
5.6.2.1 Preparación de la cámara de electroforesis.	51
5.6.2.2 Preparación de gel 1%.	51

5.6.2.3	Preparación de buffer de carga para ARN.	51
5.6.2.4	Reacción de desnaturalización.	51
5.6.2.5	Visualización.	51
5.7	Protocolo síntesis de ADN a partir de ARN por medio de la enzima Reversa Transcriptasa.	52
5.7.1	Reacción.	52
5.7.2	Parámetros.	52
5.8	Reacción en cadena de la Polimerasa.	53
5.8.1	Diseño de un primer.	53
5.8.2	Control positivo.	55
5.8.3	Primers.	55
5.8.4	Reacción.	56
5.8.5	Parámetros.	57
5.9	Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real.	57
5.9.1	Reacción.	57
5.9.2	Parámetros.	58
5.10	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente.	58
5.10.1	Soluciones.	58
5.10.2	Protocolo para marcado de la sonda.	59
5.10.2.1	Transcripción <i>in vitro</i> .	59
5.10.2.2	Purificación de ARN amino modificado.	60
5.10.2.3	Precipitación del ARN amino modificado con etanol	60
5.10.2.4	Marcado del ARN amino modificado con fluorescencia	61
5.10.2.5	Purificación del ARN amino modificado marcado con fluorescencia.	62
5.10.2.6	Precipitación con etanol del ARN amino modificado marcado con fluorescencia.	62
5.10.3	Protocolo de Hibridación para cartílago.	63
5.10.3.1	Pre-hibridación.	63
5.10.3.2	Hibridación.	64
5.10.3.3	Post- hibridación.	64
5.10.4	Protocolo de Hibridación para cultivo en pellet.	64
5.10.4.1	Pre-hibridación.	64
5.10.4.2	Hibridación.	65
5.10.4.3	Post- hibridación	65
5.11	Análisis estadístico	66
VI.	RESULTADOS	67
VII.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	104
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
IX.	ANEXOS	124

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1	Diagrama del desarrollo de la articulación.	6
Figura 2	Representación gráfica de la articulación metacarpo-falángica.	9
Figura 3	Microscopía de Electrónica de un condrocito.	12
Figura 4	Microscopía de Electrónica de Agregano y representación gráfica de un agregado de agreganos.	20
Figura 5	Representación esquemática de las zonas del cartílago.	21
Figura 6	Esquema de regiones del cartílago.	23
Figura 7	Imagen microscópica de cartílago articular, tinción Safranina.	24
Figura 8	Imagen microscópica de cultivo de condrocitos en monocapa.	73
Figura 9	Imagen estereoscópica de los cúmulos celulares obtenidos del cultivo en pellet.	75
Figura 10	Tinción hematoxilina eosina.	77
Figura 11	Tinción de safranina.	79
Figura 12	Gel desnaturalizante de RNA.	82
Figura 13	Electroforesis de oligos diseñados para Agregano de Caballo.	83
Figura 14	Expresión de GAPDH.	84
Figura 15	Expresión de Agregano por condrocitos cultivados en monocapa.	85
Figura 16	Expresión de Agregano por condrocitos cultivados en pellet.	86
Figura 17	Expresión de Colágena tipo II por condrocitos cultivados en monocapa.	87
Figura 18	Expresión de Colágena tipo II por condrocitos cultivados	88

	en pellet.	
Figura 19	Expresión de Sox9 por condrocitos cultivados en monocapa.	90
Figura 20	Expresión de Sox9 por condrocitos cultivados en pellet.	91
Figura 21	Expresión de Colágena tipo I por condrocitos cultivados en monocapa.	92
Figura 22	Expresión de Colágena tipo I por condrocitos cultivados en pellet.	93
Figura 23	Imagen microscópica confocal de Hibridación <i>in situ</i> fluorescente en cartílago normal.	101
Figura 24	Imagen microscópica confocal de Hibridación <i>in situ</i> fluorescente en constructo formado con condrocitos cultivados en pellet.	102
Figura 25	Resumen de evaluación .	103

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1	Primers diseñados para agrecano de caballo.	54
Cuadro 2	Estadística descriptiva de obtención de muestras.	68
Cuadro 3	Valores logarítmicos de los conteos celulares del cultivo en monocapa.	71
Cuadro 4	Valores logarítmicos de la proliferación celular en el cultivo en pellet.	71
Cuadro 5	Valores obtenidos del aislamiento de RNA de cartílago normal.	80
Cuadro 6	Valores obtenidos del aislamiento de RNA de condrocitos aislados y condrocitos en cultivo en monocapa y pellet.	81
Cuadro7	Estandarización de RT-PCR.	94

LISTA DE GRÁFICAS.

Gráfica 1	Histograma comparativo de la obtención de muestras.	68
Gráfica 2	Curva de crecimiento de células del cultivo primario en monocapa.	69
Gráfica 3	Curva de crecimiento de células del cultivo primario en pellet.	70
Gráfica 4	Curva de proliferación comparación entre promedios del cultivo en monocapa y el cultivo en pellet.	72
Gráfica 5	Aislamiento de RNA.	81
Gráfica 6	Curva de RT-PCR, estandarización de técnica.	95
Gráfica 7	Curva normalizada de RT-PCR de estandarización de la técnica.	95
Gráfica 8	Curva Estándar del coeficiente de determinación (R^2).	96
Gráfica 9	Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Agrecano por los condrocitos en cultivo en monocapa.	97
Gráfica 10	Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Agrecano por los condrocitos en cultivo en pellet.	97
Gráfica 11	Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Colágena tipo II, por los condrocitos en cultivo en monocapa.	98
Gráfica 12	Curva normalizada de RT- PCR, expresión de Colágena tipo II, por los condrocitos en los cultivos en pellet.	98
Gráfica 13	Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Colágena tipo I, por los condrocitos en cultivo en monocapa.	99
Gráfica 14	Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Colágena tipo I, por los condrocitos en cultivo en pellet.	99
Gráfica 15	Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Sox9, por los condrocitos cultivados en pellet.	100

I. INTRODUCCIÓN.

Desde los inicios de la ingeniería de tejidos, el propósito y objetivo principal de su desarrollo, ha sido reparar defectos en los órganos, adquirido por causas congénitas, traumatismo, inflamación o cáncer, su fundamento esta basado en el implante de células y de biomateriales (Langer et al 1993; Smith et al 2005; Saraf et al 2006; Takahashi et al 2007). Las técnicas utilizadas en la ingeniería de tejidos pueden ser divididas en dos categorías, *in vivo*: estimulando la respuesta de regeneración del organismo al colocar los biomateriales sin células *in situ*; o *ex vivo*: donde se obtienen células, son expandidas en cultivo y se unen a una matriz para ser reimplantadas en el huésped (Berthiaume F, et Yarmush ML 2000). Las células pueden ser heterólogas, alogénicas o autólogas. Las células autólogas son preferidas porque no producen respuesta inmunológica. Lo ideal, es que se obtengan muchas células del mismo órgano, que puedan ser aisladas, expandidas y reimplantadas dentro del mismo paciente, en un periodo de tiempo determinado (Smith 2005) y así restaurar, mantener o sustituir la función del órgano o tejido dañado.

En general, la ingeniería de tejidos es un campo interdisciplinario, donde se pueden concertar los conocimientos de diferentes áreas de la medicina, la cirugía, la bioingeniería, la biología celular y la biología molecular, con un fin aplicativo. La ingeniería de tejidos se debe considerar por su alta función clínica (Vacanti 1999; Evans 2005; Masri et al 2006; Takahashi et al 2007).

El desarrollo de la ingeniería de tejidos, específicamente de cartílago, surge de la necesidad de encontrar un tratamiento efectivo para la Osteoartritis (OA), que es una de las principales causas de retiro temprano en humanos y en équidos (McIlwraith 1996; Barnewitz 2003; Cancedda et al 2003). En ambos casos los tratamientos actuales están enfocados en controlar el dolor y evitar la pérdida de la función de la articulación. (McIlwraith 1996; Barnewitz 2003; Brommer 2003).

El cartílago articular resiste el repetido estrés físico, pero ante un defecto o herida en su estructura, sobre la superficie articular, aun siendo muy pequeña, no se repara espontáneamente (Brommer 2003) y si no llegan a penetrar a los tejidos vascularizados, no se curan (Platt 1996; Akens 2005), esto se debe a varios factores: es un tejido alinfático, no innervado y avascularizado. El mecanismo normal de reparación implica factores humorales y de reclutamiento de células progenitoras al sitio de la herida, por lo tanto, no es aplicable a este tejido (Spector 2003); otro considerable factor es la inhabilidad de los condrocitos del cartílago maduro a contribuir en el proceso reparativo, si bien se ha encontrado clonación de condrocitos cerca del sitio de la herida, no como en otros tejidos la zona hiper celular alrededor del defecto. La ausencia de la respuesta hiper celular puede ser relacionada a la baja densidad celular, la baja tasa mitótica de los condrocitos y podría ser que las células no puedan migrar libremente a través de su matriz extracelular y acercarse lentamente hacia la herida (Langer et al 1993). Estos son algunos de los elementos que proporcionaron el razonamiento de desarrollar técnicas de ingeniería de tejidos en el cartílago (Langer 1993; McIlwraith 1996; Saraf 2006).

Por medio de métodos convencionales (Rayos X, Resonancia magnética, tomografía axial computarizada, etc.), es necesario diagnosticar a tiempo, la pérdida del cartílago, antes de que sea muy severa o bien evitar que se pierda más y además estimular la reformación del cartílago perdido. Los métodos convencionales quirúrgicos ayudan al proceso de reparación, pero no trae como resultado la regeneración del cartílago articular (Langer et al 1993).

La regeneración del cartílago, vía implante de condrocitos autólogos puede mejorar el tratamiento de estos defectos, sin embargo, aun hay reportes contradictorios sobre el éxito de este tipo de implante en modelos animales, pues es difícil mantener la morfología y la funcionalidad de los condrocitos, esto es un desafío que ha creado un conjunto de esfuerzos enfocados a desarrollar

estrategias que provean una estimulación sostenida a las células, a través de factores de crecimiento y otras moléculas biológicas para promover la diferenciación en los condrocitos (Smith 2005; Saraf 2006), debido a que cuando se cultivan en monocapa, se desdiferencian hacia la línea fibroblástica, es decir que, las células cambian de una forma redonda a un aspecto estrellado, se aplanan y modifican su capacidad de producir colágena tipo II y proteoglicanos específicos del cartílago, como el agregano y hoy en día muchos protocolos han establecido que su metodología permite la rediferenciación *ex vivo* de estas células, (Lohmander 2005), pero se necesita demostrar si las células desdiferenciadas obtenidas del cultivo pueden rediferenciarse a condrocitos, *in vivo*, en el lugar del implante (Brommer 2003) y la extensión que alcanzan estas células implantadas para contribuir con la reparación en la herida (Brommer 2003; Spector 2003; Akens 2005).

Estudios clínicos recientes en pacientes humanos hacen énfasis en el alivio sintomático que se obtiene con este tipo de procedimientos (Canceda 2003; Smith 2005; Akens 2005; Takahashi et al 2007), donde finalmente el tejido fibrocartilaginoso formado, cumple el objetivo de proveer la reparación de la lesión del cartílago articular y sin dolor. Por ello, es importante definir cual es el objetivo de la ingeniería de tejidos estrictamente hablando de cartílago: crear cartílago hialino original o hacer un tejido con la estructura y propiedades necesarias para que actúe como el tejido original e induzca la reparación, permitiendo la función articular normal, sin dolor y que tenga un efecto de larga duración. Para determinar cuáles son los factores de una implantación exitosa y cuál es el mejor método es necesario terminar las investigaciones clínicas respectivas, empleando técnicas diagnósticas, no invasivas, para correlacionar los resultados clínicos, con el tejido de reparación formado, sin embargo clínicamente, el resultado por la recuperación del paciente, por el momento es el mejor estándar, (Hendrickson et al 1994; Lohmander 2005).

Los resultados de reparación de cartílago con implante de condrocitos autólogos en animales y en humanos, sugieren clínicamente, que en algunos pacientes la reparación funcional puede ser completa, no obstante los resultados todavía son inconsistentes (Todhunter 1996; Canceda et al 2003; Masri et al 2006), porque como se menciona anteriormente, no hay pruebas no invasivas para evaluar la reparación.

Hoy en día en la clínica para équidos, la ingeniería de tejidos ha sido incluida en la lista de tratamientos para las lesiones articulares, pero no se ha determinado que el tejido de reparación sea semejante al cartílago articular normal (Barnewitz 2003; Masri et al 2006).

En el Instituto Nacional de Rehabilitación en conjunto con la Facultad de Medicina Veterinaria--UNAM, anteriormente se realizaron implantes de condrocitos autólogos aislados de la articulación femoro tibio patelar (babilla) de caballos, previamente cultivados en monocapa. Estos resultados fueron parcialmente satisfactorios, ya que hay integración del implante al cartílago nativo, pero hubo pérdida del fenotipo de las células implantadas dando como resultado un tejido fibroso.

Dándole un nuevo enfoque a este tema, en el presente trabajo se evaluaron las características morfológicas y moleculares de condrocitos de caballo durante diferentes fases del cultivo, con el objetivo de establecer un protocolo de evaluación para los implantes de células autólogas antes de ser reimplantadas. En este caso se utilizaron condrocitos de caballo que provenían de la articulación metacarpo falángica (menudillo). Esta articulación presenta comúnmente el mayor número de traumas y lesiones degenerativas de todas las articulaciones del esqueleto apendicular de los équidos (Barnewitz 2003).

Se realizaron dos tipos de cultivos primarios: en monocapa y en pellet. En el cultivo en monocapa los condrocitos pierden su fenotipo, se desdiferencian a una

forma fibroblástica, predominando la colágena tipo I. En el cultivo en pellet, los condrocitos mantienen su fenotipo normal y la producción normal de colágena tipo II y agregano, componentes principales de la matriz extracelular del cartílago articular normal.

Se busco la expresión de colágena tipo II y la proteína central del agregano, como marcadores moleculares específicos de cartílago, la expresión de colágena tipo I, como marcador de la dediferenciación y la expresión de sox9, un factor de transcripción esencial para la diferenciación de los condrocitos y la formación del cartílago, ambos cultivos se comparación entre sí tomando de referencia los niveles expresados por los condrocitos del cartílago normal,

Las evaluaciones morfológicas se realizaron mediante histología y el análisis molecular, mediante técnicas tales como la PCR, la RT-PCR y la Hibridación *in situ* fluorescente.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

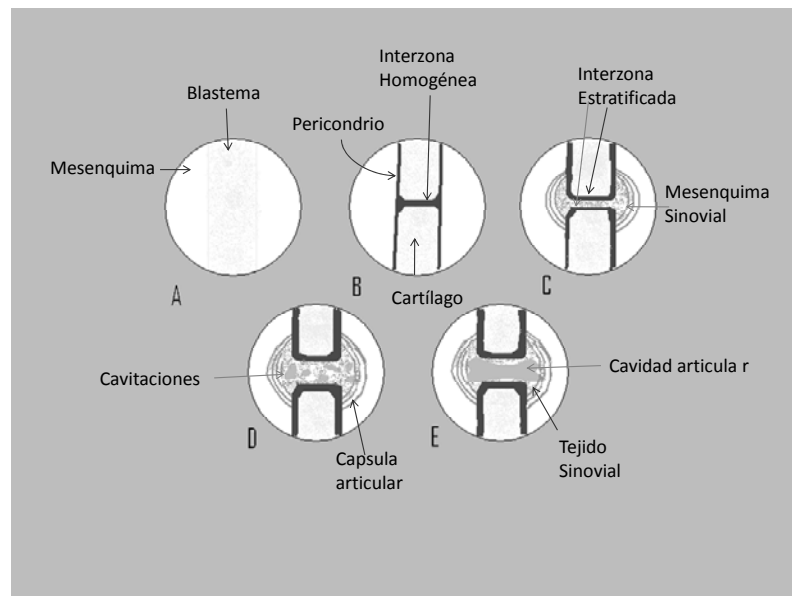
2.1 Generalidades.

2.1.1 Articulaciones sinoviales.

Las articulaciones sinoviales tienen dos funciones principales: permitir el movimiento y transferir cargas de energía. La estructura de las articulaciones sinoviales está diseñada de modo que facilita estas dos funciones.

El desarrollo de las articulaciones sinoviales puede ser dividido en dos estados: la formación y la diferenciación de la condroepífisis, la interzona y la cavidad articular. Las únicas estructuras que invaden en el desarrollo de los miembros, son los vasos sanguíneos y los nervios desde el axis del embrión.

Figura 1



Fuente: Todhunter RJ. Diagrama del desarrollo de la articulación.
Adaptación

Los tejidos articulares se desarrollan *in situ* desde el blastema y la mesenquima alrededor. La interzona se desarrolla en tres capas, una central vagamente arreglada y dos capas gruesas que mas tarde serán el cartílago de la articulación. Este estado de desarrollo es controlado genéticamente a través del borde apical ectodérmico. (Todhunter 1996; Garciadiego et al 2004).

La cápsula de la articulación consiste en una dura y fibrosa porción forrada de sub-sinovia o lámina propia y la membrana sinovial. La superficie articular está formada por cartílago hialino que cubre la placa de hueso subcondral. En las articulaciones sanas el espacio interarticular esta ocupado por un líquido viscoso, amarillo pálido o transparente fluido sinovial que esta en contacto con la membrana sinovial (Mankin 2001).

En la lámina propia se encuentran los vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. La cápsula de la articulación, ligamentos y meniscos consisten en su mayoría de tejido conectivo con poca celularidad. La matriz extracelular de estos tejidos es predominante la colágena tipo I, proteoglucanos, proteínas no colágenas y agua.

El líquido sinovial es un ultra filtrado de plasma, formada por los iones y moléculas que están también presentes en el plasma, con excepción del hialuronato, que esta muy concentrado en el fluido, también contiene células mono nucleadas (células de revestimiento sinovial, monocitos, linfocitos que constituyen un 90% del total, el 10% formado por leucocitos) aproximadamente 500 cel/ μ l en caballos. (Todhunter 1996; McIlwraith 1996). La viscosidad esta dada por el Hialuronato, que es el único proteoglucano que no es sulfatado y no tienen proteína central, en caballos la concentración normal es de 0.5 mg/ml esta viscosidad permite soportar la transición del estrés y absorber algo de la energía generada por el movimiento. (Todhunter 1996; Brommer 2003)

La interacción del líquido sinovial con el cartílago resulta en la lubricación de la articulación, en rigidez comprensiva durante el movimiento y además hay una respuesta visco elástica a la carga mecánica. (McIlwraith 1996)

2.1.2 Anatomía de la articulación del menudillo torácico (Figura 2).

Es la región alrededor de la articulación metacarpo-falángica (MCF). Clasificada como articulación sinovial o bien diartrodial. El extremo distal del tercer metacarpiano, el extremo proximal de la falange proximal, los dos huesos sesamoideos proximales y el ligamento metacarpo sesamoideo, forman a la articulación metacarpo-falángica. (Todhunter 1996, Brommer 2004)

En la cara palmar se encuentra el ligamento anular palmar, detiene a los tendones flexores digitales y a la vaina sinovial digital dentro del surco sesamoideo. El ligamento anular palmar se fusiona con el tendón flexor digital superficial y se une sobre el borde palmar de cada hueso sesamoideo proximal (HSP) con la inserción del ligamento colateral del HSP. El surco sesamoideo esta formado por el ligamento metacarpo sesamoideo, que cubre la superficie flexora de los HSP's, contiene a los tendones flexores digitales, el tendón flexor digital profundo pasa a través de una abertura circular del tendón flexor digital superficial. Los tendones extensores digitales común y lateral pasan sobre la cara dorsal de la articulación (Todhunter 1996).

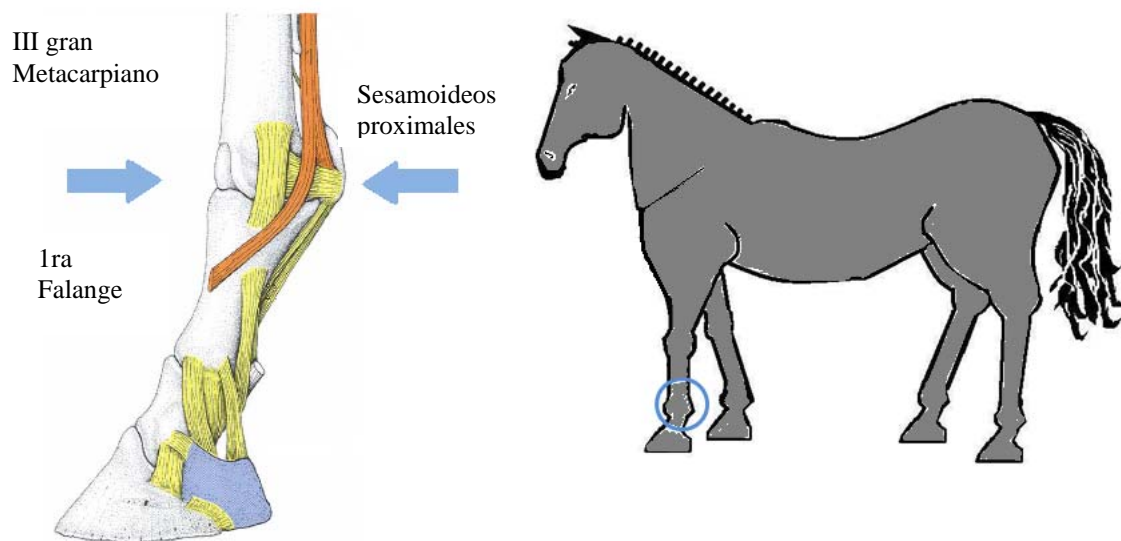
La superficie articular del tercer metacarpiano esta dividida en partes desiguales por la cresta sagital, la cual ocupa una depresión formada por la falange proximal, los huesos sesamoideos proximales y el ligamento metacarpo sesamoideo. (Todhunter 1996)

Los ligamentos colaterales, se extienden distalmente desde la eminencia y la depresión a cada lado del tercer metacarpiano y son intracapsulares.

La cara palmar de la capsula articular del menudillo tiene mayor volumen que la parte dorsal (Nixon 1993). Detrás de los tendones flexores digitales, hay una bolsa sinovial contra la capsula y puede comunicarse con la cavidad articular. El receso palmar de la capsula articular del menudillo se extiende proximalmente entre el tercer metacarpiano y el ligamento suspensor. (Todhunter 1996; Brommer 2004)

La capsula articular esta reforzada a cada lado por los ligamentos colaterales y dorsalmente por una fascia que se adhiere al tendón extensor digital común. La estabilización del menudillo durante la locomoción está dada por el ligamento suspensor y sus ramas extensoras para el extensor digital común y los ligamentos sesamoideos distales. (Adams 2004)

Figura 2



Fuente: König H, Llebich H 2005, Representación gráfica de la articulación metacarpo-falángica. Vista lateral. Modificación EM

2.1.3 Cartílago Articular.

Es un tejido conjuntivo de sostén altamente especializado. Tiene una apariencia traslúcida, como el cristal y se le denomina hialino. Es heterogéneo formado principalmente por un alto contenido de agua, entre 70%-80%, y una fina estructura de la red de fibras de colágena (Rodríguez 1998; Mankin et al 2001). En una base seca, el cartílago contiene 50 % de colágena, 35% de proteoglicanos, 10% de glicoproteínas: proteínasas y sus inhibidores, factores de crecimiento, lisozima, fibronectina, condronectina, proteína oligomérica del cartílago, etc. (Todhunter 1996; Dudhia 2005), 3% minerales, 1% lípidos, el porcentaje de condrocitos se considera según el volumen, Archer (2002) menciona que los condrocitos ocupan el 10 %.

El cartílago tiene variaciones en la micro estructura entre las diferentes articulaciones; áreas de carga y de no carga; y entre jóvenes y adultos (Todhunter 1996; Akens 2005). El cartílago no contiene vasos sanguíneos excepto aquellos que lo atraviesan para dirigirse a otros tejidos, de igual forma no presenta vasos linfáticos, o nervios. Su nutrición se realiza a partir del líquido sinovial mediante difusión. (Todhunter 1996; Rodríguez 1998; Kofron et al 2005)

2.2 Composición del Cartílago Hialino.

2.2.1 Condrocitos.

El condrocito es la única base celular constituyente del cartílago y (Archer 2002; Goldring 2006), es citoplasmáticamente aislada de sus vecinas. En el embrión durante su desarrollo, el cartílago tiene una extensiva distribución que provee al feto de plantillas para el desarrollo del esqueleto (Archer 2002; Adams 2002). Sin embargo en el adulto, la distribución del cartílago es más limitada, pero todavía se localiza en una variedad de sitios anatómicos (articulaciones, tráquea, septo nasal) donde la mayor función es el soporte (Adams 2002). En las articulaciones, el cartílago tiene una función adicional de proporcionar una superficie articular lisa (Platt 1996) y libre de dolor, pero es precisamente el

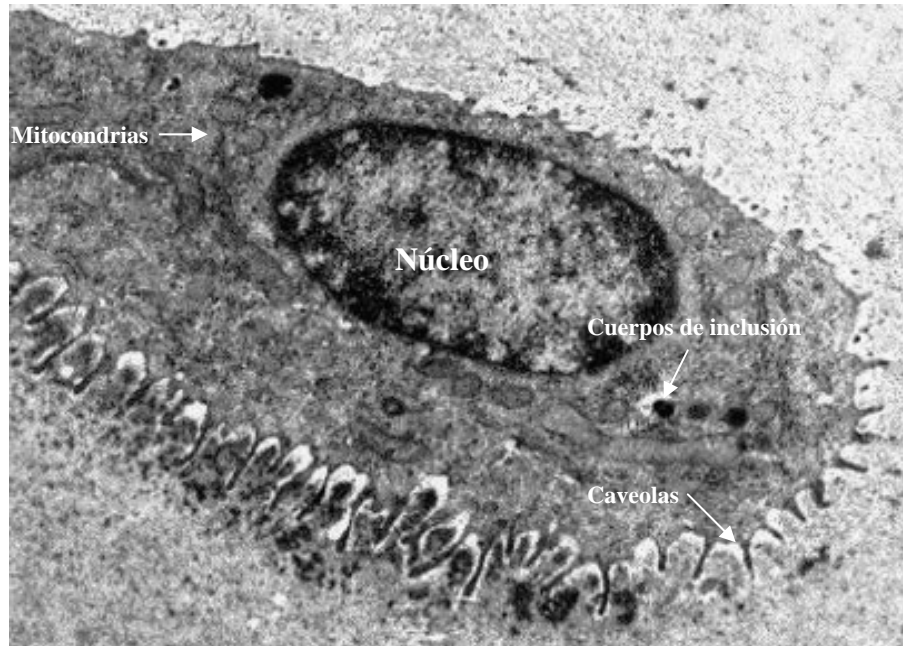
condrocito, quien es más susceptible en el tejido, cuando esté falla en el mantenimiento entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular expone al tejido a un gran número de condiciones degenerativas, la más común es osteoartritis (Goldring 2002).

2.2.1.1 Características morfológicas: normalmente los condrocitos son redondos o poligonales, excepto en bordes del tejido donde estos son más aplanados o discoideos, así como en la superficie de las articulaciones (Todhunter 1996).

Intracelularmente, el condrocito muestra una característica típica de actividad metabólica celular (Mankin 2001; Archer 2002), tiene que sintetizar y recambiar un gran volumen de matriz que consiste en colágena, glicoproteínas, proteoglucanos y hialuronato. Dentro de la célula se encuentran depósitos de glicógeno y la presencia de un cilio primario (Todhunter 1996; Archer 2002) (Figura3). Otra característica de los condrocitos es la relativamente gran matriz extracelular al volumen radial de la célula. El radio puede ser correlacionado a la función del cartílago, en los mamíferos tiene un gran radio, los condrocitos ocupan al menos 10% del volumen total del tejido (Archer 2002).

Los condrocitos de la capa profunda son de mayor tamaño, más redondos, ultra estructuralmente se componen de pocas mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico rugoso bien desarrollado, aparato de Golgi, vacuolas secretoras, retículo endoplásmico rugoso, núcleo, vesículas pinocíticas, caveola y microfilamentos (Todhunter 1996; Martin 2002).

Figura 3.



Fuente: Yang 2006. Microscopía de Electrónica de un condrocito.

2.2.1.2 Características metabólicas: Debido a que el cartílago no es vascularizado, es dependiente de la difusión que proviene de la superficie articular para el recambio de nutrientes y metabolitos. Consecuentemente el metabolismo entero de la célula es a una tensión baja de oxígeno, el rango está entre 10% en la superficie a < 1% en la capa profunda y los requerimientos de energía provienen de la glicolisis, como resultado los condrocitos no contienen abundantes mitocondrias, a pesar de ello las células son sintéticamente activas (Archer 2002; Hall 2003).

2.2.1.3 Origen celular y diferenciación: Los condrocitos, en el embrión tienen un origen mesodérmico (Archer 2002). Es una célula mesenquimal especializada, surgiendo de la capa periostial que rodea la membrana del hueso en respuesta a la estimulación mecánica. Siendo parte de la línea de tejido conectivo a los condrocitos se les considera tener un precursor primitivo: el "mecanocito" que como su nombre lo sugiere responde a estímulos mecánicos (Hall 2000).

En otros tejidos conectivos, el primer signo de iniciación de expresión del estado diferenciado, es la formación de una condensación celular en el sitio donde los elementos del esqueleto van a ser formados. Sin embargo, hay algunas dudas de cómo se lleva a cabo este mecanismo, las moléculas celulares de adhesión N-CAM y N-cadherinas tienen papeles importantes. El proceso de condensación señala la expresión de un número de moléculas específicas del tejido, como el factor de transcripción Sox-9, que es crucial en la condensación y precede a la expresión de colágena tipo II a, la isoforma alternativa de de colágena tipo II sintetizada por condrocitos inmaduros o condroblastos. La importancia de Sox-9 está en su habilidad de unir y activar la secuencia de la región activadora de Col2a 1 y de agrecano. L-Sox-5 y Sox-6 también han sido implicados en el proceso de diferenciación, por su co-expresión con Sox-9 (De Crombrughe 2000).

El destino de los condrocitos varía dependiendo de su origen y localización. Se refiere a un programa de diferenciación dirigido a la hipertrofia celular, el estado terminal diferenciado que facilita la osificación endocondral donde el hueso queda debajo de la matriz cartilaginosa calcificada del condrocito hipertrófico. En este contexto parece que el condrocito tiene dos posibles destinos. Aun si la célula muere por apoptosis o puede ser transdiferenciada o metaplásica a osteoblasto, esto convierte su matriz de cartílago a hueso (Adams 2002; Archer 2002).

2.2.1.4 Funciones del condrocito: Los condrocitos que se originan de la interzona, son muy parecidos a los condrocitos de la placa de crecimiento y aunque ambos tipos celulares forman cartílago tienen importantes diferencias y funciones como sintetizar, organizar y mantener la matriz extracelular (Platt1996; Archer 2002; Goldring 2002), La principal función del condrocito es ocupando estructuras de soporte, como el cartílago articular, y en la tráquea y nariz además, hacer posible la deformación física. Otra función de los condrocitos es el crecimiento, en las placas epifisiales (Rodríguez 1998; Archer 2002), el

crecimiento constituye un incremento en el volumen, los condrocitos alcanzan esto por tres mecanismos: primero a través de la proliferación y producción de más células; segundo a través de la secreción de matriz extracelular y tercero a través del incremento del volumen celular que ocurre durante la hipertrofia (Goldring 2006).

2.2.2 Matriz extracelular.

La matriz es la responsable del mantenimiento de la homeostasis del cartílago, es el principal componente que determina las propiedades biomecánicas, contiene una gran proporción de agua, fibras de colágena y una sustancia amorfa compuesta por proteoglucanos, una pequeña cantidad de lípidos y componentes inorgánicos también están presentes.

2.2.2.1 Agua: En el cartílago articular, el grado de hidratación está determinado por el equilibrio de la presión total del aumento de volumen ejercida por los proteoglucanos y las fuerzas de restricción desarrolladas en la red de colágena (Murray 2003).

El agua constituye aproximadamente un 75% del peso húmedo del cartílago (Mallein 1998) y es más abundante en las capas superficiales, participa en la difusión de nutrientes, la mayor parte de encuentra en el espacio extracelular, un 30% se asocia con el espacio intrafibrilar dentro del colágeno y el resto se encuentra en el espacio de poros moleculares de la matriz extracelular.

La cantidad de agua depende de varios factores: a) concentración de proteoglucanos, que debido a su actividad osmótica causan la acumulación de grandes volúmenes, lo que aumenta la presión resultante de las cargas negativas; b) organización macromolecular de la colágena; c) resistencia y rigidez de la red de colágena (Alberts et al 2002).

El contenido de agua no está distribuido homogéneamente en el cartílago, disminuyendo su concentración desde un 80% en las capas superficiales hasta aproximadamente un 65% en la zona profunda (Martin 2002).

La resistencia a la fricción contra este flujo por los poros moleculares de la matriz es muy alta y por lo tanto la permeabilidad muy baja. Esta resistencia a la fricción y la presurización del agua dentro de la matriz son los dos mecanismos básicos que permiten al cartílago soportar cargas articulares muy altas.

La capacidad de los proteoglucanos de atraer agua implica tres mecanismos fisicoquímicos: La presión osmótica de Donnan, causada por los iones intersticiales que flotan libremente (Ca^{++} y Na^+) y que son necesarios para neutralizar las cargas en los proteoglucanos; las fuerzas de repulsión electrostática desarrolladas por las cargas negativas fijas de las moléculas de proteoglucanos; la tendencia entrópica de los proteoglucanos de ganar volumen estando en solución. (Martin 2002)

2.2.2.2 Colágena: En el cartílago articular hay diversos tipos de colágena, representa el 20% del peso total; un 50-80% del peso seco; 95% es Colágena II, a esta proteína se confiere la estructura y rigidez del cartílago (Dudhia 2005). Sus principales funciones son proporcionar al tejido propiedades ténsiles e inmovilizar los proteoglucanos dentro de la matriz, el 5% restante está formado por los tipos IX y XI y en menor cantidad por los tipos V, VI, X, XII, XIV (Montgomery 1998; Murray 2003).

La colágena es un homotrímero, tiene un alto nivel de organización estructural. La unidad básica es el tropocolágeno, que está compuesto por tres cadenas polipeptídicas o cadenas α . El tipo IX está formado por tres tipos distintos de cadenas α_1 , α_2 y α_3 ; la cadena α_1 contiene una región globular no helicoidal y la cadena α_2 está modificada para contener una cadena de glucosaminoglucanos. El tipo X es una colágena de bajo peso molecular que contiene tres cadenas α idénticas, se encuentra en la zona calcificada del cartílago. El tipo VI no es un

componente primario de la matriz extracelular, pero se encuentra en el área pericelular alrededor de los condrocitos. El tipo XII contiene tres cadenas α_1 , esta presente en pequeñas cantidades. Finalmente el tipo XIV estructuralmente similar al tipo IX pero se desconoce su función (Olsen 1998; Horton 1998).

La composición de aminoácidos de las cadenas incluye grandes cantidades de glicina y prolina. Cada una de ellas tiene forma de hélice levógira y entre las tres forman una triple hélice dextrógira unida por enlaces covalentes. Estas moléculas de tropocolagéno miden aproximadamente 1.4 nm de diámetro y 300 nm de longitud. Extracelularmente se polimerizan y se unen mediante enlaces covalentes formando fibrillas de colágena. La colágena tipo II no forma haces, se dispone individualmente, el diámetro de sus fibras varía entre 20 y 200 nm (Montgomery 1998; Murray 2003).

2.2.2.3 Proteínas no colágenas: Otros constituyentes de la matriz del cartílago además del agregano y colágena han sido descritos, participan en el ensamblaje de la matriz y han sido relacionados en la regulación de la homeostasis del tejido.

Los pequeños proteoglicanos miembros de la familia rica en leucina, se ha visto que tienen un papel en ambos el ensamblaje de las fibras de colágena y sus interacciones. Estas moléculas pueden unir factores de crecimiento como el TGF- β y tal vez tengan un papel en la regulación del metabolismo del condrocito. El cartílago articular contiene otras moléculas donde su papel funcional no está bien definido. La proteína oligomérica de la matriz del cartílago es una proteína pentamérica miembro de la familia de las trombospondinas. La proteína une la colágena I y II y el dominio no colágeno de colágena IX. La proteína de la capa intermedia del cartílago (CILP), una proteína monomérica que se encuentra de la capa media a la capa profunda ha sido identificada y caracterizada en cartílago articular de adulto. La fibronectina está presente en pocas cantidades en el cartílago, su expresión y contenido se incrementa abundantemente en casos de

osteoartritis. Condronectina, Ancorina CII, Decorina y constituyen el almacén de las macromoléculas, organizan y mantienen las macromoléculas de la matriz y su interrelación con el condrocito. Así un gran número de macromoléculas representan diferentes regiones y probablemente diferentes funciones en el tejido (Montgomery 1998; Olsen 1998; Horton 1998; Bernier 1998; Chen 1998; Murray 2003).

2.2.2.4 Lípidos: Constituyen 1% o menos del peso húmedo del cartílago. Se encuentran tanto en las células como en la matriz (San Roman 1997).

2.2.2.5 Proteoglucanos: están constituidos por cadenas de glucosaminoglucanos unidos a una proteína central mediante enlaces covalentes (Alberts et al 2002). Los glucosaminoglucanos son cadenas de polisacáridos no ramificadas compuestas por unidades repetidas de disacáridos, uno de los 4 residuos es siempre un amino azúcar (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina), que en la mayoría de los casos se encuentra sulfatado; se clasifican en cuatro grupos principales: a) ácido hialurónico, b) condroitín sulfato y dermatán sulfato, c) heparán sulfato y heparina, d) queratán sulfato. Las cadenas de polisacáridos son rígidas por lo que forman estructuras alargadas que ocupan un gran volumen. Los GAG proporcionan un soporte mecánico para el tejido, constituye el 10% del peso del total de las proteínas. (Montgomery et al 1998; Alberts et al 2002)

Los proteoglucanos se diferencian de otras glucoproteínas por la naturaleza, cantidad y organización de sus cadenas glucídicas laterales. Las glucoproteínas contienen entre 1 y 60% en peso de oligosacáridos cortos, mientras que los proteoglucanos contienen hasta un 95%, generalmente una larga cadena de GAG no ramificada. (Alberts et al 2002; Murray 2003). La carga negativa fija de los proteoglucanos contribuye a mantener un alto grado de hidratación del tejido cartilaginoso al generar una presión elevada (Todhunter 1996).

Los proteoglucanos se encuentran en la matriz en forma de monómeros decorina, biglicano, lumicano y fibromodulina o bien en forma de agregados o grandes complejos moleculares de los cuales el agrecano es el más abundante. La estructura de los proteoglucanos en el cartílago es heterogénea. (Alberts et al 2002). Las diferencias en la longitud de las cadenas, cantidad de condroitin y queratán sulfato, longitud de la proteína central y grado de agregación contribuyen a las variaciones estructurales y de composición de los proteoglucanos en el cartílago, a su vez la distribución de los proteoglucanos en la matriz tampoco es homogénea, siendo mas abundante en la zona media que en la superficial (Martin 2002).

El tamaño de los proteoglucanos y su capacidad para formar grandes agregados juega un papel fundamental para retener moléculas en el tejido y para formar una estructura elástica que contribuye a las propiedades materiales del cartílago (Rees 2005).

2.2.2.6 Agrecano (Figura 4): es el proteoglucano principal del cartílago, tiene una masa de alrededor de $3 \times 10^6 - 10^9$ Daltons y esta presente en grandes concentraciones, esta estructura multimolecular se compone por más de 100 cadenas de GAG (Alberts 2002; Dudhia 2005). Se une al ácido hialurónico formando agregados (Mallein 1998; Alberts 2002). Forma el 35% de las proteínas presentes en el tejido. El tamaño de los agregados varía dependiendo del tamaño de la cadena de ácido hialurónico (Martin 2002). El agrecano pertenece a la familia de grandes proteoglucanos agregados, las lectinas que a su vez forma parte de una familia llamadas hialuroadherinas llamadas así porque pueden formar uniones no covalentes con ácido hialurónico (Goldring 2004).

A nivel molecular el ensamblaje de agregados es fundamental para la organización funcional de agrecano y otros componentes de la matriz extracelular.

El agregano esta fuertemente representado con GAG's, N y O oligosacaridos conectados aproximadamente 100 cadenas Condrutin sulfato y 30 o mas de keratán sulfato unidas en distintas regiones (Olsen 1998; Horton 1998).

El condroitín sulfato está constituido por una repetición de unidades disacáridos de acido glucorónico y de N-acetilgalactosamina con un grupo sulfato por disacárido; el queratán sulfato está formado por la repetición de unidades disacáridos de galactosa y N-acetilglucosamina con un grupo sulfato por disacárido (Montgomery 1998; Olsen 1998).

Ambos son moléculas grandes con un peso molecular de 50000 D y considerable carga negativa, están asociados a una densidad de carga fija elevada (0.05 a 0.3 mEq/g de peso total del tejido). Esta densidad de carga fija es responsable del equilibrio de distribución iónica de Donnan en el intersticio y de la presión osmótica de Donnan, lo cual contribuye a la rigidez a compresión total del cartílago (Martin 2002).

La proteína central tiene una estructura modular, conteniendo tres uniones disulfidicas llamadas dominios globulares G1 G2 y G3 y una extendida porción dedicada a la modificación de GAG's, una región N-terminal esta formada por el dominio globular G1 conocido también como la región de unión del acido hialurónico, dos ciclos de secuencias repetidas o módulos de conexión y un modulo el cual tiene una estructura similar con la "Ig fold" (Alberts 2002).

En cada interacción del agregano con el acido hialurónico esta involucrada una proteína de unión una glucoproteína de 41-48 kDa con una secuencia similar al del dominio G1 del agregano y los dos interactúan vía secuencia de Ig.

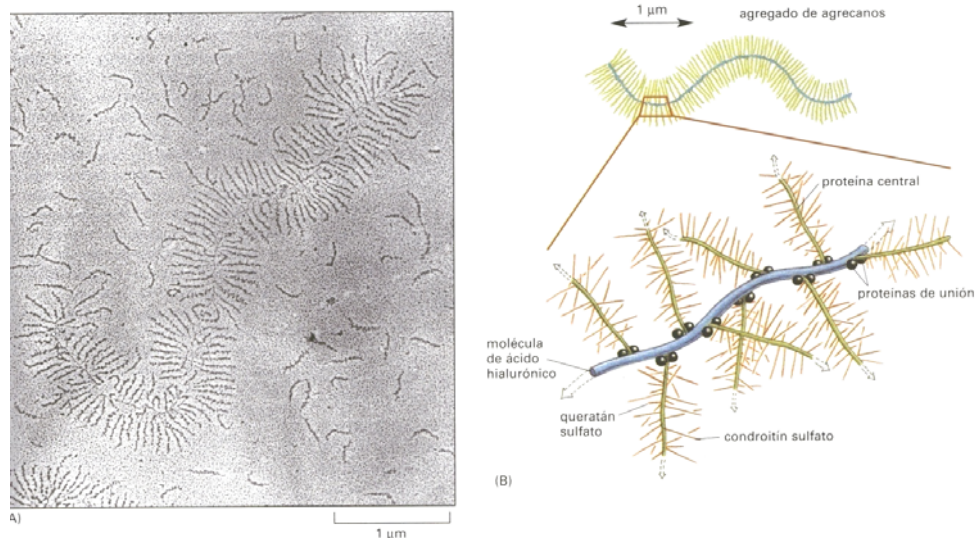
La asociación entre G1 y el acido hialurónico es muy fuerte con un aparente K_D de aproximadamente $0.226 \mu\text{M}$ a pesar que entre la proteína de unión y el acido hialurónico es grande aun con un K_D de $0.089 \mu\text{M}$ esta muy

incorporado del complejo. La estabilidad del agregado depende de estos tres componentes (Murray 2003; Rees 2005).

El dominio G2 comparte algunos rasgos estructurales del dominio G1, contiene los módulos de conexión pero no la secuencia de Ig. Sin embargo no tienen propiedades de unión con el ácido hialurónico.

Su función no está determinada al parecer inhibe la secreción de agregano antes de la modificación con GAG's en el aparato de Golgi. Actúa como un retardante de la secreción de agregano asegurándose que solo los monómeros de agregano glicosilados sean secretados (Heinegård 1991; Mallein 1998; Dudhia 2005).

Figura 4.

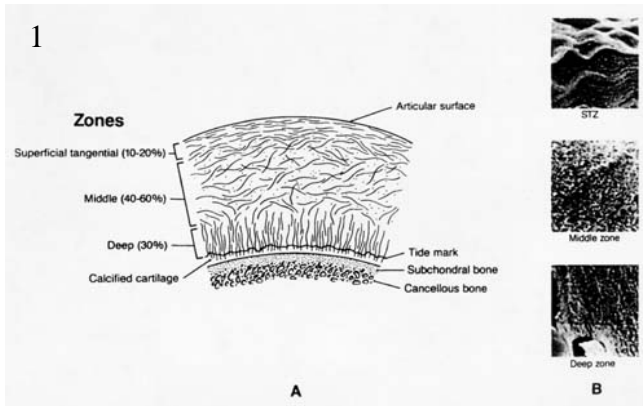


Fuente: Alberts et al 2002. Microscopía de Electrónica de Agregano y representación gráfica de un agregado de agreganos.

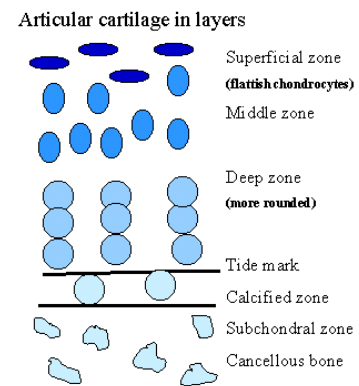
2.2.3 Arquitectura del cartílago hialino (Figura 5).

El cartílago adulto puede ser subdividido en 3 zonas sin mineralización, las cuales son delimitadas por la "línea de marea" de una 4ta zona de cartílago calcificado.

Figura 5



2



Fuente 1) Loren K 2002, 2) Guilak 1999 Representación esquemática de las zonas del cartílago.

2.2.3.1 Zona superficial o tangencial: es adyacente a la cavidad articular, los condrocitos adoptan una forma alargada o elipsoide y se orientan paralelos a la superficie. Las células presentan escasa actividad, con mitocondrias pequeñas poco numerosas, escaso volumen citoplasmático, retículo endoplásmico rugoso pobremente desarrollado y pocos ribosomas, esto indica una pobre síntesis proteica. Las fibras de colágena son finas y se disponen paralelamente a la superficie para soportar las fuerzas de cizallamiento durante el movimiento articular.

2.2.3.2 Zona intermedia o transicional: las células adoptan una morfología redondeada y son más grandes que las de la zona superficial. Presentan un aparato Golgi bien desarrollado con abundantes vesículas, vacuolas y mitocondrias. El retículo endoplásmico rugoso es extenso y con numerosos ribosomas. Los condrocitos se disponen irregularmente y las fibras de colágena son más gruesas y se orientan en los tres planos del espacio.

2.2.3.3 Zona profunda o radial: las células son redondeadas y presentan las mismas características de las de la zona intermedia, lo que indica una elevada síntesis proteica, pero adoptan un acomodamiento de columna. Las fibras de colágena son gruesas y se distribuyen paralelamente entre si y perpendiculares a la superficie articular para ofrecer resistencia a las fuerzas de compresión. El

contenido en agua es menor que en las anteriores y los proteoglicano son más abundantes.

2.2.3.4 Zona calcificada: es una capa adyacente al hueso y separada de la zona profunda por una línea basófila llamada línea de marea. La matriz esta impregnada de sales de calcio, las células son pequeñas y con escaso citoplasma e incluso aparecen necróticas, en esta zona se produce un anclaje del cartílago al hueso subcondral.

2.2.4 Regiones del cartílago (figura 6).

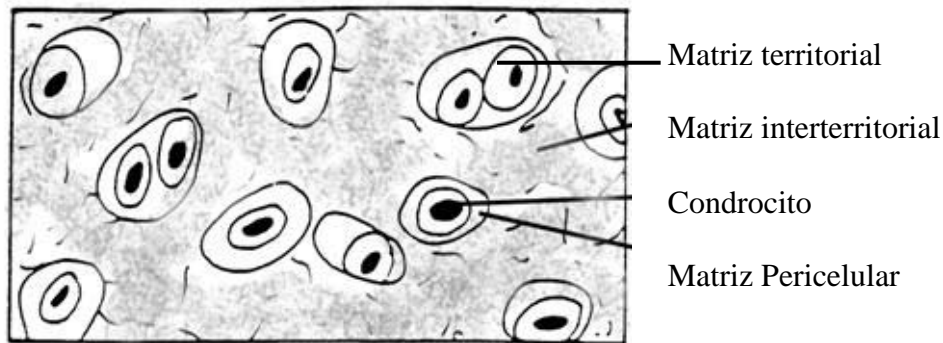
La composición de la matriz varía según las diferentes regiones del cartílago, distinguiéndose la región pericelular, territorial, e interterritorial, dependiendo de la proximidad con el condrocito. Estas regiones difieren en el contenido en colágena, proteoglicano y en el diámetro y organización de fibras de colágena. La disposición de las fibras de colágena es un sistema radial de fibras perpendiculares recubiertas por una capa tangencial superficial, excepto en la zona intermedia donde la organización es menos ordenada.

2.2.4.1 Matriz pericelular: es una capa delgada adyacente a la membrana celular de los condrocitos, contiene principalmente proteoglicanos y otros componentes no colágenos, casi no hay fibras de colágena.

2.2.4.2 Matriz territorial rodea a la matriz pericelular y presenta fina fibrillas de colágena que parecen formar una red fibrilar, que es diferente de la matriz interterritorial.

2.2.4.3 Matriz interterritorial es la más grande de las regiones y se encuentra situada entre las matrices territoriales de los condrocitos individuales o de los grupos de estos, contienen la mayor parte de los proteoglicanos y las fibras de colágena.

Figura 6.



Fuente: Biology laboratory web site. Esquema de regiones del cartílago.

2.2.5 Histología del cartílago hialino.

En el análisis histológico del cartílago hialino, la matriz cartilaginosa parece no poseer estructura, porque la colágena forma fibrillas muy delgadas (Todhunter 1996), es necesario evaluar la apariencia de las células y de su matriz extracelular, normalmente los condrocitos se encuentran bien desarrollados, en ocasiones en pares, con núcleos redondos u ovoides, y están dentro de sus lagunas. Las propiedades de tinción del cartílago están relacionadas con los grupos sulfato y carboxilo, así como la acidofilia de la colágena. (Martín 2002; Lombardero 2005)

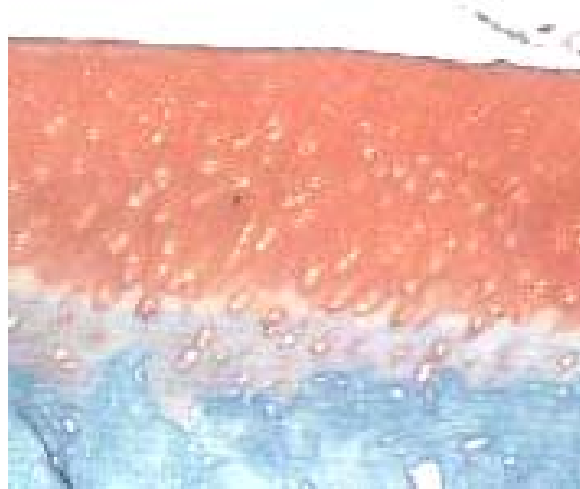
La tinción hematoxilina y eosina sirve para evaluar la morfología celular y la estructura de la matriz extracelular. La matriz del cartílago es basofila (azul o morado) muy marcada alrededor de cada grupo isógeno de la matriz territorial, se debe a la gran cantidad de glucosaminoglucanos sulfatados ácidos en esa zona. Las fibras de colágena y el citoplasma de las células son acidofilas (rosa o roja). (Todhunter 1996; Martin 2002).

La tinción tricrómica de Masson sirve para indicar la presencia de colágena en la matriz extracelular (azul) Los núcleos de los condrocitos se tiñen azul oscuro y el citoplasma de las células rojo. La tinción Azul alciano sirve para determinar la

presencia de glucosaminoglucanos mucopolisacáridos en la matriz del cartílago. (Todhunter 1996; Martin 2002).

La tinción de Safranina (Figura 7), que es un indicador muy útil del contenido de proteoglucanos de la matriz extracelular, por su carga catiónica, que se une a los proteoglucanos que son aniónicos. Se tiñe rojo anaranjado, la región pericelular y territorial se tiñen mas intensamente que la interterritorial (Todhunter 1996; Martin 2002).

Figura 7.



Fuente: Barzilla 2005. Imagen microscópica de cartílago articular, tinción Safranina.

2.2.6 Metabolismo del cartílago hialino.

En general, el metabolismo del cartílago articular es lento. Los condrocitos sintetizan las macromoléculas de proteoglucanos y colágena que secretan al espacio extracelular, para formar y regular la propia matriz que los envuelve.

Utiliza principalmente la vía anaerobia para la producción de energía por lo que el consumo de oxígeno es considerablemente menor al de otros tejidos. El mantenimiento de la matriz extracelular depende del equilibrio de la síntesis de los componentes, la integración de éstos a la matriz, de su degradación y liberación del cartílago (Hall; Wiseman 2003).

Varios factores hormonales son importantes en la regulación de las actividades metabólicas de los condrocitos, donde participan la hormona del crecimiento, calcitonina y andrógenos. Por otro lado, algunos factores de crecimiento como son el factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento transformante beta, proteína morfogénica de hueso y el factor de crecimiento epidermal, estimulan la proliferación de los condrocitos, la síntesis de colágena II y proteoglicanos (Yeh 2004).

No se conoce en forma precisa como los condrocitos coordinan el recambio de la matriz extracelular. La interleucina y el factor alfa de necrosis tumoral son producidos por las células de la membrana sinovial influyen en la producción de las metaloproteinasas por parte de los condrocitos y estas son capaces de degradar la matriz del cartílago de forma normal (Hirschmann F 2001).

2.3 Biología molecular del cartílago hialino

2.3.1 Condrogénesis.

La condrogénesis o morfogénesis del cartílago articular, se forman de regiones específicas de las condensaciones (Hall et al 2000) pre cartilaginosas por un proceso complejo que involucra la pérdida de diversos marcadores condrogénicos y de apoptosis. La condrogénesis durante el desarrollo y el mantenimiento del equilibrio celular con la matriz extracelular son eventos claves para la adecuada función de la articulación. La condronectina es crítica en la embriogénesis temprana, sus niveles se encuentran aumentados antes de las condensaciones pre condrogénicas (Adams 2002).

Comienza con la condensación de las células mesenquimales, el tamaño de la condensación es regulada a través de señalizaciones que involucran a BMP-2 y BMP-4, seguida por su diferenciación en condrocitos. BMP's favorecen en el reclutamiento de células a las condensaciones, es antagonizado por Nogina, actúan como "feedback", las condensaciones pueden llegar a ser hiperplásicas en ausencia de nogina. TGF- β regula a la fibronectina (Semevolos 2001) y estos dos

están involucrados en el inicio de la condensación. Tenasina y su receptor Sindecano unidos bloquean a N-CAM, consecuentemente el crecimiento de la condensación es bloqueada, y la diferenciación es facilitada. (Hall et al 2000)

Durante la etapa embrionaria, Sox-9 induce la condrogénesis (Akiyama 2007) es expresado en todo el cartílago coincidente con la expresión del gen Col2a1 para colágena α_1 (II). Sox -9 se une a la secuencia esencial en los genes Col2a1 y Col11a2 (XI) condrocito específicos, se ha asociado también a un gen promotor de agregano (De Crombrughe 2000).

El primer paso es la inhibición de la maduración de los condrocitos en las células que se ubican en la interzona, los genes reconocidos en esta fase se encuentran el Wnt9a, GDF5, GDF6, Proteínas Morfogénicas de Hueso como BMP2, BMP4 y BMP7 y algunos antagonistas como Nogina y Cordina continúan con el desarrollo de la articulación. Algunas moléculas de adhesión celular como la integrina $\alpha_5\beta_1$ también regulan la formación de la articulación promoviendo la diferenciación de los condrocitos.

Probablemente los diversos tipos celulares presentes en la articulación madura, como células sinoviales y células de la capsula articular tengan su origen en la interzona. Los condrocitos articulares disminuyen su maduración hacia la hipertrofia, sintetizan una matriz abundante en proteoglicanos. La hipertrofia de los condrocitos es seguida por apoptosis, la invasión de vasos sanguíneos, osteoclastos y otras células mesenquimales provenientes del pericondrio y la producción de la matriz de hueso, el tamaño y forma de las articulaciones depende de la regulación coordinada de la proliferación, maduración e hipertrofia de los condrocitos, los cuales responden a múltiples señales extracelulares, como las inducidas por Indian Hedgehog (Ihh) que coordina la proliferación y diferenciación de los condrocitos.(Garcíadiago 2004)

Ihh es producida por los condrocitos pre hipertróficos e induce la expresión de PTHrP en el pericondrio que a su vez regula la tasa a la que los condrocitos salen del ciclo celular y siguen a la hipertrofia, también estimula la proliferación de

los condrocitos. IGF1 e IL1 α tienen efectos antagonistas en la expresión genética y sobrevivencia de la célula. (Kolettas 2001) Los condrocitos pueden tener dos destinos posibles, convertirse en condrocitos pre articulares o en condrocitos pre hipertróficos. Además de el desbalance de las señales proliferativas en etapas embrionarias, la hipertrofia trae importantes consecuencias en el cartílago articular, como la osteoartritis.

2.3.2 SOX9

Sox9 miembro de una gran familia de genes Sox (Kolettas et al 2001) un factor de transcripción que contiene un grupo dominio de gran movilidad (HMG) similar a SRY, que se requiere para la diferenciación de los condrocitos y la formación de cartílago (Huang 2000). Sox9 también se expresa en otros tejidos como el sistema nervioso y el sistema urinario. Sox9 une las secuencias esenciales en Col2a1 y la colágena α 2 (XI) gen Col11a2 activadores específicos de los condrocitos (Bi et al 1999), es co-expresado con Colágena tipo II, recientemente se demostró que es un activador del gen promotor y activador del agregano (Horton 1998).

2.4 Generalidades de cultivo celular.

Se entiende por cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de células in vitro, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Dependiendo del grado de preservación de la estructura del tejido o del órgano de origen y de su duración se conocen diferentes tipos de cultivo: de órganos, explantes, primarios o secundarios (Davis 1994; Freshney 1987).

Aplicaciones del cultivo celular: los estudios que emplean cultivos celulares comprenden gran número de áreas de estudio como la Virología, Investigación del cáncer, Inmunología, Ingeniería de Proteínas, Estudios de interacción y señalización celular en la diferenciación y el desarrollo, Aplicaciones diagnosticas,

Aplicaciones clínicas, Industriales y Agronómicas; y se estudian cosas como la Actividad intracelular (transcripción de DNA, síntesis de proteínas, metabolismo energético) Flujo intracelular (ensamblaje y des-ensamblaje de diferentes Componentes intracelulares, Movimientos intracelulares de sustancias, movimientos de RNA, de proteínas etc.) Ecología celular (condiciones ambientales para el mantenimiento de la función celular, cinética de la población celular etc.) Interacciones celulares (cooperación metabólica, inhibición por contacto o adhesión etc.) (Davis 1994; Freshney 1987).

2.4.1 Tipos de cultivo.

1. Cultivo de órganos: se refiere al cultivo donde se cultiva un fragmento, implica que la arquitectura del tejido se conserve, este tipo de cultivo permite que se conserve el fenotipo, pero esta limitado su crecimiento.
2. Explantes primarios: Son fragmentos de tejidos o de órganos que se adhieren a una superficie, o están suspendidos, en la que proliferan las células de la periferia del implante.
3. Cultivo celular: Donde hay una disgregación celular, enzimática o mecánica, la suspensión celular se puede cultivar como una monocapa, se pierde la heterogeneidad celular, la población se hace homogénea o bien se mantienen en suspensión (Davis 1994; Freshney 1987; Helgason 2005).

La evaluación de las células durante el cultivo celular se puede llevar a cabo de diferentes formas entre las cuales están:

2.4.2 Viabilidad celular: La tinción con azul tripano es utilizada para determinar el número de células viables *in vitro*, de un cultivo celular (Altman 1993). Se basa en el principio de que el colorante, no se introduce en las células vivas, debido a la membrana celular íntegra que no permite la entrada de este, mientras que las células muertas presentan una desintegración de la membrana el colorante se introducirá fácilmente a la célula (Davis 1994).

2.4.3 Curvas de proliferación celular: refleja el cambio en el número de células durante un periodo de tiempo. La forma de la curva de crecimiento es característica de cada tipo celular y permite obtener el tiempo de duplicación celular (Farjanel 2005).

Al principio del cultivo, las células pasan por un periodo de latencia fase “lag” en el que no se dividen, porque se encuentran en un periodo de adaptación, una vez pasado este periodo, las células empiezan a proliferar de forma exponencial fase “log” hasta que dejan de dividirse al alcanzar la confluencia, donde hay inhibición del crecimiento por la densidad fase “plateu”. (Paul J 2007)

2.4.4 Cultivo de condrocitos: Los condrocitos vivos aislados *in vitro* exhiben un movimiento ameboideo, cambian constantemente su forma mediante la emisión de pseudópodos (Martin 2002), responden a gran variedad de estímulos ambientales: mediadores solubles como los factores de crecimiento e interleucinas, agentes farmacológicos, composición de la matriz, cargas mecánicas, cambios en la presión hidrostática etc. Cuando los condrocitos son cultivados en rangos de <0.1- 20% de tensión de oxígeno un número importante de genes anabólicos son sobre regulados como TGF β y factor de crecimiento de tejido conectivo y a nivel de transcripción HIF y AP-1 elevados en respuesta del reducido O₂ (De Crombrughe 2000; Wiseman 2003; Hall 2003; Farjanel 2005).

2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Es la técnica más popular en biología molecular (Evans 2005). Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de DNA. Como su nombre indica, se basa en la actividad de la enzima polimerasa que es

capaz de fabricar una cadena de DNA complementaria a otra ya existente. Sus únicos requerimientos son, que existan oligonucleótidos en el medio que son la materia base para fabricar el DNA y una pequeña cadena de DNA que pueda unirse a la molécula que se requiera copiar para que sirva como cebadora "primer". Esta reacción continúa en múltiples ciclos con condiciones adecuadas para la síntesis de la bio molécula, cada uno dobla la cantidad de DNA sintetizado, es decir que se pueden tener múltiples copias de la región a estudiar a partir de una pequeña muestra. Con la PCR las secuencias de DNA específico se pueden amplificar o multiplicar de manera exponencial (Dorak 2006).

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta pero presenta algunos inconvenientes, como son que no es una técnica cuantitativa y una alta probabilidad de obtener falsos positivos por contaminación. Es imprescindible realizar una adecuada manipulación de los reactivos, así como la temperatura precisa para optimizar que la secuencia de los cebadores se una al DNA, en la localización correcta (Dorak 2006).

Así, la PCR se realiza ejecutando una serie de ciclos con cambios de temperatura. Elevar la temperatura permite la separación de las cadenas de DNA, el ciclo de temperatura frío permite que se unan las sondas y la enzima polimerasa reproduce una copia exacta del material blanco. La especificidad se le confiere a la reacción mediante el uso de sondas, en este caso oligonucleótidos de 13-27 nucleótidos que en las condiciones de reacción específicas disparan la síntesis. Los productos de la reacción son posteriormente analizados e identificados mediante un gel de electroforesis (Livak 2001).

2.6 Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La transcripción reversa de un fragmento de RNA y su posterior amplificación por medio de la PCR es una de las herramientas de elección en el laboratorio, pero al ser una técnica de carácter cualitativo, fue necesario desarrollar una

técnica que permitiera cuantificar la amplificación del DNA. Se conoce como PCR cuantitativa o PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real es más sensitiva y permite la cuantificación de pequeñas transcritos raros o cambios en la expresión genética (Pfaffl 2001).

La combinación de la PCR y la fluorescencia es la posibilidad de detectar en tiempo real y cuantitativamente la amplificación del genoma de interés. La PCR en tiempo real es la conversión de las señales de cada reacción en un valor numérico para cada muestra (Shipley, Dorak 2006). Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de un fragmento de DNA (sonda) complementario a una parte intermedia del DNA que queremos amplificar (Dorak 2006).

Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la DNA polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando (Wittwer et al 1997). En general, para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de DNA que se está amplificando (Livak 2001). La técnica más simple de detección de productos de PCR en una PCR en tiempo real es utilizando el marcador SYBR Green, que se une específicamente a las cadenas dobles del DNA (Pfaffl 2001).

Los métodos mas usados para analizar los datos de una RT-PCR, son conocidos como cuantificación relativa y cuantificación absoluta. La cuantificación absoluta determina el número de copias obtenidas, generalmente relacionando la señal de PCR a una curva estándar. La cuantificación relativa relaciona la señal de PCR de la sonda transcrita del grupo tratamiento a otra sin tratamiento o control (Livak 200; Pfaffl 2001).

2.7 Hibridación *in situ* fluorescente.

Es la detección *in situ* de secuencias de ácidos nucleicos, ya sea de genes en cromosomas, o virus, o mRNA en tejido, provee una visualización directa de la localización espacial de las secuencias específicas que es crucial para la elucidación de la organización y función de los genes (Wilkinson DG 1998). Como consecuencia, los métodos de hibridación *in situ* han cobrado importancia en diferentes campos de investigación, incluyendo el diagnóstico de re-arreglos cromosómicos, detección de infecciones virales y análisis de la función de los genes durante el desarrollo embrionario (Wilkinson DG 1998; Darby 2000).

Tiene la ventaja de la alineación específica de las moléculas complementarias de los ácidos nucleicos, puede ser DNA o RNA, se une a través de puentes de hidrogeno formadas entre las bases adjuntas a la base de azúcar fosfatado: Adenina se alinea con Timina (DNA), o Uracilo (RNA), y Citocina se alinea con Guanidina. Este alineamiento básico sustenta la formación del complejo de doble cadena en la cual una cadena tiene la orientación opuesta de la otra cadena. Cualquier ácido nucleico puede ser detectado con el uso de una sonda anti sentido secuencia complementaria reversa. Una importante ventaja práctica es la velocidad con la cual las sondas pueden ser generadas por medio de la clonación de las secuencias de DNA, amplificación por PCR o la síntesis de oligonucleótidos (Wilkinson DG 1998; Darby 2000).

La hibridación *in situ* implica: la generación de la sonda de ácidos nucleicos marcados para poder detectarlos; la preparación de los cromosomas extendidos o la fijación de los tejidos; el pre tratamiento de los tejidos para incrementar la accesibilidad de las sondas; la hibridación de la sonda a los cromosomas o a los tejidos; el lavado astringente para remover las sondas no hibridadas; y la detección de la sonda marcada, revelando la localización del ácido nucleico en la célula (Wilkinson 1998; Darby 2000).

Existen muchas alternativas del tipo de sonda, los métodos de marcaje, y visualización, depende que se requiera encontrar: La sensibilidad depende de la accesibilidad del blanco, la cantidad y tipo de marcaje incluido en la sonda y el método de detección; La resolución de la señal puede variar desde sitios específicos en una sola célula, algo más que el diámetro de célula, depende del marcaje de la sonda y su método de detección. La especificidad es esencial, de la extensa similitud entre la sonda y las secuencias; y en la técnica depende de la astringencia de los lavados.

Depende también de que se va analizar: tejido montado en laminillas, secciones flotantes, tejido entero o embriones; La detección de varios genes o productos génicos, la relación física entre muchos genes o regiones cromosómicas pueden ser visualizadas con el uso de diferentes marcajes fluorescentes para la detección de cada secuencia; Se puede combinar la hibridación *in situ* con inmunohistoquímica; La visualización de patrones de transcripción en un tejido o embrión puede proveer importante información. Es una técnica conveniente y segura porque las sondas no radioactivas son más estables, seguras y proveen resultados más rápidos que las sondas radioactivas, etc. En general depende de cada investigador el método que elija, el que sea más conveniente para su investigación.

III. HIPÓTESIS

Los condrocitos de caballo expresan las mismas cantidades de Colágena tipo II, Agrecano y Sox-9 que el cartílago articular normal, cuando se cultivan en pellet, y no se modifica la expresión de colágena tipo I, por lo que no modifican su fenotipo, como en el caso de los condrocitos cultivados en monocapa, por lo tanto es un mejor método de cultivo para realizar implantes autólogos en caballos.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

La finalidad de este trabajo es realizar un análisis de los condrocitos en el cartílago articular normal de caballo y de los condrocitos en cultivo con el fin de conocer los niveles de expresión de los genes de Colágena tipo II, Agrecano, Sox-9 y Colágena tipo I.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- a) Evaluar cualitativamente por medio de PCR convencional, los niveles expresados de: Colágena tipo II, Agrecano, Sox-9 y Colágena tipo I en los condrocitos del cartílago articular normal.
- b) Realizar cultivo primario a partir de cartílago articular sano: en monocapa y en pellet, para obtener los condrocitos que serán comparados con los condrocitos de cartílago articular normal.
- c) Evaluar cualitativamente por medio de PCR convencional, los niveles expresados de: Colágena tipo II, Agrecano, Sox-9 y Colágena tipo I, en los condrocitos del cultivo en monocapa y del cultivo en pellet.
- d) Evaluar cuantitativamente la expresión de Colágena tipo II, Agrecano, Sox9, y Colágena tipo I, dada por los condrocitos durante el cultivo en monocapa y cultivo en pellet, en comparación con los del tejido normal, por medio de la técnica de PCR en tiempo real, y así conocer las diferencias.

- e) Identificar mediante Hibridación *in situ* fluorescente en el cartílago articular normal y en los cultivos en monocapa y en pellet, la expresión de Colágena tipo II, Agrecano, Sox 9, y Colágena tipo I.

V. MATERIAL Y MÉTODOS.

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de Ingeniería de Tejidos, en colaboración con el laboratorio de Biomedicina y el laboratorio de Genética, todos ubicados en la Torre de Investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación. Calzada México-Xochimilco No. 289, colonia Arenal de Guadalupe, Tlalpan, México DF.

Las muestras se colectaron en el rastro Río Frío, ubicado en el pueblo de Río Frío, Carretera México-Puebla s/n, Estado de México.

5.1 Toma de muestras

Se utilizaron muestras de cartílago provenientes de articulación metacarpo-falángica ((MCF) o menudillo), de 32 caballos criollos destinados para consumo. La selección de los caballos no fue al azar, se consideró que los caballos no presentaran claudicaciones en los miembros anteriores, ni en los posteriores, y que no presentaran ningún otro proceso inflamatorio. Se determinó la edad por cronometría dentaria, se utilizaron animales entre 9 meses y 8 años. Los caballos fueron sacrificados con pistola de perno oculto según la norma oficial NOM-033-ZOO-1995.

Las muestras se identificaron con un prefijo común para todas ellas: EC y un número subíndice que correspondía al número del caballo 1, 2,3, etc.

Las muestras fueron tomadas 15 minutos después que cada caballo fuese sacrificado. Se lavaron las dos extremidades anteriores (manos) con agua y jabón. La piel era separada por completo del miembro, se le separaba del casco y se lavaba nuevamente con agua y yodo espuma concentrado.

Se colocaron en una mesa, donde previamente se realizó una antisepsia, primero con agua corriente y jabón y posteriormente con iodo concentrado. Se

embrocaba el área del menudillo. Se colocaba una gasa estéril en la parte distal del metacarpo y otra en la parte proximal de la primera falange, a modo de campos y para sujetar el espécimen.

Al azar se tomó una de las manos y se realizó lo siguiente: Con una hoja de bisturí No. 22 se incidió en forma transversal a la articulación MCF, cortando de una sola intención tejido subcutáneo, fascia superficial, tendón extensor digital, tendón extensor lateral, posteriormente se incidió la cápsula articular y las ramas laterales del tendón flexor superficial. Con una hoja de bisturí No. 15 se diseccionó el cartílago de la superficie palmar de ambos cóndilos metacarpianos, en dirección de palmar a dorsal, aproximadamente el 90% del tejido se colocó dentro de un tubo de 50 ml que contenía 10 ml de medio de cultivo DMEM, adicionado con antibiótico-antimicótico al 10% para realizar cultivo celular; el 10% restante se colocó dentro de un tubo de 1.5 ml que contenía 1 ml de RNA later® para la extracción de RNA.

Para la otra mano se realizó lo siguiente: Con una hoja de bisturí No. 22 se incidió en forma transversal a la articulación, cortando de una sola intención tejido subcutáneo, fascia superficial, tendón extensor digital, tendón extensor lateral, de igual forma se incidió la cápsula articular y las ramas laterales del tendón flexor superficial. Con un sacabocados y un martillo se realizó una biopsia de 8 mm de diámetro y se conservó en paraformaldehído 4% (PFA) pH 7.4. Para la hibridación *in situ* para la detección de Agrecano, Colágena tipo II, Sox-9, Colágena tipo I.

Todas las muestras se conservaron a +4°C dentro de una hielera, durante el traslado al laboratorio. Se calculó aproximadamente 3 horas de viaje, desde el rastro hasta el INR.

5.2 Protocolo para cultivo celular primario de condrocitos.

5.2.1 Protocolo para cultivo en monocapa.

5.2.1.1 Lavado: El medio que contenía al tejido fue extraído y eliminado, el cartílago se colocó en una caja de petri estéril, se le adicionaron 5 ml de solución salina fosfato buferada (PBS) adicionado con antibiótico-antimicótico al 10 % (penicilina estreptomycin, anfotericina B), se lavó durante 5 minutos, dos veces.

5.2.1.2 Disgregación mecánico-enzimática: Se eliminó esta solución y se adicionó 3 ml de medio de cultivo y se fragmentó con una hoja de bisturí No. 22. Una vez fragmentado, se pasó a un tubo estéril de 50 ml, con 10 ml de medio de cultivo DMEM adicionado con antibiótico-antimicótico 1% y colagenasa tipo II al 0.3%. Se incubó en agitación continua a 250 rpm 37°C durante 5 horas.

5.2.1.3 Resuspensión celular: Posteriormente se centrifugó a 1700 rpm (500 x g) durante 10 minutos, se formó un botón en el fondo del tubo, se extrajo el sobrenadante, se adicionó 10 ml de PBS antibiótico-antimicótico 1% y se rompió el botón mezclando en el Vortex® a la velocidad mínima, se centrifugó a 1700 rpm durante 10 minutos se formó un botón nuevamente en el fondo del tubo, se extrajo el sobrenadante, se adicionó 5 ml de medio de cultivo y se resuspendieron las células.

5.2.1.4 Conteo y viabilidad celular: Se tomaron 5 µl de esta suspensión celular, se mezclaron con 5 µl de azul tripano. Se realizó el conteo en una cámara de Neubauer o hemocitómetro, observado bajo el microscopio.

Se calculó excluyendo las células que se encontraron teñidas de azul, de esa manera también se determinó la viabilidad celular.

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{Total de células viables}}{\text{Total de células}} \times 100$$

Para determinar la curva de crecimiento se utilizó la siguiente ecuación (PDL): $\log_2 (N_H/N_I)$ donde N_H es el número de células obtenidas y N_I es el número de células cultivadas.

5.2.1.5 Cultivo: Las células y los explantes fueron sembrados en 3 cajas de 6 pozos a una densidad de 1.5×10^4 para realizar posteriormente la técnica de hibridación *in situ* fluorescente y en 3 cajas T25 a una densidad \geq a 5.0×10^5 para obtener RNA. Aparte se tomo una muestra igual de células para una primera extracción de RNA. Se incubaron a 37°C 95% aire 5% CO₂. Al tercer día se cambio el medio y se complementó con suero fetal bovino (SFB) al 1%, al quinceavo día, además se adicionó Acido Ascórbico a 50µg/ml

Diariamente se revisaron los cultivos, el medio se cambiaba cada tercer día, para fin de semana se adicionaba un 20% más del volumen total del medio de cultivo complementado. Tres de los cultivos se utilizaron para realizar técnica de hibridación *in situ* fluorescente y los tres restantes para obtener RNA.

Un cultivo sin adicionar ningún complemento sirvió como control.

5.2.2 Protocolo para cultivo en pellet.

5.2.2.1 Lavado: El lavado se realizó de la misma manera que para el cultivo en monocapa, protocolo 5.2.1.1.

5.2.2.2 Disgregación mecánico-enzimática: Después del lavado, se fragmento igual que en el cultivo en monocapa. Una vez fragmentado, se pasó a un tubo estéril de 50 ml, con 10 ml de medio de cultivo adicionado con antibiótico-antimicótico 1% y Colagenasa tipo II al 0.2%. Se incubó en agitación continua a 250 rpm 37°C durante 5 horas.

5.2.2.3 Resuspensión celular: Posteriormente se centrifugó a 1700 rpm (500 x g) durante 10 minutos, se formó un botón en el fondo del tubo, se extrajo el sobrenadante, se adicionó 10 ml de PBS antibiótico-antimicótico 1% y se rompió el botón mezclando en el Vortex® a la velocidad mínima, se centrifugó a 1700 rpm durante 10 minutos se formó un botón nuevamente en el fondo del tubo, se extrajo el sobrenadante, se adicionó 5 ml de medio de cultivo y se resuspendieron las células.

5.2.2.4 Conteo y viabilidad celular: Se utiliza el mismo protocolo 5.2.1.4

5.2.2.5 Cultivo: Las células y los explantes fueron sembrados en 6 tubos estériles de 5 ml con tapón, a una densidad mínima de 1.5×10^6 y máxima de 4.0×10^6 dependiendo del conteo celular resultante, en un volumen de 1 ml, se centrifugó a 1700 rpm durante 10 minutos para que se formara de nuevo un botón en el fondo del tubo. Se incubaron a 37°C 95% aire 5% CO₂. Aparte se tomo una muestra igual de células para una primera extracción de RNA

Al día siguiente se tomó una muestra 5 µl de medio, se mezclaron con 5 µl de azul tripano y se colocaron en un portaobjetos para observar al microscopio que estuviera libre de contaminaciones. Se cambio el medio diariamente durante los primeros 3 días y al tercer día el medio fue complementado con suero fetal bovino al 1%, al quinceavo día, además se adicionó Acido Ascórbico a 50µg/ml, para fin de semana se adicionaba un 20% más del volumen total del medio de cultivo complementado.

Tres de los pellets se utilizaron para realizar técnica de hibridación *in situ* fluorescente y los tres restantes para obtener RNA.

Un cultivo sin adicionar ningún complemento sirvió como control.

5.3 Protocolo de preparación de células en cultivo primario para hibridación *in situ* fluorescente.

5.3.1 Protocolo para fijación de cultivos.

Los cultivos se fijaron en cuatro periodos: 0, 7, 15 y 30 días de cultivo. El protocolo es el mismo en los dos tipos de cultivo y en los diferentes periodos.

Se extrajo el medio de cultivo, se agregó PBS y se agitó gentilmente durante 1 minuto, y se dejó por 4 minutos más, se extrajo esta solución y se agregaron 2 ml de PFA 4% pH 7.4 y se dejó por 20 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se retiró esta solución y a continuación se deshidrató.

5.3.2 Protocolo para deshidratación de cultivos.

Se eliminó el PFA 4%, se adicionaron 2 ml de alcohol 50% - DEPC 50% y se dejó por 10 minutos, se eliminó esta solución y se agregaron 2 ml de alcohol 75%- DEPC 25%, se dejó por 10 minutos, se eliminó esta solución y se agregaron 2 ml de alcohol 96% -DEPC 4 %, se dejó por 10 minutos, se eliminó esta solución y se agregaron 2 ml de alcohol 100%, se dejó por 10 minutos, se eliminó esta solución y se agregaron 2 ml de alcohol 100% y se almacenaron a -20°C.

5.4 Protocolo de preparación de cartílago para hibridación *in situ* fluorescente.

5.4.1 Protocolo para fijación y descalcificación de cartílago.

La muestra se colocó directamente en PFA 4% pH 7.4, se dejó a 4°C durante 24 horas, se retiró esta solución y se le agregó PFA 4% – EDTA100 mM, se dejó en agitación continua a 4°C, esta solución se cambió 2 veces por semana, constantemente con una hoja de bisturí se cortaba el hueso de la muestra hasta que la muestra tenía muy poco hueso y/o dejara de crepitar, la duración de este procedimiento, depende de la cantidad de hueso obtenido. Cuando la muestra se encontró lista, se procedió a realizar la deshidratación del tejido.

5.4.2 Protocolo para deshidratación de cartílago.

Se eliminó el PFA 4% – EDTA100 mM, se lavó con PBS 1X, se adicionaron 15 ml de PFA 4% se dejó 60 minutos a temperatura ambiente, se retiró esta

solución y se agregó 15 ml de alcohol 50% - DEPC 50% y se dejó por 30 minutos, se eliminó esta solución y se agregaron 15 ml de alcohol 75%- DEPC 25%, se dejó por 30 minutos, se eliminó esta solución y se agregaron 15 ml de alcohol 96% -DEPC 4 %, se dejó por 15 minutos, se eliminó esta solución y se agregaron 15 ml de alcohol 100%, se dejó por 15 minutos, se eliminó esta solución y se agregaron 15 ml de alcohol 100% y se almacenaron a -20°C.

5.4.3 Protocolo para inclusión de cartílago.

En la campana de flujo, la muestra de cartílago, que se encontraba a -20°C se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos, se extrajo el alcohol absoluto, y la muestra se colocó en un frasco de vidrio, se agregaron 10 ml de xilol y se dejó durante 30 minutos a temperatura ambiente, se extrajeron 5 ml de xilol, la muestra se introdujo al horno a 67°C por 5 minutos, posteriormente se le agregó 5 ml de parafina previamente líquida, se dejó toda la noche a 67°C; se extrajo la mezcla de xilol-parafina y se le agregó 10 ml de parafina líquida a 67°C por 30 minutos, se extrajo la parafina y se le agregó 5 ml de parafina líquida a 67°C por 30 minutos más y se incluyó, utilizando 1 placa de metal para inclusión y una canastilla de inclusión de plástico, se dejó polimerizar a temperatura ambiente durante 10 minutos, a 4°C durante 5 minutos y por último a -20°C 5 minutos, y se retiró la placa de metal. El bloque se almacenó a 4 °C.

5.5 Protocolo de tinciones histológicas.

5.5.1 Protocolo de tratamiento de laminillas con TESPA

5.5.1.1 Soluciones: TESPA 4%: Acetona 288 ml, TESPA 12 ml; Alcohol Acido: Etanol Absoluto 315 ml, H₂O 135 ml, HCl 50 ml

5.5.1.2 Preparación: Se coloca un tren, las laminillas se sumergieron en alcohol acido durante 4 minutos a TA, se pasaron al recipiente con agua durante 2

minutos a TA, Se colocan dentro del recipiente con etanol 96°, se dejan secando a 82°C durante 60 minutos, se dejan a TA durante 10 minutos, Se sumergen en el TESPAPA 4% durante 2 minutos a TA, se lavan en acetona durante 2 minutos y se dejan secando toda la noche a 42°C

5.5.2 Protocolo de cortes histológicos de pellet y de cartílago.

Previamente se identifican las laminillas tratadas con TESPAPA. La muestra se coloca a -20°C durante 5 minutos. En un micrótomo se realizaron cortes seriados. Los cortes se colocan en las laminillas y se colocaron a 60°C sobre una plancha durante una hora, posteriormente se dejaron a 37°C toda la noche, al día siguiente se colocan dentro de una cámara de vacío a TA 24 horas, al terminar están listas para ser procesadas, para hibridación *in situ* e histología.

Previamente se identifican las laminillas tratadas con TESPAPA. La muestra se colocó a -20°C durante 5 minutos. En un micrótomo se realizaron cortes seriados.

Se colocan en las laminillas y se dejan a 60°C sobre una plancha durante una hora, posteriormente se dejaron a 37°C toda la noche, al día siguiente se colocan dentro de una cámara de vacío a TA 24 horas, al terminar están listas para ser procesadas, para hibridación *in situ* e histología.

5.5.3 Tinción con hematoxilina y eosina (H&E)

5.5.3.1 Desparafinación:

Las laminillas fueron colocadas sobre la plancha a 60°C por 12 horas para desparafinarlas.

5.5.3.2 Rehidratación:

1. Se coloca un tren: Se sumergieron en xilol 30 veces, se dejó 3 minutos. Dos veces.

2. Se sumergieron en xilol 50% - Etanol 50% 30 veces, se dejó 3 minutos.
3. Se sumergieron en Etanol 100% 30 veces, se dejó 3 minutos. Dos veces.
4. Se sumergieron en Etanol 96% 30 veces, se dejó 3 minutos. Dos veces.
5. Se sumergieron en Agua 30 veces y se enjuagó tres veces.

5.5.3.3 Tinción:

1. Se sumergieron en Hematoxilina de Harris IX 15 veces y se dejó 1.5 minutos
2. Se sumergieron en Agua 30 veces y se enjuagó tres veces o hasta que el agua sea transparente.
3. Se sumergieron en Agua amoniacal 1 vez.
4. Inmediatamente se sumergieron 30 veces en agua y se enjuagó tres veces.
5. Se sumergieron en Carbonato de Litio saturado 2 veces.
6. Inmediatamente se sumergieron 30 veces en agua y se enjuagó tres veces.
7. Se quitó el exceso de hematoxilina con una gasa seca.
8. Se sumergieron en Etanol 96% 20 veces
9. Se sumergieron en Eosina 20 veces y se dejó durante 30 segundos.

5.5.3.4 Deshidratación:

1. Se sumergieron en Etanol 96% 30 veces. Dos veces.
2. Se sumergieron en Etanol 100% 30 veces. Dos veces.
3. Se sumergieron en xilol 50% Etanol 50% 30 veces.
4. Se sumergieron en xilol 40 veces.
5. Se sumergieron en xilol 50 veces.
6. Se quitó el exceso de xilol con gasa seca.

Se colocaron 4 gotas de resina en una orilla de la laminilla y se le colocó el cubre objetos cuidadosamente.

5.5.4 Tinción con safranina.

Se evaluara siguiendo el Bern Score (Yang 2006) donde el puntaje va de 0 a 3 en cada uno para tener un total de 9 puntos.

A. Uniformidad y oscuridad de la safranina (objetivo 10X)

- | | |
|---|----------|
| 1. No tinción | 0 puntos |
| 2. Tinción débil por la formación de una matriz pobre | 1 punto |
| 3. Tinción moderada | 2 puntos |
| 4. Tinción oscura | 3 puntos |

B. Distancia entre células, cantidad y organización de la matriz (objetivo 20X)

- | | |
|--|----------|
| 1. Gran densidad celular, sin matriz (no hay espacio entre las células), | 0 puntos |
| 2. Gran densidad celular, con poca matriz (espacio menor al tamaño de una célula), | 1 punto. |
| 3. Densidad celular moderada con matriz (espacio del tamaño de una célula), | 2 puntos |
| 4. Baja densidad celular con extensa matriz (espacio mayor al tamaño de una célula), | 3 puntos |

C. Morfología de las células, basado en el consenso de que la morfología redonda es indicativa de fenotipo de condrocitos (objetivo 40X)

- | | |
|---|----------|
| 1. Condensadas , necróticas, cuerpos picnoticos | 0 puntos |
| 2. Células con extensiones o fibras | 1 punto |
| 3. Mezcla entre células con extensiones y fibrosas con células de morfología redonda. | 2 puntos |
| 4. La mayoría redonda o condrogenica. | 3 puntos |

Desparafinación y rehidratación igual que protocolo 5.5.3.

5.5.4.1 Tinción

1. Se sumergieron en Hematoxilina de Weigert (preparado 15 días previamente), se dejó durante 4 minutos.

2. Se sumergieron en Agua 30 veces y se enjuagó tres veces, se dejó 10 minutos.
3. Se sumergieron en Verde rápido(preparado 30 días antes) 30 veces, se dejó 7 minutos
4. Se sumergieron en ácido acético 2 veces, se dejó durante 15 segundos.
5. Se sumergieron en Safranina O (preparado 30 días antes) 30 veces y se dejó durante 15 minutos.

5.5.4.2 Deshidratación:

1. Se sumergieron en Etanol 96% 2 veces
2. Se sumergieron en Etanol 100% 2 veces.
3. Se sumergieron en xilol 30 veces.
4. Se sumergieron en xilol 30 veces.
5. Se quitó el exceso de xilol con gasa seca

5.6 Protocolo de extracción y análisis de RNA.

5.6.1 Protocolo de extracción de RNA de cartílago y condrocitos en cultivo.

Las puntas del Polytron® y todo el material de plástico que se utiliza para la extracción de RNA se trata previamente con DEPC y es esterilizado con oxido de etileno. El Polytron®, las micro pipetas, la mesa y el recipiente con hielo se limpian con agua - DEPC.

Las muestras que se colocaron en un tubo con RNA later®, se almacenaron a 4°C. Se obtuvo el peso de cada muestra.

5.6.1.1 Homogenización de tejido: Se extrajo el RNA later® y la muestra se colocó en otro tubo de 5 ml y se adicionó 1 ml de Trizol®, se incubó en hielo durante 5 minutos.

Se utilizó un homogenizador de tejidos Polytron® para homogenizar el tejido (velocidad 11-15), una vez homogenizado, la mezcla resultante se separó y colocó en un tubo de 1.5 ml

Homogenización de células: El protocolo es el mismo en el caso de cultivo en monocapa y en pellet. Se extrajo el medio de cultivo, se adicionó 1 ml de Trizol® por cada 3.5 mm de diámetro en el caso del monocultivo, o por cada tubo que contenía un pellet, se pipeteó varias veces hasta dejar el fondo del recipiente limpio, se pasa a un tubo de 1.5 ml, se incubó en hielo durante 5 minutos.

Se tomó una muestra de 10 µl y se contaron las células rápidamente con una cámara de Neubauer.

5.6.1.2 Separación: Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos, se incubó por tres minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Se formaron tres fases:

1. Fase acuosa que contiene al RNA
2. Interface o fase orgánica que contiene proteínas y DNA
3. Fase roja que contiene fenol y cloroformo.

5.6.1.3 Precipitación del RNA: Con una micro pipeta de 100 µl se separó la fase acuosa cuidadosamente y se colocó en otro tubo de 1.5 ml, se agregaron 500 µl de alcohol isopropílico, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Se formó un botón en el fondo del tubo.

5.6.1.4 Lavado del RNA: Se decantó el alcohol isopropílico, con cuidado para no arrastrar el botón, para lavar se agregó 1 ml de etanol 75%-DEPC 25 %, se mezcló en el Vortex® a la máxima velocidad por 2 segundos, se centrifugó a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C.

Se formó un botón en el fondo del tubo.

5.6.1.5 Re – dilución del RNA: Se decantó el etanol con sumo cuidado, se dejó secar el botón obtenido por 10 minutos a temperatura ambiente colocando el tubo boca abajo y sobre una gasa estéril, finalmente dependiendo del tamaño del botón, el RNA se disolvió en 10 µl -20 µl de agua DEPC 1%.

5.6.2 Análisis de RNA.

5.6.2.1 Cuantificación del RNA: Se tomó 1 µl de RNA y se disolvió en 99 µl de agua DEPC, se mezcló bien con una micropipeta, se utilizó un espectrofotómetro (Gene Quant Pro Amersham Biosciences)

5.6.2.2 Protocolo Gel desnaturalizante de RNA.

5.6.2.2.1 Preparación de la cámara de electroforesis: Se lavó con agua corriente, se limpió con agua des-ionizada, se secó y se le agregó agua DEPC dejando sumergidos dentro el peine y la base del gel, por 30 minutos. Se secó con gasas estériles.

El Material de vidrio también se limpio con agua DEPC.

5.6.2.2 Preparación de Gel 1%: Se pesaron 0.3 g de agarosa, se disolvieron en 26 ml de agua filtrada en milli Q, se hirvió dentro de un microondas 30-60 segundos (dependiendo de la potencia), se dejó enfriar a 60°C aproximadamente, se le agregaron 3 ml de Buffer MOP'S 10X, 1.5 ml de Formamida, 3 ml de Formaldehido, se agitó gentilmente, se vació en la cámara, se le colocó el peine, se dejó polimerizar, tardó aproximadamente 20 minutos.

5.6.2.3 Preparación de Buffer de carga para RNA: En un tubo de 0.6 ml se colocó por cada muestra que se analizó lo siguiente: 5 µl de Formamida, 2 µl formaldehído, 1 µl MOP'S, 1 µl Buffer de carga, 0.3 µl Bromuro de Etídio 200 µg/ml

5.6.2.4 Reacción de desnaturalización: En un tubo de 0.2 ml se colocó 8 µl de buffer de carga y 2 µl de RNA (la concentración depende de cada muestra) se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos. Se instaló la cámara de electroforesis, y se sumergió el gel en buffer MOP'S 1X, se cargó la muestra, se corrió a 70- 80 V por 30 minutos.

5.6.2.5 Visualización: Se visualizó el RNA colocando el gel dentro de un transiluminador UV Alpha Innotech Corporation , con un sistema completo que consiste en una cámara digital, conectada a una computadora con un software para visualizar electroforesis, se tomó una fotografía digital.

5.7 Protocolo síntesis de DNA a partir de RNA por medio de la enzima Reversa Transcriptasa

Se utilizó un kit de Reversa Transcriptasa, el protocolo es el mismo para todas las muestras, ya sea que provengan de tejido o de cultivo.

5.7.1 Reacción: En un tubo de 1.5 ml estéril, se preparó una mezcla general, y cada muestra a sintetizar se coloca en el tubo de 0.2 ml:

Reactivo	Volumen	Concentración
Buffer 10X	2.0 µl	1 X
MgCl ₂	4.0 µl	5mM
Mezcla Deoxynucleotidos	2.0 µl	1mM
Random Primer	2.0 µl	3.2 µg
Inhibidor de RNA'asas	1 µl	50 unidades

Reversa Transcriptasa AMV	0.8 μ l	\geq 20 unidades
Agua estéril	Variable	Variable*
Muestra de RNA	Variable	1 μ g
TOTAL	20.0 μ l	

*La cantidad de agua depende directamente del volumen de cada muestra de RNA, para completar el volumen de la reacción.

5.7.2 Parámetros: En el termo-ciclador se programaron las siguientes condiciones:

1 T = 25° C 10 min.

2 T = 42° C 60 min.

3 T = 99° C 5 min.

4 Detener

5 T = 4° C incuba.

Posteriormente se almacenó a -20°C.

5.8 Reacción en cadena de la Polimerasa

5.8.1 Diseño de primers: se diseño el primer para Agrecano, a partir de secuencias del banco de genes, usando el software Primer 3 accesible en internet, se introducen las condiciones necesarias y se obtuvieron 2 pares de óligos. Las secuencias obtenidas se analizaron con software BLASTN para estar seguros de la especificidad de la secuencia.

Agrecano: *Equus caballus* Aggrecan core protein mRNA parcial cds.

Identificación AF040637 de la base de datos en European Bioinformatics Institute.

Sentido: 5'agt cac acc tga gca gca tc 3'

Antisentido: 3'aga agt tgt cgg gct ggt t 5'

Producto esperado 174 pb.

B)

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	sequence
LEFT PRIMER	61	20	59.00	55.00	4.00	3.00	agtcacacctgagcagcatc
RIGHT PRIMER	235	19	59.71	52.63	3.00	0.00	aagaagttgtcgggctggt
PRODUCT SIZE: 175, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 3.00							

Se realizó una dilución de la concentración a 10µM, se realizó una reacción de PCR con dos muestras diferentes de RNA de cartílago normal y se analizaron por electroforesis (Figura 10), en los siguientes experimentos solo se utilizó el óligo de 174 pares de bases, porque las bandas se alinearon en ambas muestras y no se observaron dímeros precipitados como en el caso del óligo de 175 pares de bases.

5.8.2 Control Positivo: El primer de GAPDH fue diseñado por la Dra. Rocío Aguilar Gaytán, en el laboratorio de ingeniería de tejidos, INR.

GAPDH: *Equus caballus* GAPDH mRNA (Gliceraldehido 3' fosfato deshidrogenasa).

Identificación de la base de datos PUB MED Nucleotides.

Producto esperado 190 pb

Sentido: 5'gcc atc acc acc ttc cag3'

Anti sentido: 3'gtt gac gcc cat cac aaa5'

5.8.3 Primers: Los primers para Colágena tipo I, Colágena tipo II, Sox-9 fueron proporcionados por el laboratorio de ingeniería de tejidos, INR

I. Colágena I: *Equus caballus* Colágena I mRNA.

Identificación: AB070839 de la base de datos PUB MED Nucleotides.

Diseñado por Dr. David Garciadiego Cazares/ M en C. Cristina Velasquillo.

Producto esperado 430 pb.

Sentido: 5' gaaaacatcccagccaagaa3'

Anti sentido: 3'caccaccgatgtccaaaag5'

II. Colágena II: Equus caballus Col II mRNA.

Identificación: U62528 de la base de datos PUB MED Nucleotides.

Diseñado por Dr. David Garcíadiego Cazares/ M en C. Cristina Velasquillo.

Producto esperado 464 pb.

III. Sox9: Equus caballus Sox9 mRNA

Identificación: AF265207 de la base de datos PUB MED Nucleotides.

Diseñado por Dr. David Garcíadiego Cazares/ M en C. Cristina Velasquillo.

Producto esperado 170 pb.

Sentido: 5'cgtgcagcacaagaagga 3'

Anti sentido: 3'tcatgccagaggaggagtg5'

5.8.4 Reacción: se realizó PCR para el gen GAPDH, como control de la variación de calidad y cantidad de mRNA de las muestras, para descartar contaminación con DNA o daño del RNA, es un control positivo del cDNA. Posteriormente se realizaron las reacciones correspondientes a los primers en cuestión.

En un tubo de 1.5 ml estéril, se preparó una mezcla general, y cada muestra a sintetizar se coloca en el tubo de 0.2 ml:

Reactivo	Volumen	Concentración
Agua estéril	16.875 μ l	
Buffer 10X	2.5 μ l	1 X
MgCl ₂	2.0 μ l	
Mezcla dNtP's	0.5 μ l	
Primer Sense	1.0 μ l	
Primer Antisense	1.0 μ l	
Muestra de cDNA	1.0 μ l	
Polimerasa	0.125 μ l	
TOTAL	25.0 μ l	

5.8.5 Parámetros: La T_m es de 62°C para todos los cebadores por lo que facilitó los experimentos. En el termo-ciclador se programaron las siguientes condiciones:

1 T = 95° C 5 minutos

2 T = 95 ° C 45segundos

3 T = 62° C 1 minuto

4 T = 72° C 1 minuto

5 Repetir 29 veces del ciclo 2 al 4

6 T = 72° C 10 minutos

7 T = 4° C Incubar

Detener

5.9 Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real.

5.9.1 Reacción: Se utilizaron los mismos cebadores que en la reacción convencional. En tubos de 0.2 ml estériles de tapa plana, se prepararon cada muestra a sintetizar.

Reactivo	Volumen	Concentración
SYBR Green mix	12.5µl	1 X
Primer sense	1 µl	200nM
Primer antisense	1 µl	200nM
Rox dye Reference	1 µl	
cDNA	5 µl	1 µg
Agua- DEPC	4.5 µl	
TOTAL	25.0 µl	

5.9.2 Parámetros: La T_m es de 62°C para todos los cebadores por lo que facilitó los experimentos. En el termo-ciclador se programaron las siguientes condiciones:

1. T = 95° C 5 min
2. T = 95 ° C 45 seg.
3. T = 62° C 1min
4. T = 72° C 1 min
5. Repetir 50 veces del ciclo 2 al 4
7. Detener.

5.10 Hibridación *in situ* fluorescente.

Protocolo modificado de Kit FISH TagTM RNA Multicolor Kit with alexa Fluor dye, se utilizaron los siguientes: alexa® fluor 594 dye para color rojo, alexa® fluor 555 dye para color naranja, alexa® fluor 488 dye para color verde, y fluorescein12 UTP de Fermentas® para color amarillo.

5.10.1 Soluciones.

Buffer de unión: Agregar 4 ml de Isopropanol al 100 % y mezclar. Estable 6 meses a temperatura ambiente (TA).

Buffer para lavar: Agregar 12.8 ml de Etanol al 100 %, mezclar. Estable 6 meses a TA.

Solución Bicarbonato de Sodio: Agregar al bicarbonato 1ml de agua libre de nucleasas, mezclar en Vortex® hasta que se vea transparente. Estable 6 meses a -20°C.

PBT: PBS 1X estéril, 0.1% Tween 20. Estable a TA

Proteinasa K: 100 mg se disolvieron en 10 ml de Tris HCl 50mM CaCl₂ 10mM, para tener una concentración final de 10 mg/ml y se almacenó en pequeñas alícuotas a -20°C.

De esta solución se toman 5µL y se disuelven en 5ml de PBT para tener una concentración de 10µg. La concentración final que se necesita para tratar al tejido es de 5-50 µg / ml. Debe ser determinado en separado, y paralelo a 5 incubaciones minuciosas en diversas concentraciones. La cantidad óptima es determinada por la óptima señal. Poca proteinasa K puede resultar en poca señal, mientras que mucha proteinasa K puede resultar en pérdida de la integridad del tejido.

Glicina 2 mg/ml PBT

Anhidro Acético 0.25% Trietanolamina 0.1M

Buffer de hibridación: 50% Formamida, 5X SSC, t- RNA 100 µg/ml, Heparina 50 µg /ml, 0.1% tween 20, Agua estéril. Estable a -20°C.

5.10.2 Protocolo para marcado de la sonda.

5.10.2.1 Transcripción *In Vitro*: En hielo preparar la siguiente reacción, antes de aplicar las enzimas, se pueden mezclar en el Vortex® los otros elementos:

Reactivo	Volumen	Concentración
----------	---------	---------------

Agua libre de nucleasas,	8.0 μ l	
Buffer de transcripción 5X	4.0 μ l	1 X
DTT	2.0 μ l	0.01 M
Mezcla nucleótidos	2.0 μ l	10 μ M
DNA linearizado	2.0 μ l	1 μ g
Inhibidor RNA'sas OUT	1.0 μ l	40U/ μ l
Polimerasa	1.0 μ l	15U/ μ l
TOTAL	20.0 μ l	

Después de agregar las enzimas, se mezcló con la pipeta tres veces suavemente, se incubó a 37 °C por 4 horas, se agregó 1 μ l de Dnase I para detener la reacción, se mezcló pipeteando tres veces suavemente, se incubó a 37 °C por 15 minutos, se agregaron 79 μ l de agua libre de nucleasas y se mezcló con Vortex® a la máxima velocidad por 10 segundos, es importante para inactivar la DNasa I.

5.10.2.2 Purificación del RNA Amino Modificado: Se agregaron 400 μ l de buffer de unión a la reacción de la síntesis y se mezcló bien. Se agregaron los 500 μ l a una columna para centrifugar dentro del tubo de colección, se centrifugó a > 10,000 x g por 3 minutos, El RNA se quedó en la columna, se desechó el líquido del tubo, se lavo la columna con 650 μ l de buffer de lavado, Se centrifugó a > 10,000 x g por 3 minutos, se desecho el líquido del tubo, se centrifugó a > 10,000 x g por 1 minuto para desechar el resto del buffer de lavado. Se colocó la columna en un tubo de colección de 1.7 ml, se aplicaron 55 μ l de buffer de elución en el centro de la columna, se dejó el tubo a TA por 2 minutos, se centrifugó la columna >10,000 x g por 3 minutos.

El tubo colector contiene el RNA amino modificado purificado, se desecho la columna.

5.10.2.3 Precipitación del RNA Amino Modificado con Etanol

Agregar al RNA:

10 μ l de 3M acetato sódico (pH 5.2)

1 μ l de glicógeno

39 μ l de agua libre de nucleasas

Se agregaron 300 μ l de etanol al 100%, se incubó la muestra a -20°C por 30 minutos, se centrifugo la muestra a $> 10,000 \times g$ por 10 minutos, se removió el supernadante, cuidando de no perder el pellet.

Cuidadosamente se aclaró el pellet con 400 μ l de etanol al 70 %, se removió el supernadante y se repitió este paso. Es importante para eliminar aminos libres que pueden afectar la eficiencia de la acoplación del color.

Con una pipeta se removió lo más posible de los residuos de etanol al 70%, sin tocar el pellet y después se dejó secar la muestra al aire por 5 o 10 minutos. Se agregaron 5 μ l de agua libre de nucleasas al pellet, se incubó la muestra a 37°C por 5 minutos, la muestra se mezcló con Vortex® para resuspender completamente y se colocó en hielo. Se realizó una electroforesis para comprobar, y se determinó la concentración de la muestra en un espectrofotómetro y se ajustó la concentración con agua a una concentración final de 0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La muestra puede ser guardada por más de 2 semanas.

La reacción de transcripción in vitro a menudo genera 1-4 μg de RNA dependiendo del templado de DNA, la conjugación con el color es optimizada por 1 μg de RNA aminomodificado. Usando más RNA por reacción puede resultar en disminuir la eficiencia.

5.10.2.4 Marcado del RNA Aminomodificado con Fluorescencia: Se desnaturalizó 1 μg (5 μl) de RNA incubándolo a 65°C por 5 minutos, se colocó la muestra en hielo por 3 minutos, se centrifugó la muestra a $>10,000 \times g$ por 3 minutos, se agregaron 3 μl de solución de bicarbonato de sodio a la muestra, se

resuspendió en 2 µl de DMSO, mezclar con Vortex® 10 segundos a la máxima velocidad, para resuspender completamente el color. Se transfirieron los 2 µl del reactivo a la muestra de RNA a TA. Se mezcló con Vortex® a la máxima velocidad por 15 segundos. Es importante mezclar suficientemente esta reacción. Se centrifugó la mezcla brevemente para coleccionar la reacción al fondo del tubo, se incubó en la oscuridad a TA por 4 horas, se agregaron 90 µl de agua a la muestra.

5.10.2.5 Purificación del RNA Amino Modificado Marcado con Fluorescencia: Se agregaron 400 µl de buffer de unión a la reacción y se mezcló bien, se colocaron los 500 µl a una columna de centrifugado, se centrifugó a >10,000 x g por 3 minutos, el RNA se quedó en la columna, se desechó el líquido del tubo, se lavó la columna con 650 µl de buffer de lavado, se centrifugó a > 10,000 x g por 3 minutos, se desechó el líquido del tubo, se centrifugó a > 10,000 x g por 1 minuto para desechar el resto del buffer de lavado, se colocó la columna en un tubo de colección de 1.7 ml, se aplicaron 55 µl de buffer de elución en el centro de la columna, se dejó el tubo a TA por 2 minutos, se centrifugó la columna >10,000 x g por 3 minutos, el tubo colector contiene el RNA amino modificado marcado y purificado, se desecha la columna.

5.10.2.6 Precipitación con Etanol del RNA Amino Modificado Marcado con Fluorescencia:

Se agregó al RNA:

10 µl de 3M acetato sódico (pH 5.2)

1 µl de glicógeno

39 µl de agua libre de nucleasas

Se agregaron 300 µl de etanol al 100%, se almacenó la muestra a -20°C por 30 minutos, se centrifugó la muestra a > 10,000 x g por 10 minutos, se removió

el supernadante y tener cuidado de no perder el pellet, cuidadosamente se aclaró el pellet con 400 µl de etanol al 70 %, se removió el supernadante y se repitió el lavado.

Con una pipeta se removí lo más posible de los residuos de etanol al 70%, sin tocar el pellet y después se dejó secar al aire por 5 o 10 minutos. Se agregaron 10 µl de agua libre de nucleasas al pellet, se incubó la muestra a 37°C por 5 minutos, se mezcló con Vortex®, para resuspender completamente y se colocó en hielo. Se determinó la concentración de la muestra.

El RNA marcado ya está listo para el buffer de hibridación. Alternativamente se puede almacenar el RNA a < - 70°C mientras se está listo para usarse. Es estable más de 2 semanas cuando es protegido de la luz y almacenado a < - 70°C.

5.10.3 Protocolo de Hibridación para cartílago.

5.10.3.1 Pre-Hibridación.

Desparafinación y Rehidratación: los tejidos fueron preparados de acuerdo al protocolo 5.4. Se coloca un tren: Se incubó el espécimen en xilol por 5 minutos oscilando gentilmente, 2 veces, se pasó a metanol al 100%, por 2 minutos 2 veces, se pasó a metanol al 75%DEPC 25%, por 2 minutos, se pasó a metanol al 50%DEPC 50%, por 2 minutos, se pasó a metanol al 25%DEPC 75%, por 2 minutos, Se pasó a PBT 100%, por 5 minutos.

Permeabilización: Dentro de una cámara húmeda se incubó en PFA 4 % (4°C) a TA por 15 minutos, se lavó en PBT 3 veces en continua oscilación por 1 minuto cada uno, se incubó en proteinasa K (37°C) a TA por 15 minutos, se enjuagó en Glicina-PBT 5 minutos, se lavó en PBT por 2 minutos 3 veces, se incubó en PFA 4 % (4°C) a TA por 20 minutos, Anhidro acético 0.25% TEA 0.1M 10 minutos, se lavó en PBT 2 veces por 1 minuto cada uno.

En la cámara húmeda se colocan las laminillas, se le agrega el buffer de hibridación precalentado a 80°C, por 15 minutos, a 60°C.

5.10.3.2 Hibridación

Se preparó el buffer de hibridación con la sonda a una concentración final de 1 µg/100µL, se desnaturalizó la sonda por medio de incubación a 95°C por 2 minutos y luego se colocó en hielo.

Se removió el buffer de hibridación de la laminilla y se reemplaza con sonda. Se incubó a 60 °C en la cámara húmeda 18-20 horas.

5.10.3.3 Post- Hibridación

Se removió la mezcla del buffer preparado y se reemplazó con buffer de hibridación, se incubó el espécimen en buffer de hibridación a 55°C por 30 minutos a 55°C en oscilación continua.

Se incubó en 50% PBT 50% buffer de hibridación a TA por 10 minutos.

Se enjuagó el espécimen en PBT, se lavó el espécimen tres veces en PBT, 5 minutos cada uno, se pipeteó lo más posible de la mezcla PBT, sin dañar el tejido.

Se agregaron 2 gotas (80-100 µl) del reactivo anti decolorante Slow Fade Gold® y se cubrió con un cubreobjetos de 22 x 22 mm, se procedió a observar la imagen, en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM Meta 100, que se encuentra en el departamento de biomedicina molecular piso cero de la torre de investigación del INR.

5.10.4 Protocolo de Hibridación para cultivo en forma de pellet.

5.10.4.1 Pre-Hibridación.

Rehidratación: los pellets fueron preparados de la siguiente forma en el tubo donde se conservaron, se incubó en metanol al 100%, por 5 minutos oscilando

gentilmente, se incubó en metanol al 75%DEPC 25%, por 5 minutos oscilando se pasó a metanol al 50%DEPC 50%, por 5 minutos, se pasó a metanol al 25%DEPC 75%, por 5 minutos, Se pasó a PBT 100%, por 5 minutos, 2 veces.

Permeabilización: Se incubó en H₂O₂ 6 % PBT a TA por 60 minutos, se lavó en PBT 3 veces en continua oscilación por 5 minuto cada uno, se incubó en proteinasa K (37°C) a TA por 25 minutos, se le agregó PFA 4% GTA 0.2% por 20 minutos (4°C), se lavó en PBT por 5 minutos 2 veces

Se le agrega el buffer de hibridación precalentado a 80°C, por 2.5 horas a 55°C.

5.10.4.2 Hibridación

Se preparó el buffer de hibridación con la sonda a una concentración final de 1 µg/500µL, se desnaturalizó la sonda por medio de incubación a 95°C por 2 minutos y luego se colocó en hielo.

Se removió el buffer de hibridación de la laminilla y se reemplaza con sonda. Se incubó a 60 °C en la cámara húmeda 18-20 horas.

5.10.3.3 Post- Hibridación

Se removió la mezcla del buffer preparado y se reemplazó con buffer de hibridación, se incubó en buffer de hibridación a 55°C por 30 minutos a 55°C en oscilación continua.

Se incubó en 50% PBT 50% buffer de hibridación a TA por 10 minutos.

Se enjuagó el espécimen en PBT, se lavó el espécimen tres veces en PBT, 5 minutos cada uno, se pipeteó lo más posible de la mezcla PBT, sin dañar el pellet.

El pellet se paso a una cajita de petri, se agregaron 2 gotas (80-100 µl) del reactivo anti decolorante Slow Fade Gold® y se cubrió, se procedió a observar la imagen, en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM Meta 100, que se encuentra

en el departamento de biomedicina molecular piso cero de la torre de investigación del INR.

5.11 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar para aquellos datos con comportamiento normal, las comparaciones se llevaron a un programa de Sigma Stat® para el análisis. El nivel de significancia se consideró cuando $p < 0,05$. Se realizó estadística no paramétrica para los datos que lo requieren.

VI. RESULTADOS.

6.1 Se obtuvieron muestras de cartílago proveniente de la articulación metacarpo-falángica de 30 caballos, las dos primeras muestras se excluyen del experimento por que sirvieron para el aprendizaje básico del cultivo celular y para ensayos de extracción de RNA.

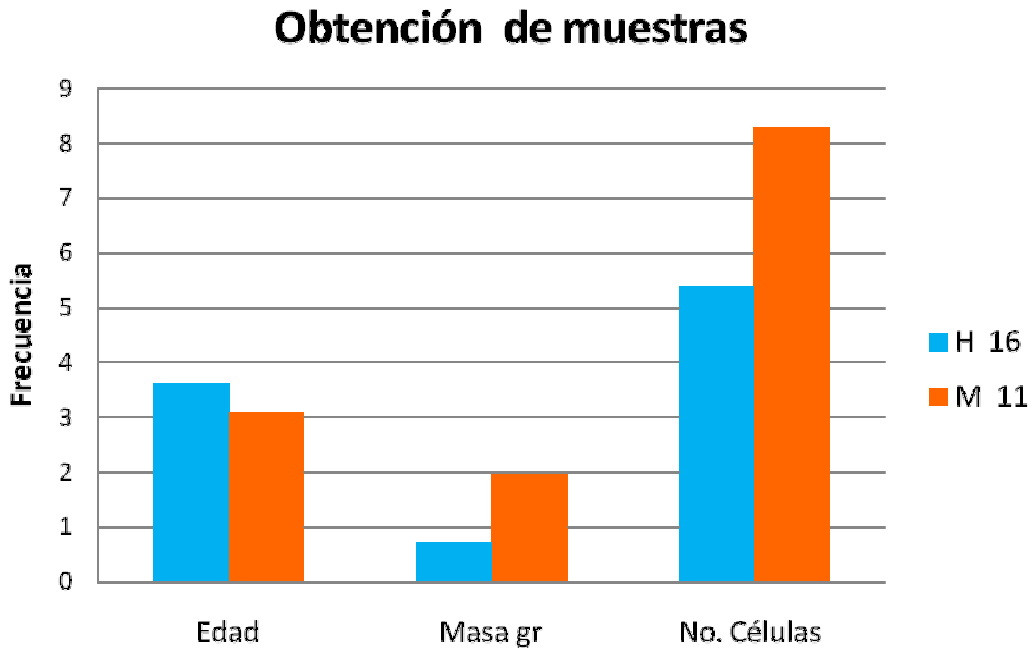
Las Cultivos EC₁₁, EC₁₂, EC₂₂, se eliminaron porque al ser observadas al microscopio para realizar el conteo celular, se encontraron contaminadas con bacterias, que tenían un tamaño menor a 10 μm , forma ovalada y movimiento vibratorio.

El porcentaje de hembras fue de 59.26% y machos de 40.74%. La media de edad de los animales fue de 3.4 ± 1.9 años. El número de células obtenidas fue muy variable, en promedio y de acuerdo al sexo y la edad se obtuvo a partir de 0.7363 ± 0.350 gramos de tejido $5.4 \pm 2.73 \times 10^6$ células en el caso de las hembras y a partir de 1.9652 ± 1.501 gramos de tejido $8.3 \pm 3.72 \times 10^6$ células en el caso de los machos. Cuadro 2 y Gráfica1.

Cuadro 2. Estadística descriptiva de obtención de muestras

Estadística Descriptiva Hembras			Estadística Descriptiva Machos		
n	16		n	11	
	Media	Desv. Est.		Media	Desv. Est.
Edad	3.62	2.29	Edad	3.0909	1.15
Masa gr	0.7363	0.350	Masa gr	1.9652	1.501
	5.4 X				
No. Células	10^6	2.73×10^6	No. Células	8.3×10^6	3.72×10^6

Gráfica 1

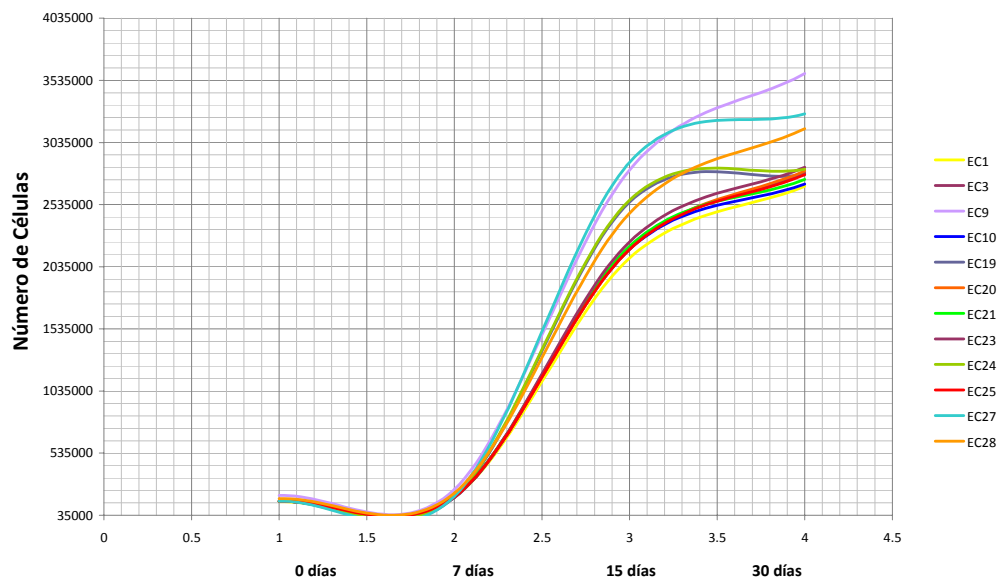


Histograma comparativo de la obtención de muestras, promedio en gramos de cartílago y número de células aisladas a partir del sexo y la edad de los caballos.

6.2 Los condrocitos proliferaron en ambas condiciones de cultivo. Gráfica 2 y 3. Se realizaron un total de 47 cultivos en monocapa, distribuidos de la siguiente forma:

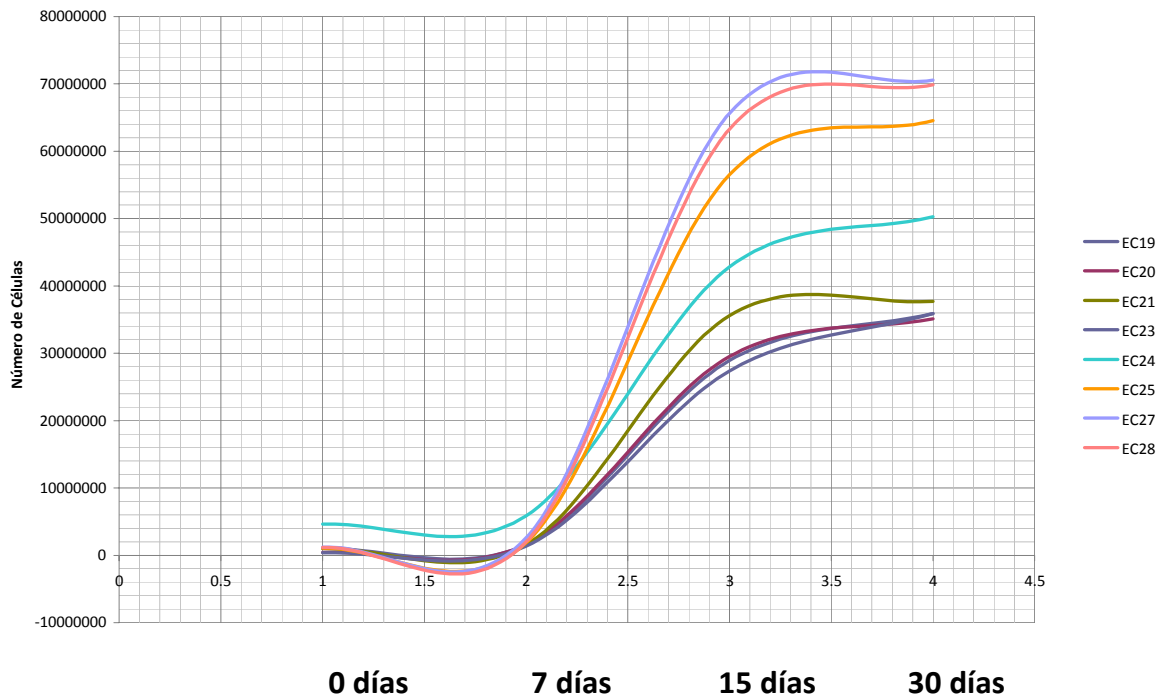
16 cultivos fueron utilizados para la evaluación a 7 días de los cuales: 9 fueron fijados para realizar hibridación *in situ*, 4 cultivos para extracción de RNA, 12 para conteo celular y 3 control negativo; 16 cultivos fueron utilizados para la evaluación a 15 días de los cuales: 9 fueron fijados para realizar hibridación *in situ*, 4 cultivos para extracción de RNA, 12 para conteo celular y 2 control negativo, 1 cultivo fue eliminado por contaminación; 15 cultivos fueron utilizados para la evaluación a 30 días de los cuales: 9 fueron fijados para realizar hibridación *in situ*, 3 cultivos para extracción de RNA, 12 para conteo celular y 3 para control negativo.

Gráfica 2



Curva de crecimiento de células del cultivo primario en monocapa donde los cultivos identificados como EC1, EC10, EC25, fungieron como controles, es decir solo crecieron con medio DMEM, sin adición de SFB ni A.A.

Gráfica 3



Curva de crecimiento de células del cultivo primario en pellet donde los cultivos identificados como EC19,EC20,EC23, fungieron como controles , es decir solo crecieron con medio DMEM, sin adición de SFB ni A.A.

Debido a que la densidad celular es diferente para los cultivos, los valores obtenidos del conteo celular se convirtieron a valores logarítmicos (Cuadro 3 y 4), se promediaron para hacer posible la comparación entre la proliferación celular de ambos cultivos y se realizó un histograma (Gráfica 4) donde se aprecia que no hay diferencias entre el crecimiento celular.

Cuadro 3. Valores logarítmicos de los conteos celulares del cultivo en monocapa. Donde 7, 15, 30 se refiere al día de cultivo.

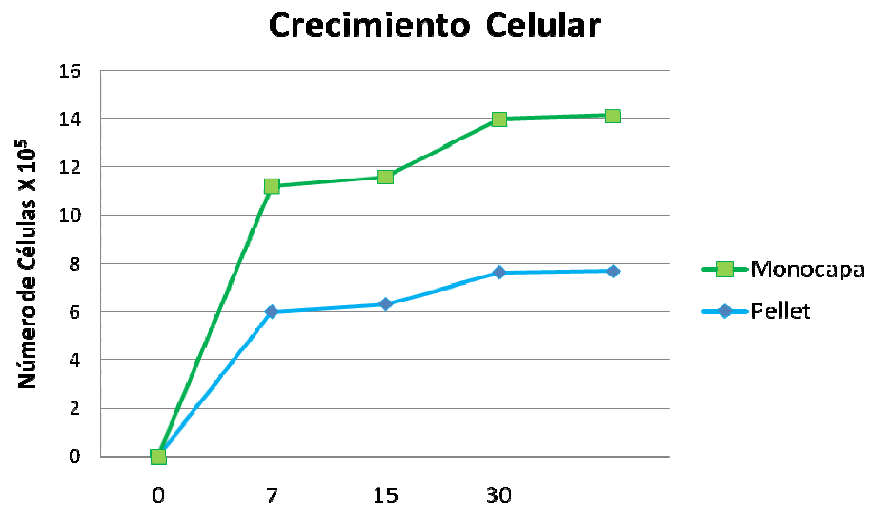
$n = 12 \quad \log_2 (N_H/N_I)$

	7	15	30
EC1	0.0969	1.1614	1.2672
EC3	0.0969	1.1614	1.2695
EC9	0.0969	1.1614	1.2672
EC10	0.0828	1.1614	1.2553
EC19	0.0792	1.2310	1.2672
EC20	0.0934	1.1615	1.2718
EC21	0.0881	1.1663	1.2613
EC23	0.0719	1.1732	1.2765
EC24	0.1004	1.2339	1.2742
EC25	0.0864	1.1614	1.2672
EC27	0.1004	1.2825	1.3377
EC28	0.0969	1.1614	1.2672

Cuadro 4. Valores logarítmicos de la proliferación celular en el cultivo en pellet. Donde 7, 15, 30 se refiere al día de cultivo.

	n= 8 log ₂ (N _H /N _i)		
	7	15	30
EC19	0.20030318	1.46164857	1.55485243
EC20	0.61026696	1.86169062	1.93647043
EC21	0.1903317	1.55145	1.57634135
EC23	0.53748443	1.84410799	1.96223301
EC24	0.10100892	0.96537203	1.03461809
EC25	0.24922762	1.73293216	1.7908136
EC27	0.32179703	1.72903248	1.76036093
EC28	0.24071378	1.74516405	1.78823987

Gráfica 4



Curva de proliferación comparación entre promedios del cultivo en monocapa y el cultivo en pellet.

La morfología de los condrocitos cultivados en monocapa se conservó durante los primeros días en la fase LAG de crecimiento, al agregarles 1% de SFB, la morfología empezó a ser de células redondas a células alargadas. En el cultivo control, las células proliferaron lentamente. Figura 8.

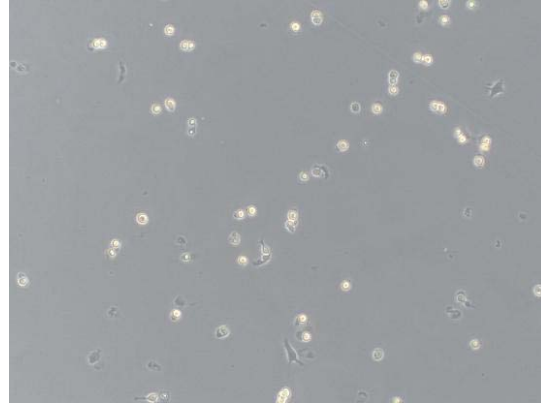
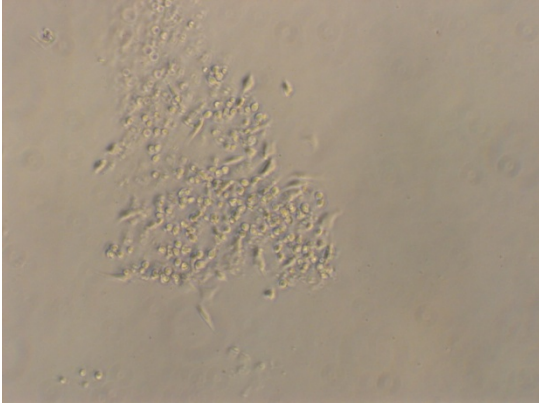
Descripción figura 8: Imagen microscópica 10X de cultivo de condrocitos en monocapa, donde “EC” representa los cultivos que fueron complementados con Suero fetal bovino y ácido ascórbico. Control solo se utilizó medio DMEM.

Figura 8.

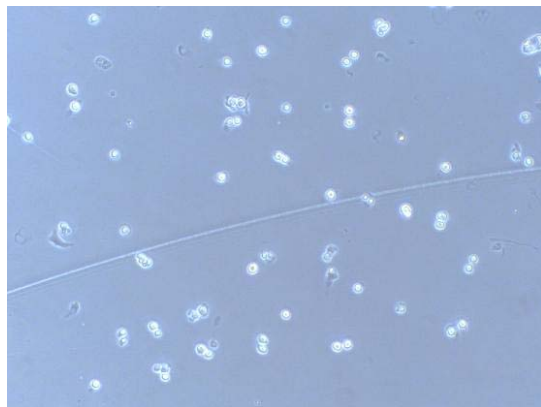
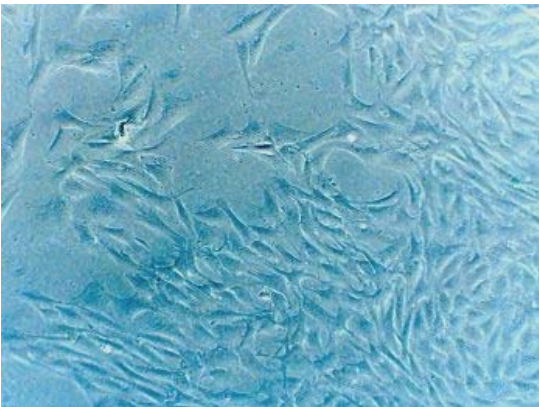
EC

CONTROL

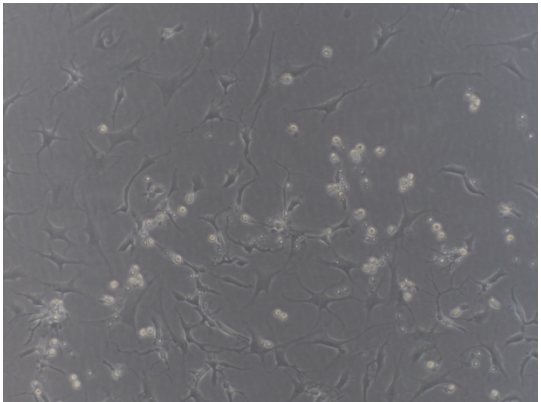
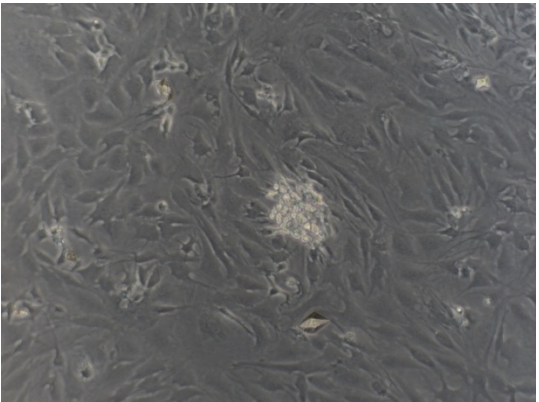
7 DÍAS



15 DÍAS



30 DÍAS



Descripción página 72

6.3 En el caso de los cultivos en pellet se realizaron un total de 77 cultivos, distribuidos de la siguiente manera: 27 cultivos para la evaluación a 7 días de los cuales: 7 fueron fijados para realizar hibridación *in situ*, 3 cultivos para extracción de RNA, 8 para conteo celular y 3 para control negativo, se eliminaron 6 cultivos

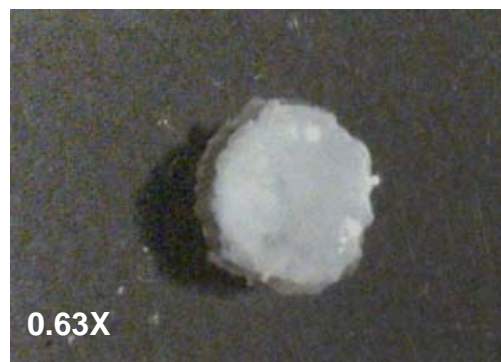
por contaminación; 27 cultivos para la evaluación a 15 días de los cuales: 6 fueron fijados para realizar hibridación *in situ*, 3 cultivos para extracción de RNA, 8 para conteo celular y 3 para control negativo, se eliminaron 6 cultivos por contaminación; 23 cultivos para la evaluación a 30 días de los cuales: 2 fueron fijados para realizar hibridación *in situ*, 4 cultivos para extracción de RNA, 8 para conteo celular y 3 para control negativo, se eliminaron 6 cultivos por contaminación. Figura 9.

Figura 9.

7 DÍAS



15 DÍAS



30 DÍAS

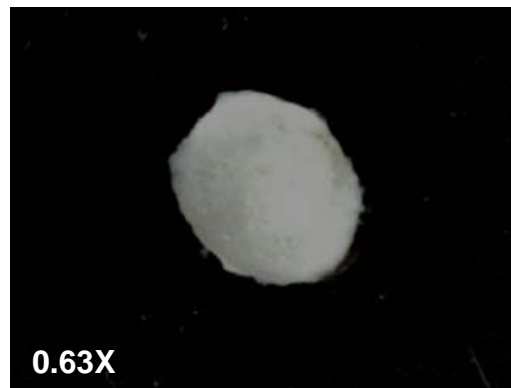


Imagen estereoscópica de los cúmulos celulares obtenidos del cultivo en pellet posterior a 7, 15 y 30 días de cultivo.

6.4 La tinción histológica hematoxilina eosina, revela que los constructos que presentan una intensa acidofilia, difiere del cartílago articular normal en su

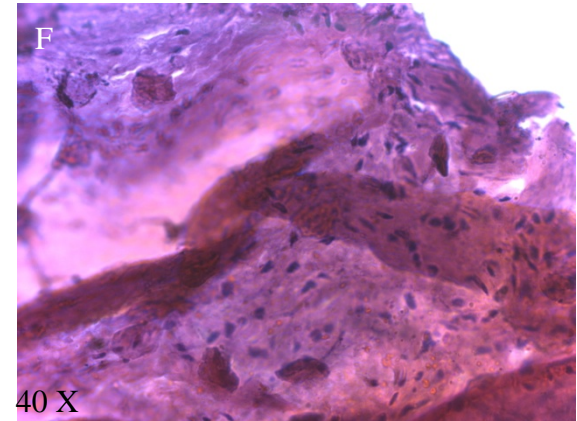
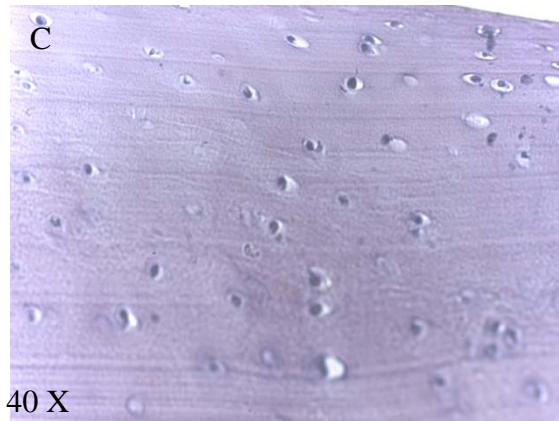
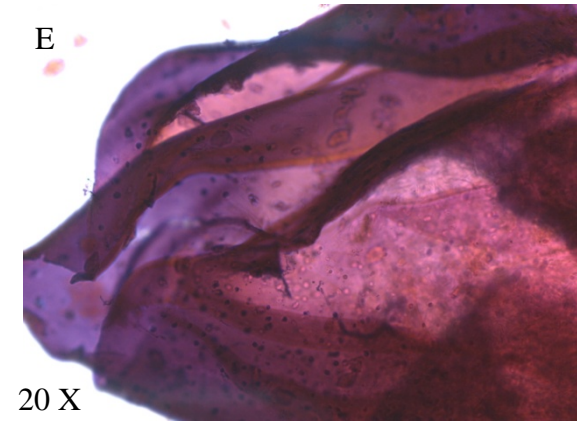
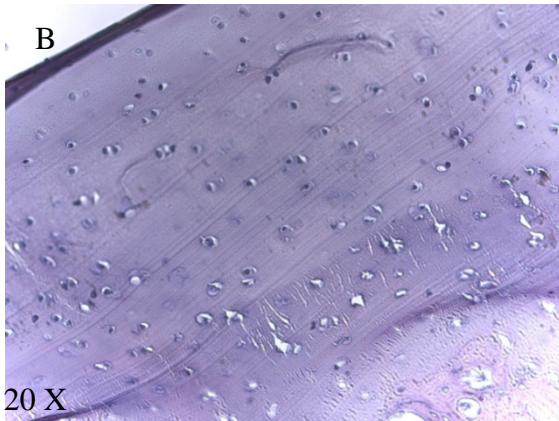
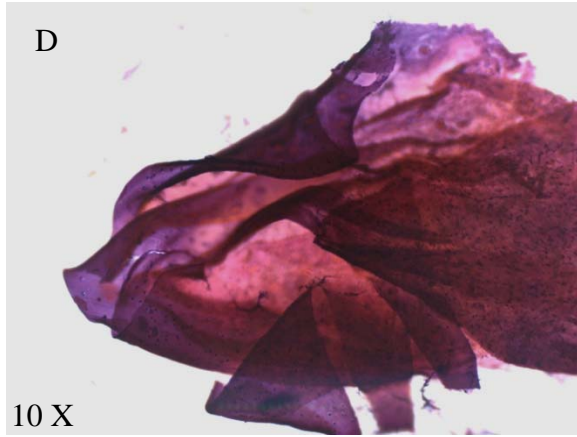
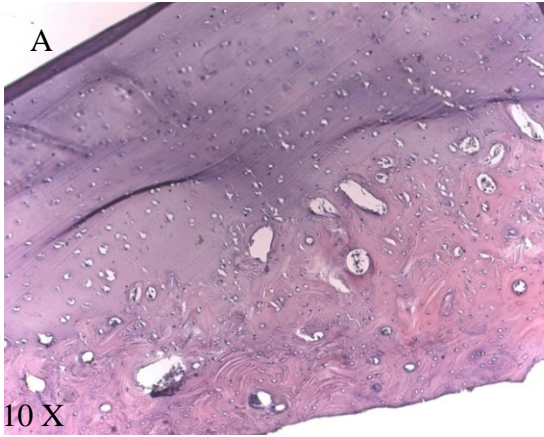
estructura basofila, debido al número de células y a la poca cantidad de matriz extracelular (Figura 10).

Descripción figura 10: Tinción hematoxilina eosina. Evaluación histológica de cartílago normal y del constructo. Aumentos: A) 10X, B) 20X, C) 40X de Cartílago Normal. D) 10X, E) 20X, F) 40X de el pellet obtenido después de 30 días de cultivo, el gran número de células, hace que la tinción se incline a la acidofilia , por ello el color rosa sobresale.

Figura 10.

Normal

EC Pellet



Descripción página 76

6.5 La tinción de safranina sugiere que en los constructos si hay síntesis de proteoglicanos, hay un similar pigmento comparado con el cartílago articular normal por el número de células la cantidad de matriz es menor que en el tejido

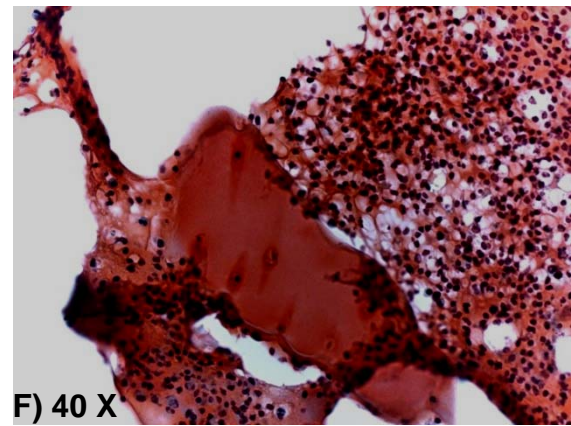
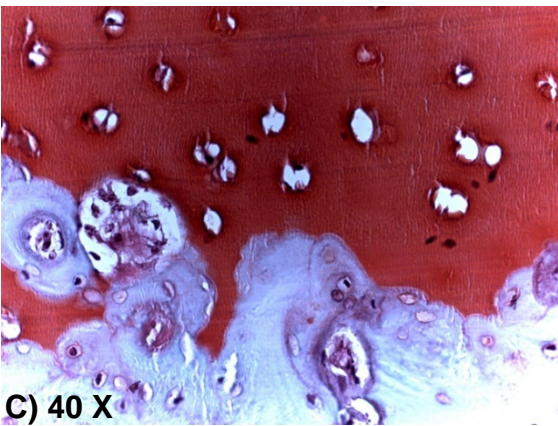
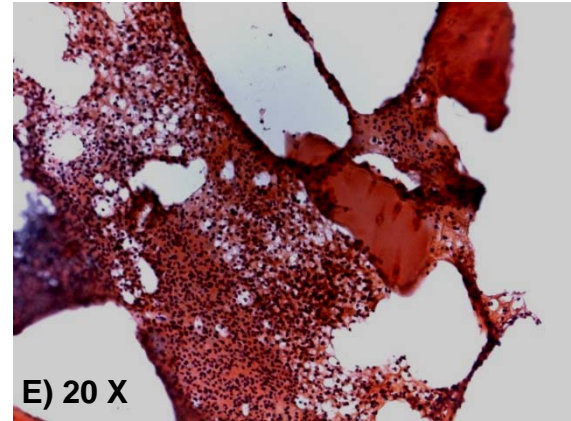
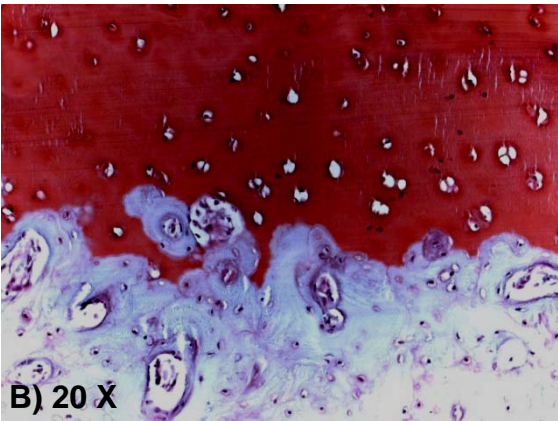
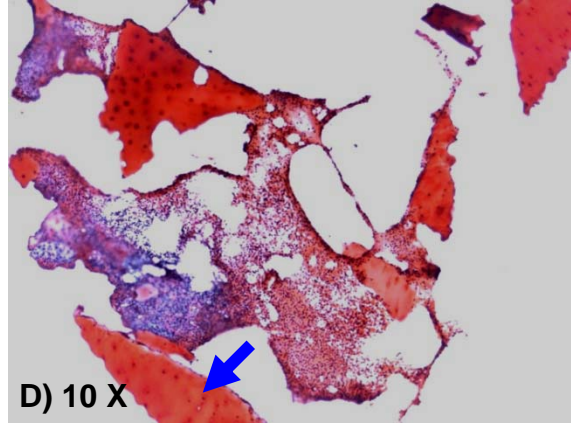
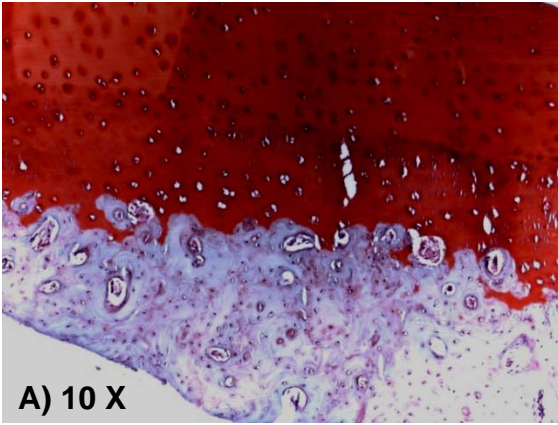
normal y la morfología celular es conservada, se obtuvo un puntaje de 5.1 ± 1.46 .
n=3 (Figura 11)

Descripción figura 11. Tinción de safranina. Evaluación histológica de cartílago normal y del constructo. Aumentos: A, B, C corresponde a Cartílago Normal. D, E, F corresponde al pellet obtenido después de 30 días. La flecha azul indica un explante conservado después de 30 días de cultivo.

Figura 11.

Normal

EC Pellet



Descripción página 78

6.6 Para el aislamiento de RNA se obtuvieron y pesaron un total de 20 muestras donde el promedio fue de 0.1191 ± 0.05127 g de tejido, la concentración de RNA en nano gramos fue muy variable, no tiene distribución normal (Cuadro 5), (Gráfica 5).

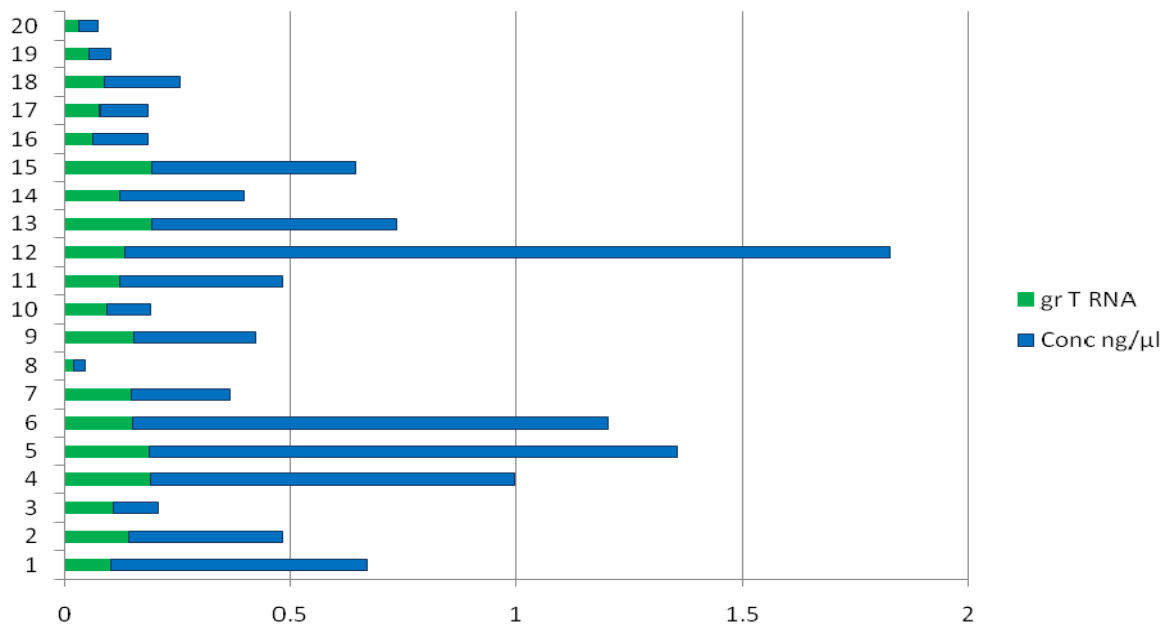
Cuadro 5. Valores obtenidos del aislamiento de RNA, a partir de cartílago normal de la articulación metacarpo-falángica. Los valores fueron obtenidos por medio de espectrofotometría en un Gene Quant Pro de Amersham.

Muestra	Tejido gr.	RNA Conc. ng/μl	Muestra	Tejido gr.	RNA Conc. ng/μl
EC1	0.1022	568	EC12	0.1221	360
EC2	0.1431	340	EC13	0.1357	1692
EC3	0.1067	100	EC14	0.1914	544
EC4	0.1908	806	EC15	0.1224	276
EC5	0.1875	1170	EC16	0.1922	452
EC6	0.1522	1050	EC17	0.0652	120
EC7	0.1488	218	EC18	0.0794	104
EC8	0.019	28	EC19	0.0883	168
EC9	0.1543	270	EC20	0.0545	48
EC11	0.0936	96	EC21	0.0331	44

Cuadro 6. Valores obtenidos del aislamiento de RNA, a partir de condrocitos aislados de la articulación metacarpo-falángica, y condrocitos cultivados en monocapa y pellet. Los valores fueron obtenidos por medio de espectrofotometría en un Gene Quant Pro de Amersham.

Monocapa				Pellet			
Etapa	ID	Células	Conc ng/ μ l	Etapa	ID	Células	Conc ng/ μ l
0	EC1	100,000	276	0	EC26	4,800,000	244
0	EC2	400,000	452	0	EC10	2,540,000	216
0	EC3	320,000	612	0	EC13	1,070,000	328
7	EC7	600,000	128	7	EC19	2,080,000	636
7	EC8	1140,000	112	7	EC20	3,700,000	712
7	EC9	700,000	180	7	EC21	1,300,000	856
15	EC14	500,000	648	15	EC27	4,900,000	1220
15	EC15	500,000	373	15	EC28	1,460,000	504
15	EC16	500,000	220	15	EC30	3,640,000	714
30	EC19	500,000	340	30	EC23	3,966,000	436
30	EC20	500,000	208	30	EC24	4,640,000	504
30	EC21	500,000	320	30	EC25	1,045,000	579

Gráfica 5

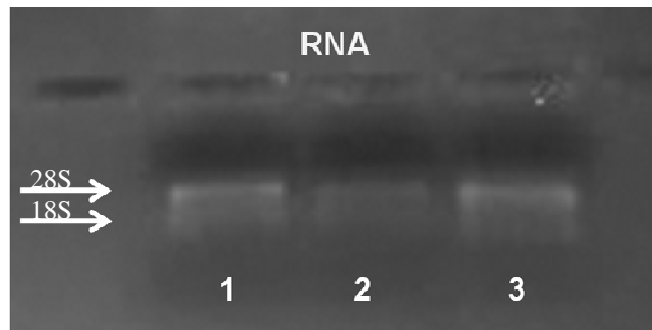


Aislamiento de RNA

En la gráfica se representa la extracción de RNA, donde el color verde representa la cantidad en gramos de cartílago articular normal obtenido para el aislamiento de RNA y el color azul representa la cantidad de RNA extraído a partir de la muestra, lo que indica una relación entre la cantidad de tejido y la cantidad extraída de RNA, que también depende de la eficiencia en la metodología.

Además de la espectrofotometría, el RNA obtenido se comprobó por medio de electroforesis, técnica desnaturalizante de RNA (Figura 12).

Figura 12.



Gel desnaturalizante de RNA , agarosa 1%

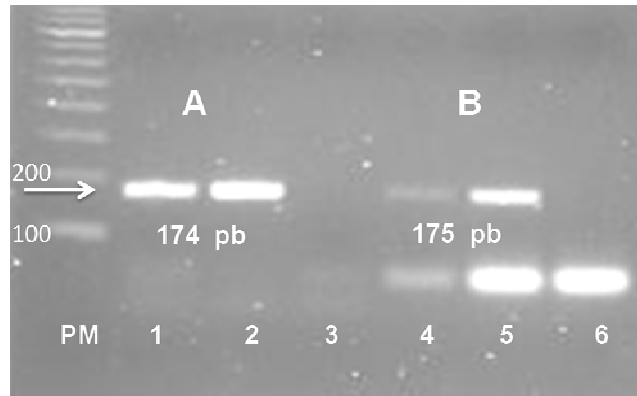
Carriles:

- 1) RNA de cartílago normal.
- 2) RNA de condrocitos de cultivo en monocapa.
- 3) RNA de Condrocitos de cultivo en pellet.

6.7 Selección de primers diseñados para Agrecano de caballo, se observó por medio de electroforesis la alineación de los dos diseños (Figura 13) y se seleccionó el diseño A porque las bandas que se observaron son más anchas y brillantes lo que es indicativo de especificidad, se descarto el uso del diseño B porque en una de las muestras utilizadas la banda fue muy opaca, y en la otra aún que la banda parecía muy específica hubo formación de dímeros y se pueden

observar debajo de la banda, además que en su control negativo también se encontraron dímeros, lo que nos indicaría que este primer se autocomplementa.

Figura 13.



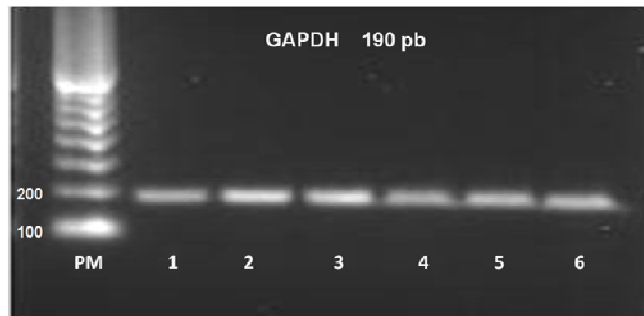
Evaluación por electroforesis de oligos diseñados para Agrecano de Caballo donde se realizó una reacción de PCR utilizando RNA de cartílago articular normal proveniente de dos caballos distintos.

Carriles:

- 1) RNA cartílago normal 1 con oligo agrecano diseño A.
- 2) RNA cartílago normal 2 con oligo agrecano diseño A.
- 3) Control negativo con oligo agrecano diseño A.
- 4) RNA cartílago normal 1 con oligo agrecano diseño B.
- 5) RNA cartílago normal 2 con oligo agrecano diseño B.
- 6) Control negativo con oligo agrecano diseño B.

6.8 La PCR de GAPDH, en la electroforesis (Figura14) se observan bandas homogéneas de la expresión de este gen, sirvió como control de la calidad de mRNA de las muestras, es un control positivo del cDNA, se descartó contaminación con RNA o daño del RNA.

Figura 14.



Expresión de GAPDH

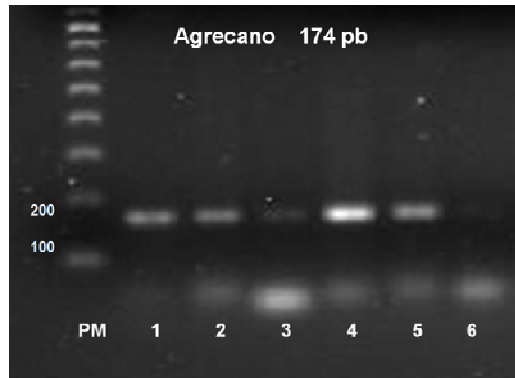
Carriles:

- 1) RNA cartílago normal 1
- 2) RNA cartílago normal 2
- 3) RNA condrocitos de cultivo en monocapa 1
- 4) RNA condrocitos de cultivo en monocapa 2
- 5) RNA condrocitos de cultivo en pellet 1
- 6) RNA condrocitos de cultivo en pellet 2

6.9 Electroforesis correspondiente a la PCR convencional de la expresión de agrecano, el cual fue amplificado por ambos cultivos (Figura 15 y figura 16).

Figura 15.

Cultivo en Monocapa

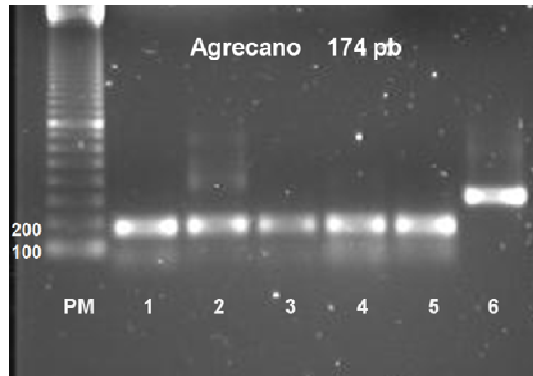


Expresión de Agrecano por condrocitos cultivados en monocapa.

- 1) RNA de Condrocitos aislados antes del cultivo (día 0) muestra una banda homogénea comparada a la obtenida con el carril número 5 que proviene de cartílago normal.
- 2) RNA de Condrocitos a 7 días de cultivo, muestra una banda homogénea comparada a la obtenida con el carril número 1 que proviene de condrocitos aislados antes del cultivo.
- 3) RNA de Condrocitos a 15 días de cultivo, que muestra una banda más tenue en comparación con el día 7 de cultivo lo que indicaría una disminución de la expresión de agrecano.
- 4) RNA de Condrocitos a 30 días de cultivo, donde se observa una banda más ancha, lo que indica mayor expresión de agrecano.
- 5) RNA de Cartílago Normal.
- 6) Control Negativo de la reacción donde la reacción solo contiene óligos y no contiene RNA, para descartar que la amplificación no sea un falso positivo.

Figura 16.

Cultivo en Pellet



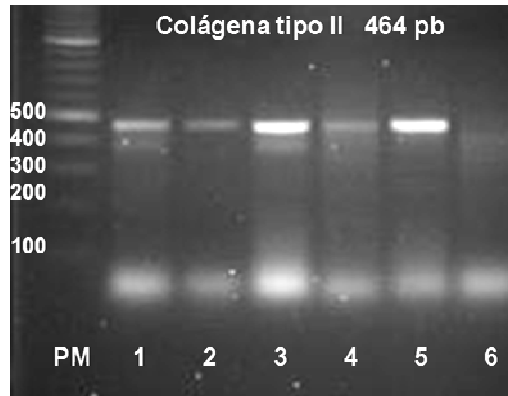
Expresión de Agrecano por condrocitos cultivados en pellet.

- 1) RNA de Condrocitos aislados antes del cultivo (día 0) muestra una banda homogénea comparada a la obtenida con el carril número 5 que proviene de cartílago normal.
- 2) RNA de Condrocitos a 7 días de cultivo muestra una banda homogénea comparada a la obtenida con el carril número 1 que proviene de condrocitos aislados antes del cultivo.
- 3) RNA de Condrocitos a 15 días de cultivo que muestra una banda homogénea en comparación con el día 7 de cultivo, y a diferencia de el cultivo en monocapa no hay disminución de la expresión.
- 4) RNA de Condrocitos a 30 días de cultivo donde se observa una banda homogénea, en comparación con el día 0, 7, 15 días de cultivo lo que indica que no hay mayor expresión de agrecano, pero que se mantiene.
- 5) RNA de Cartílago Normal.
- 6) Control Positivo de la reacción, el óligo amplificado proviene de un DNA plasmídico del kit de PCR.

6.10 En la PCR para la amplificación de colágena tipo II, hubo expresión por ambos cultivos, se observó por medio de electroforesis (Figura 15 y 16) lo siguiente:

Figura 17.

Cultivo en Monocapa



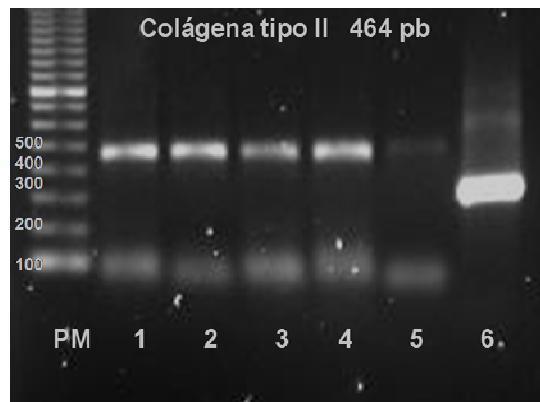
Expresión de Colágena tipo II por condrocitos cultivados en monocapa.

- 1) RNA de Condrocitos aislados antes del cultivo (día 0) muestra una banda opaca y del mismo grosor comparada a la obtenida con el carril número 5 muestra que proviene de cartílago normal pero esta banda es brillante.
- 2) RNA de Condrocitos a 7 días de cultivo, muestra una banda delgada y opaca en comparación a la obtenida con el carril número 1, esto determinado por la pérdida de matriz extracelular durante el proceso de disgregación de los condrocitos aislados previo al cultivo y al periodo de adaptación de las células.
- 3) RNA de Condrocitos a 15 días de cultivo en monocapa, se observa una banda gruesa y brillante, homogénea en comparación con la muestra de cartílago normal, lo que determina que hay expresión de colágena en esta etapa.
- 4) RNA de Condrocitos a 30 días de cultivo, donde se observa una banda más tenue, muy parecida a la encontrada los 7 días de cultivo, lo que indica una disminución en la expresión de colágena tipo II.
- 5) RNA de Cartílago Normal.

- 6) Control Negativo de la reacción donde la reacción solo contiene oligos y no contiene RNA, para descartar que la amplificación no sea un falso positivo.

Figura 18.

Cultivo en Pellet



Expresión de Colágena tipo II por condrocitos cultivados en pellet

- 1) RNA de Condrocitos aislados antes del cultivo (día 0) muestra una banda ancha y brillante, comparada a la obtenida con el carril número 5 que proviene de cartílago normal que en este caso es muy opaca.
- 2) RNA de Condrocitos a 7 días de cultivo muestra una banda homogénea comparada a la obtenida con el carril número 1 que proviene de condrocitos aislados antes del cultivo.
- 3) RNA de Condrocitos a 15 días de cultivo que muestra una banda igual de ancha pero menos brillante, en comparación con el día 7 de cultivo, y en comparación con el cultivo en monocapa a los 15 días puede notarse una ligera disminución de la expresión de colágena tipo II .
- 4) RNA de Condrocitos a 30 días de cultivo donde se observa una banda homogénea, en comparación con el día 0, 7 y 15 días de cultivo lo que

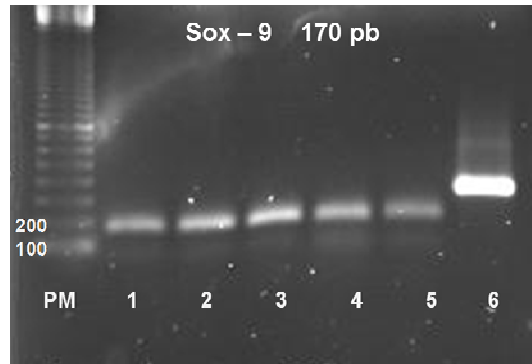
indica que se mantiene la expresión de colágena tipo II, pero es mayor en comparación con el tejido normal.

- 5) RNA de Cartílago Normal.
- 6) Control Positivo de la reacción, el óligo amplificado proviene de un DNA plasmídico del kit de PCR.

6.11 Electroforesis correspondiente a la PCR convencional de la expresión de Sox9, por los condrocitos de cultivo en monocapa, comparación con la expresión de los condrocitos cultivados en pellet. (Figura 19 y figura 20).

Figura 19.

Cultivo de Monocapa

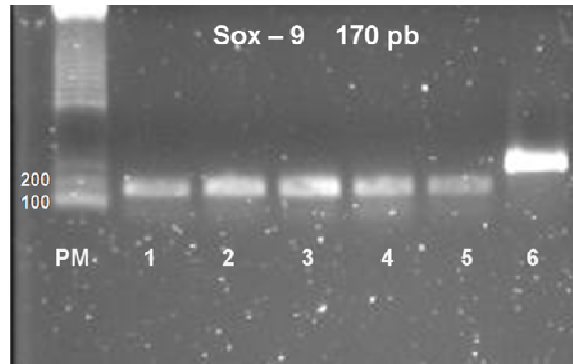


Expresión de Sox9 por condrocitos cultivados en monocapa.

- 1) RNA de Condrocitos aislados antes del cultivo (día 0) muestra una banda ancha ligeramente opaca, homogénea a la encontrada en el carril 5 que proviene de cartílago normal.
- 2) RNA de Condrocitos a 7 días de cultivo muestra una banda ancha y más brillante, comparada a la obtenida con el carril número 1 que proviene de condrocitos aislados antes del cultivo.
- 3) RNA de Condrocitos a 15 días de cultivo que muestra una banda igual de ancha y brillante, en comparación con el día 7 de cultivo, a los 15 días puede notarse un ligero aumento de la expresión de Sox9.
- 4) RNA de Condrocitos a 30 días de cultivo donde se observa una banda menos brillante pero homogénea en tamaño, en comparación con el día 7 y 15 días de cultivo lo que indica que se mantiene la expresión de Sox9 y es mayor en comparación con el tejido normal.
- 5) RNA de Cartílago Normal.
- 6) Control Positivo de la reacción, el óligo amplificado proviene de un DNA plasmídico del kit de PCR.

Figura 20.

Cultivo de Pellet



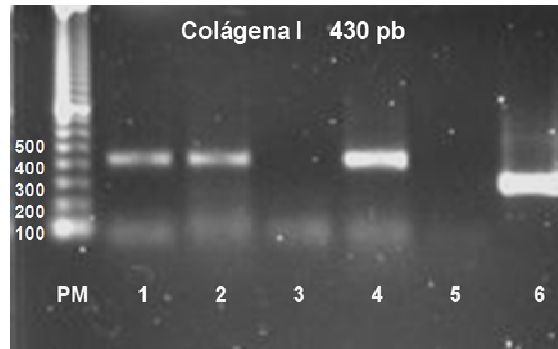
Expresión de Sox9 por condrocitos cultivados en pellet.

- 1) RNA de Condrocitos aislados antes del cultivo (día 0) muestra una banda homogénea, comparada con la obtenida con el carril número 5 que proviene de cartílago normal.
- 2) RNA de Condrocitos a 7 días de cultivo muestra una banda homogénea comparada a la obtenida con el carril número 1 que proviene de condrocitos aislados antes del cultivo.
- 3) RNA de Condrocitos a 15 días de cultivo que muestra una banda homogénea en comparación con el día 7 de cultivo, y en comparación con el cultivo en monocapa.
- 4) RNA de Condrocitos a 30 días de cultivo donde se observa una banda homogénea, en comparación con el día 0, 7 y 15 días de cultivo lo que indica que se mantiene la expresión de Sox9, como en el tejido normal.
- 5) RNA de Cartílago Normal.
- 6) Control Positivo de la reacción, el óligo amplificado proviene de un DNA plasmídico del kit de PCR.

6.12 Expresión de Colágena tipo I por los condrocitos de cultivo en monocapa, comparación con la expresión de los condrocitos cultivados en pellet.

Figura 21.

Cultivo de Monocapa

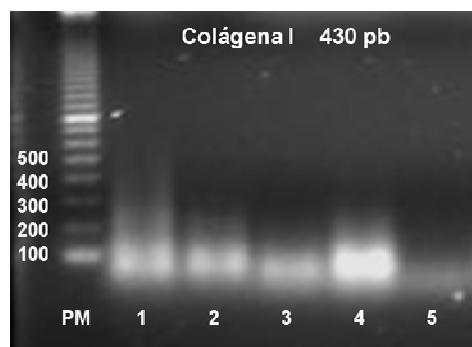


Expresión de Colágena tipo I por condrocitos cultivados en monocapa

- 1) RNA de Condrocitos aislados antes del cultivo (día 0) muestra una banda Homogénea comparada a la obtenida con el carril número 2 que corresponde a condrocitos a 7 días de cultivo.
- 2) RNA de Condrocitos a 7 días de cultivo, banda delgada y opaca en comparación a la obtenida con el carril número 1.
- 3) RNA de Condrocitos a 15 días de cultivo en monocapa, no se observa banda.
- 4) RNA de Condrocitos a 30 días de cultivo, donde se observa una banda más brillante y más gruesa que la encontrada los 0 y 7 días de cultivo, lo que indica un aumento en la expresión de colágena tipo II.
- 5) RNA de Cartílago Normal no se observa banda.
- 6) Control Positivo de la reacción, el óligo amplificado proviene de un DNA plasmídico del kit de PCR.

Figura 22.

Cultivo en Pellet



Expresión de Colágena tipo I por condrocitos cultivados en pellet.

En esta electroforesis no se encontraron bandas en ninguno de los casos, el contenido de los carriles es:

- 1) RNA de Condrocitos aislados antes del cultivo (día 0).
- 2) RNA de Condrocitos a 7 días de cultivo.
- 3) RNA de Condrocitos a 15 días de cultivo.
- 4) RNA de Condrocitos a 30 días de cultivo.
- 7) Control Negativo de la reacción, donde la reacción solo contiene oligos y no contiene RNA, para descartar que la amplificación no sea falsa.

6.13 La estandarización de la técnica de PCR en tiempo real se muestra con las gráficas 6, 7 y 8. El siguiente cuadro contiene la relación de color correspondiente a la muestra de la que proviene.

C_t : corresponde al número de ciclo en el que la fluorescencia generada, cruza la línea basal, y se relaciona con el crecimiento exponencial de los productos de PCR.

Conc. (ng/ul): corresponde a la concentración de RNA por muestra.

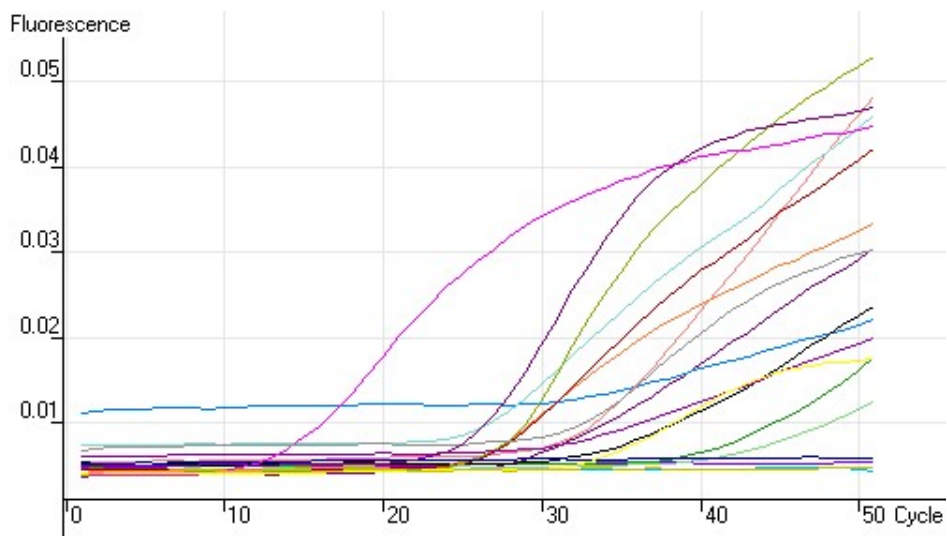
Conc. Calc. (ng/ul): corresponde a la concentración de DNA generada, por muestra.

Cuadro 7. Estandarización de RT-PCR

No.	Color	ID	Ct	Conc (ng/ul)	Conc. Calc. (ng/ul)
-----	-------	----	----	--------------	---------------------

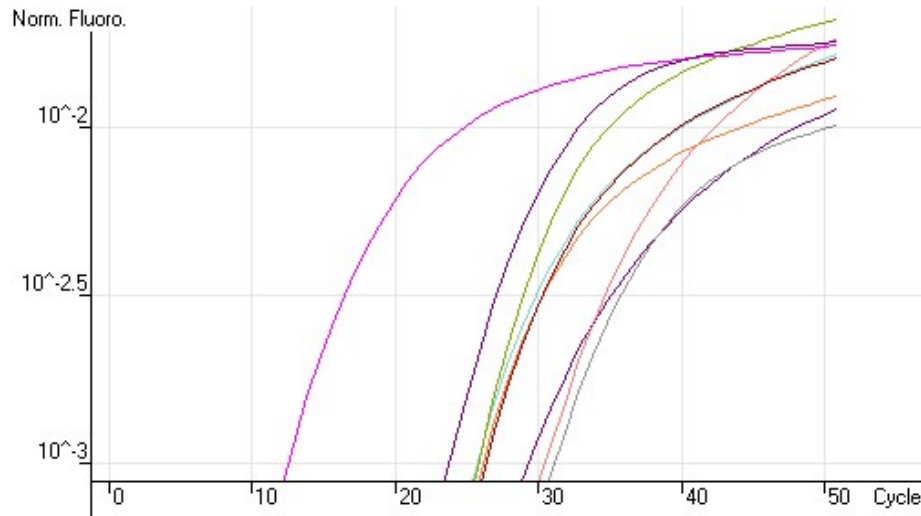
No.	Color	ID	Ct	Conc (ng/ul)	Conc. Calc. (ng/ul)
1	Red	Cartílago normal con oligos para GAPDH	3.94	340	378.62077154467
3	Blue	Condrocitos con oligos para GAPDH	4.72	612	911.102270318925
5	Pink	Cartílago normal con oligos para COL1	3.92	340	372.677382257931
7	Teal	Condrocitos con oligos para COL 1	5.46	612	2074.33990419588
9	Green	Cartílago normal con oligos para COL2	3.72	340	296.276863358295
18	Purple	Condrocitos con oligos para COL2	4.21	612	511.40036498079
20	Dark Red	Cartílago normal con oligos para SOX9	3.49	340	228.202101957322
22	Olive	Condrocitos con oligos para SOX9	4.21	612	515.462093864889
24	Light Blue	Cartílago normal con oligos para AGC	4.14	340	476.255204028906
26	Dark Purple	Condrocitos con oligos para AGC	3.23	612	172.326589376338

Gráfica 6



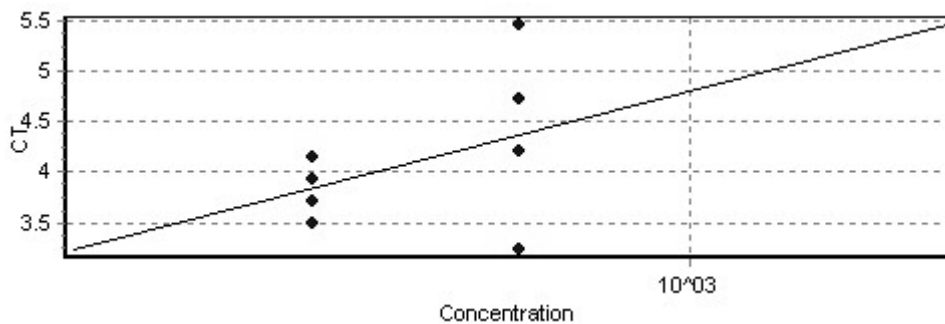
Curva de RT-PCR, estandarización de técnica para marcadores de cartílago de caballo.

Gráfica 7.



Curva normalizada de RT-PCR de estandarización de la técnica para marcadores de cartílago de caballo.

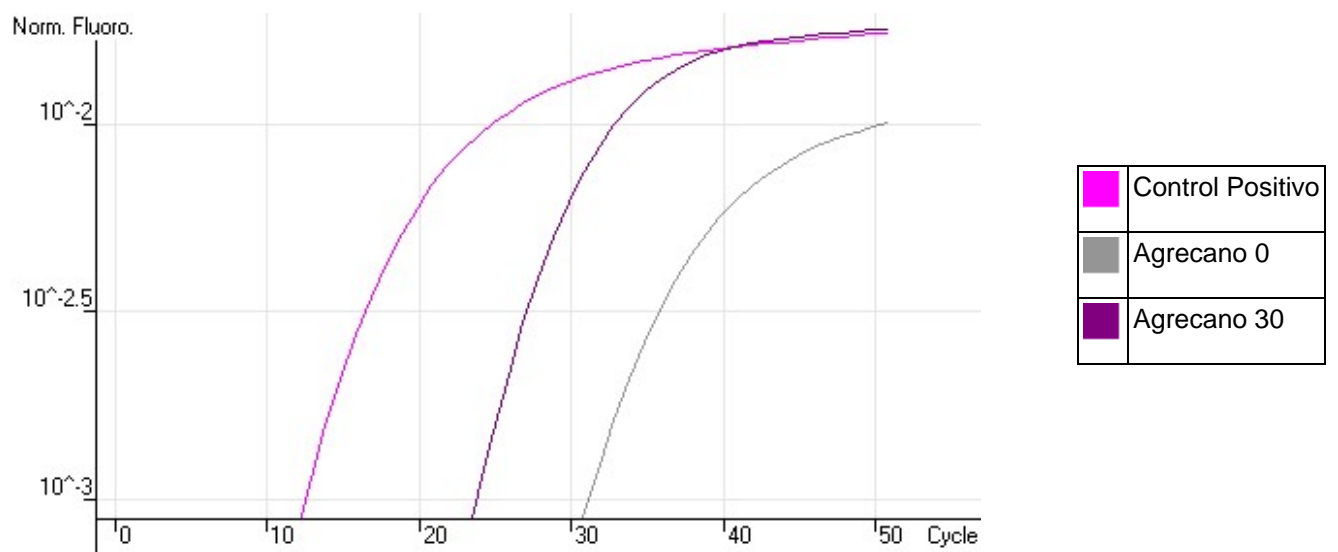
Gráfica 8.



Curva Estándar del coeficiente de determinación (R^2) de la estandarización de la técnica para marcadores de cartílago de caballo.

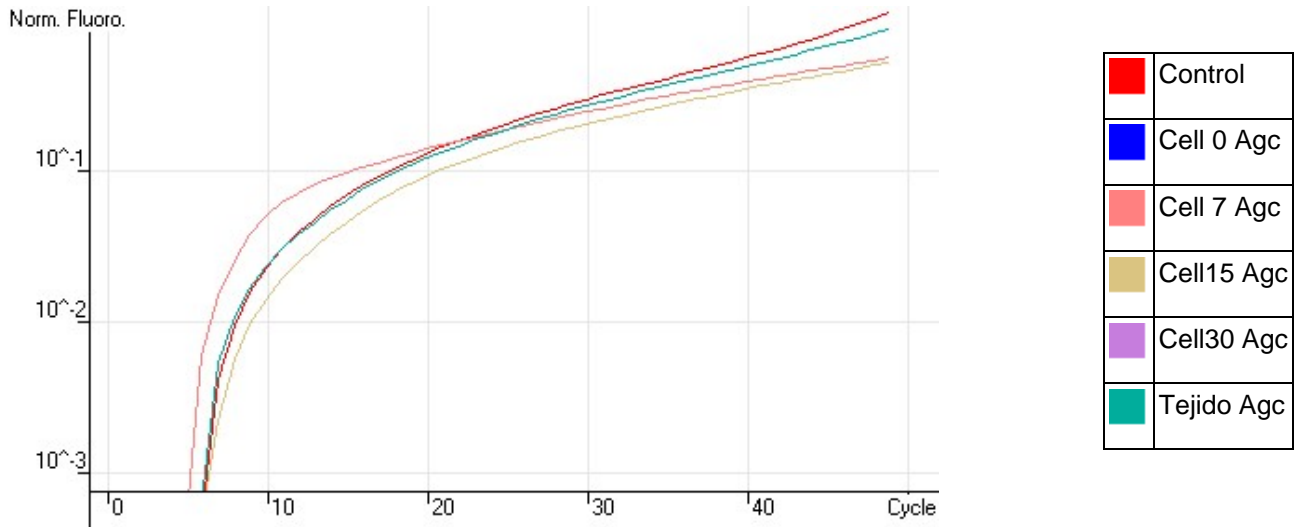
6.14 En la RT-PCR se encontraron resultados similares a los encontrados en la PCR convencional, cabe mencionar que cada muestra proviene de diferentes caballos, entonces la muestra utilizada como cartílago normal no fue la misma para cada ensayo y esto conlleva a que la calidad del RNA fue diferente también, en el caso para las muestras provenientes de los cultivos, se utilizó un cultivo diferente en cada ensayo y para tener la certeza de los resultados el experimento se realizó en tres ocasiones, con las mismas condiciones.

Gráfica 9.



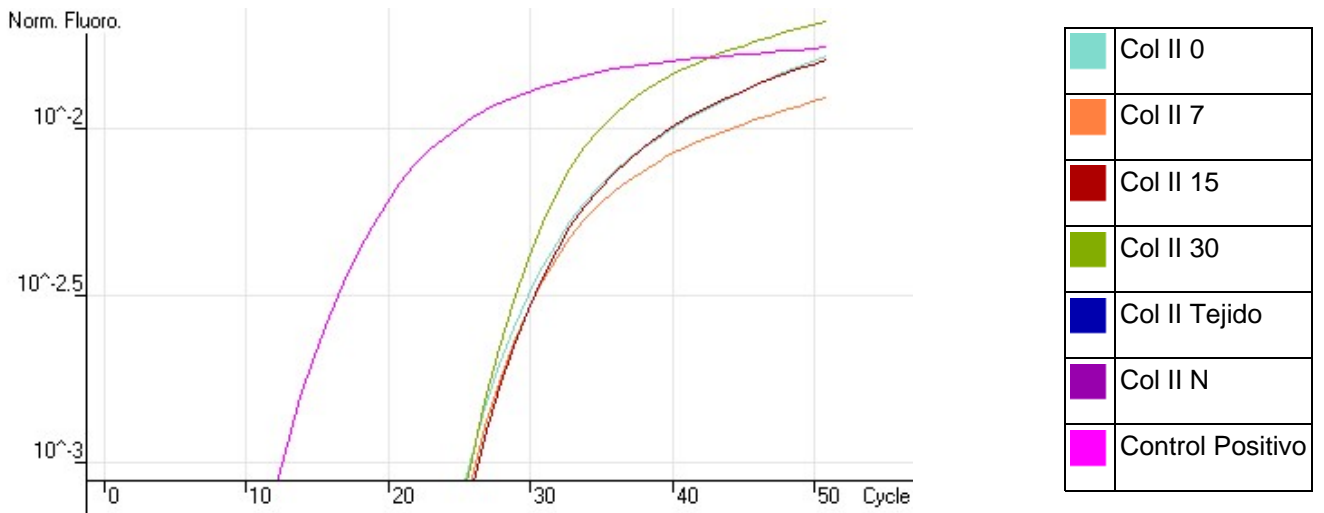
Curva normalizada de RT- PCR, expresión de Agrecano por los condrocitos en cultivo en monocapa, cada ensayo incluyó una muestra de cartílago normal.

Gráfica 10



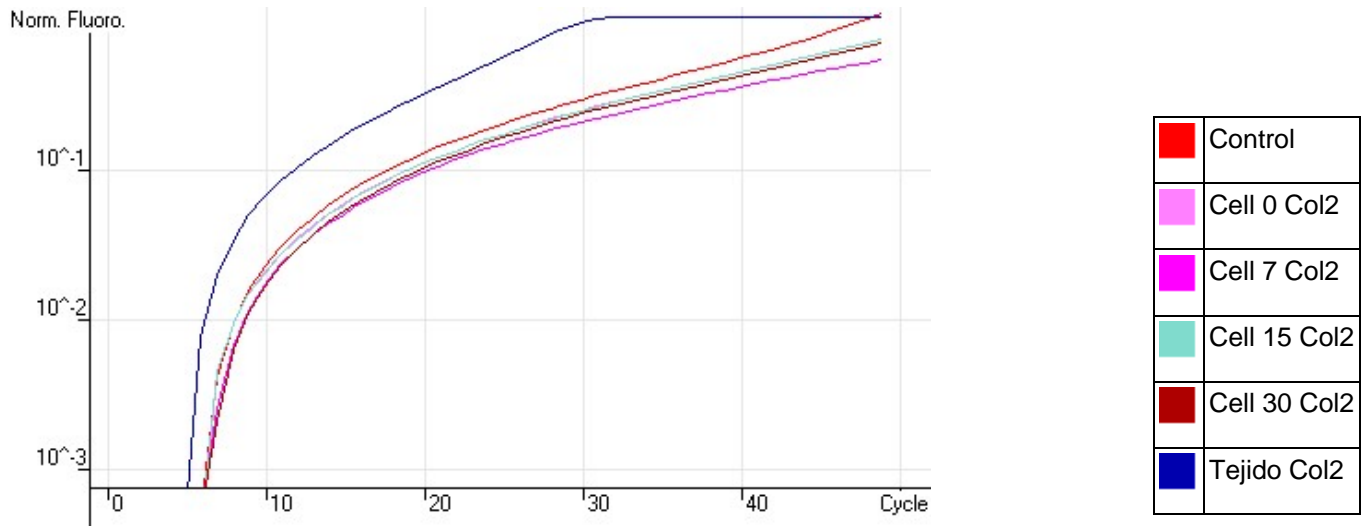
Curva normalizada de RT- PCR, expresión de Agrecano por los condrocitos en cultivo en pellet, cada ensayo incluyó una muestra de cartílago normal.

Gráfica 11.



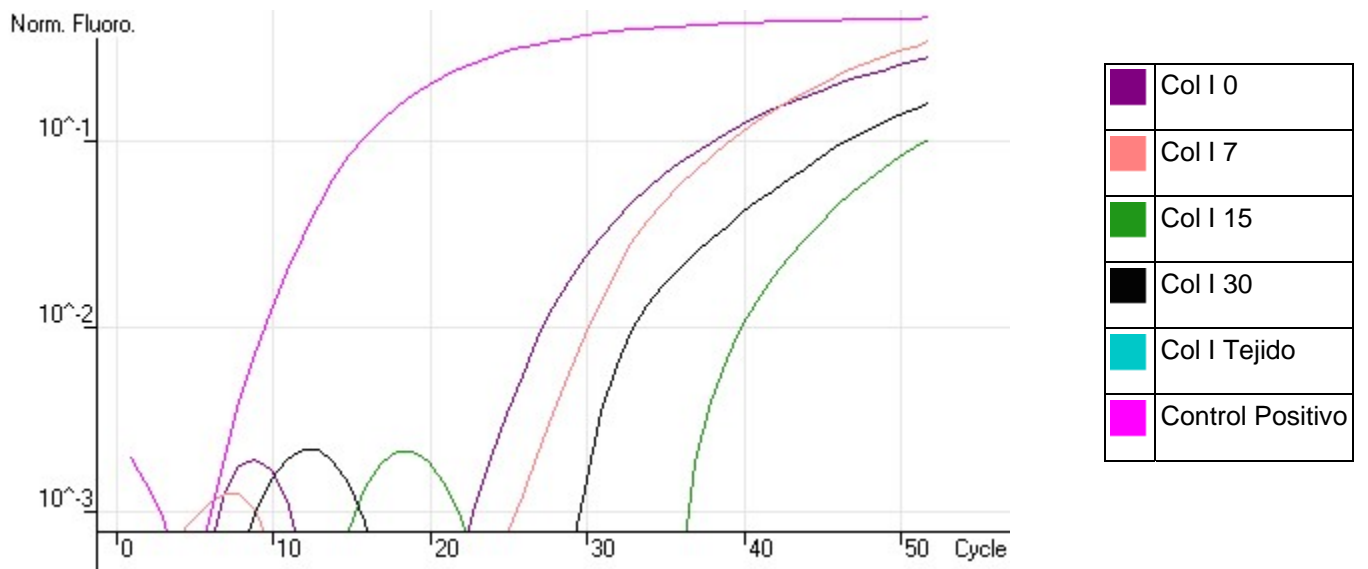
Curva normalizada de RT- PCR, expresión de Colágeno tipo II, por los condrocitos en cultivo en monocapa, cada ensayo incluyó una muestra de cartílago normal.

Gráfica 12



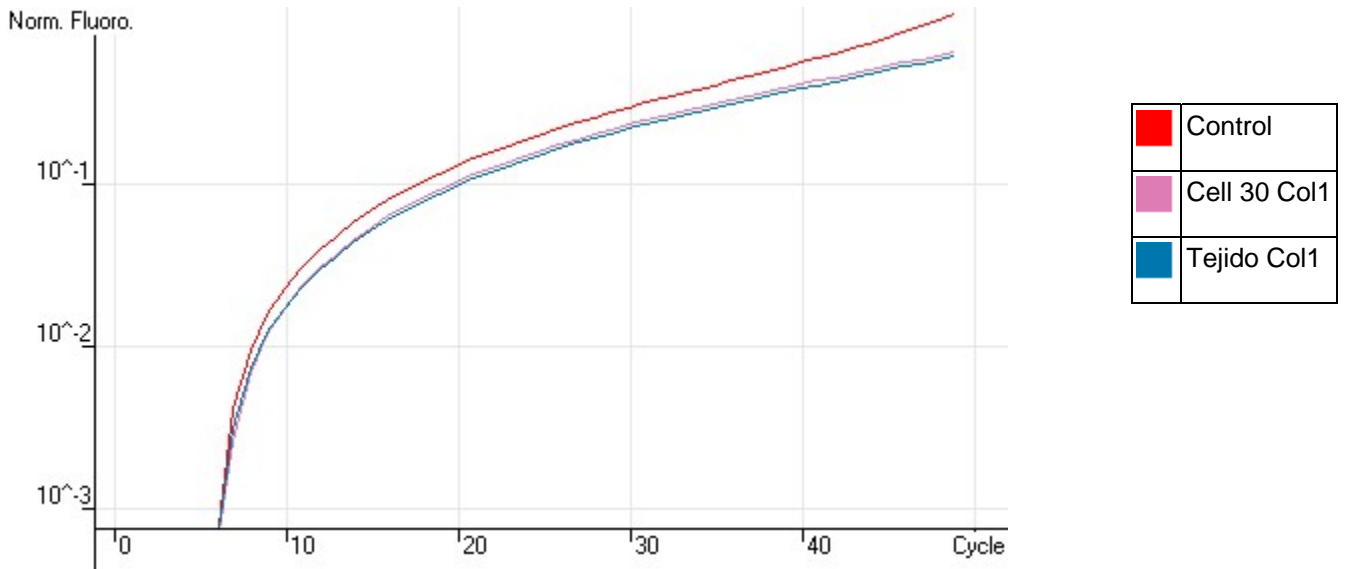
Curva normalizada de RT- PCR, expresión de Colágena tipo II, por los condrocitos en los cultivos en pellet, cada ensayo incluyó una muestra de cartílago normal.

Gráfica13.



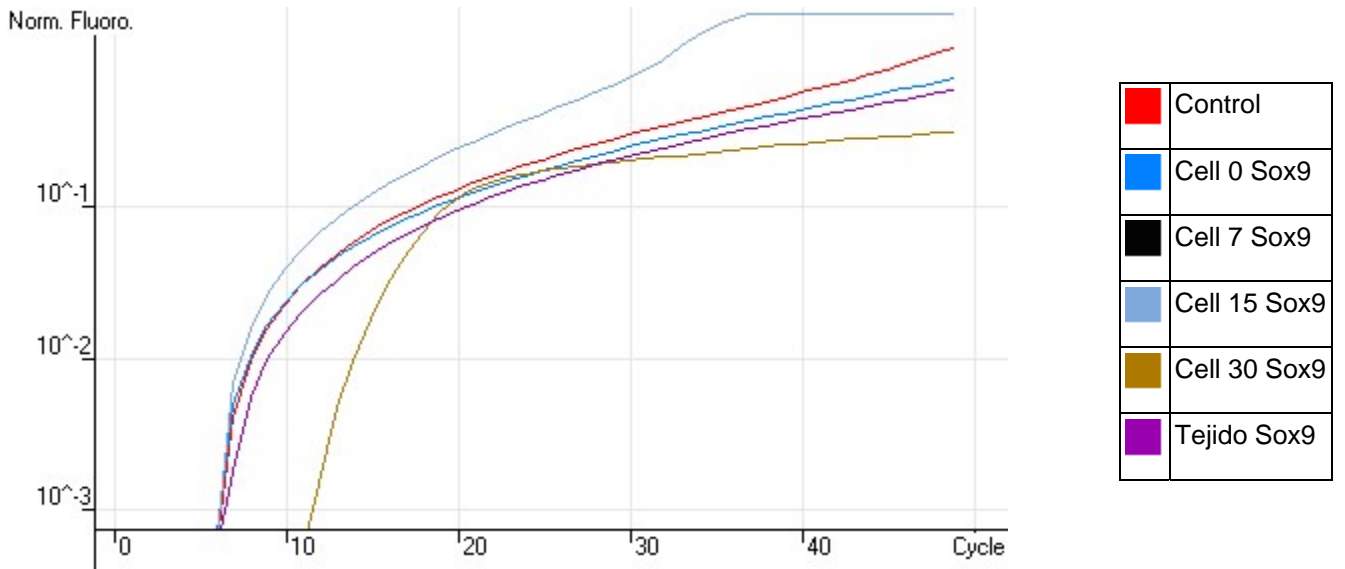
Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Colágena tipo I, por los condrocitos en cultivo en monocapa, cada ensayo incluyó una muestra de cartílago normal.

Gráfica 14.



Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Colágena tipo I, por los condrocitos en cultivo en pellet, cada ensayo incluyó muestra de cartílago normal.

Gráfica 15.



Curvas normalizadas de RT- PCR, expresión de Sox9, por los condrocitos cultivados en pellet, el ensayo incluyó muestra de cartílago normal.

6.15 En el cartílago normal se encontró por medio de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente la sonda de Agrecano, marcada con alexa fluor 488 (color verde) (Figura 23), se detecto Sox 9 marcada con alexa fluor 555(color naranja), en dos muestras diferentes de cartílago normal, No se encontró expresión de colágena tipo I marcada con Alexa fluor 594 (color rojo), ni expresión de colágena tipo II marcada con Fluoresceína (color amarillo)

Figura 23.

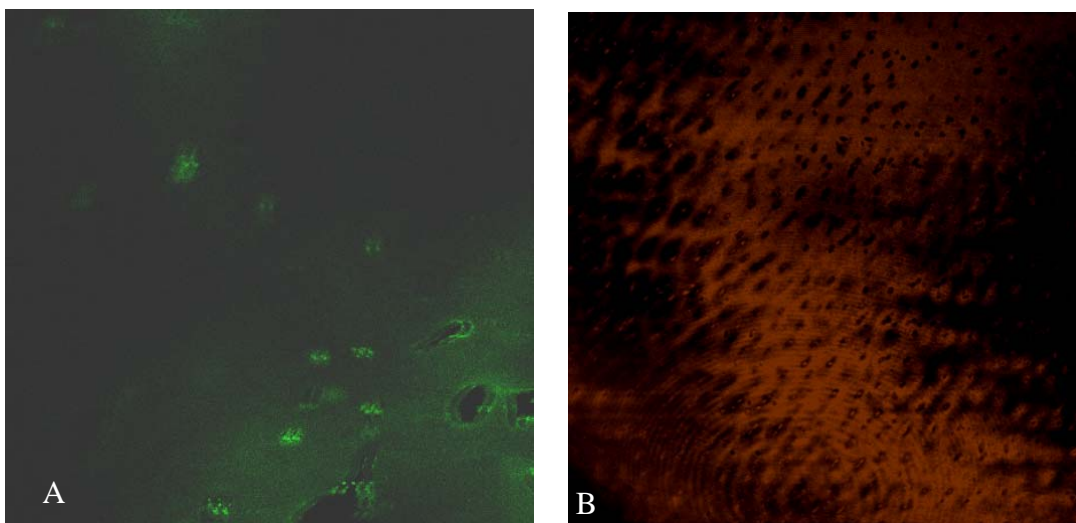


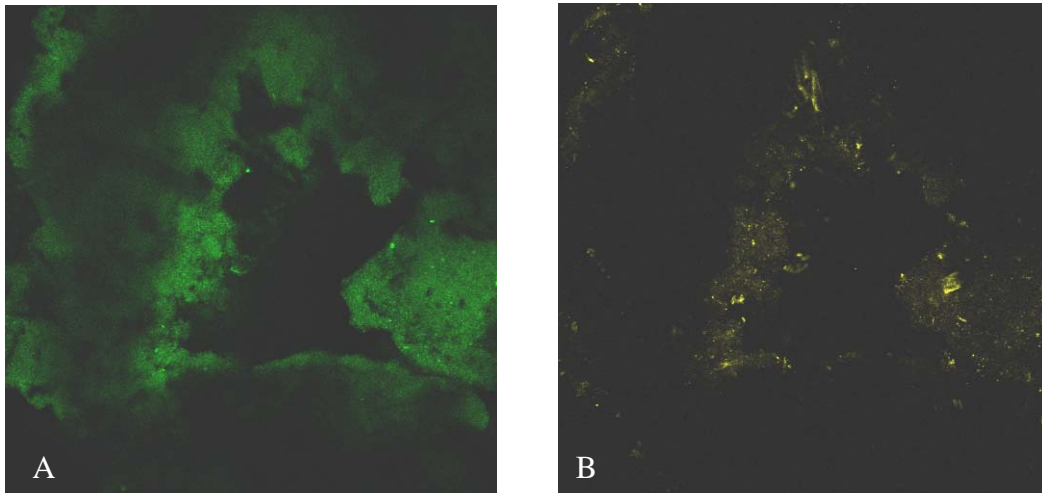
Imagen microscópica confocal de Hibridación *in situ* fluorescente en cartílago normal.

A) Detección de sonda de Agrecano en cartílago normal.

B) Detección de sonda de Sox9 en cartílago normal

6.16 Por medio de hibridación *in situ* se detectó en el pellet la expresión de Agrecano, Colágena tipo I, y Sox9, las sondas fueron marcadas de la siguiente forma agrecano: con alexa fluor 488 (color verde), Sox9 marcada con alexa fluor 555(color naranja), colágena tipo II marcada con Fluoresceína (color amarillo) en normal (Figura 24), No se encontró expresión de colágena tipo I marcada con Alexa fluor 594 (color rojo).

Figura 24.



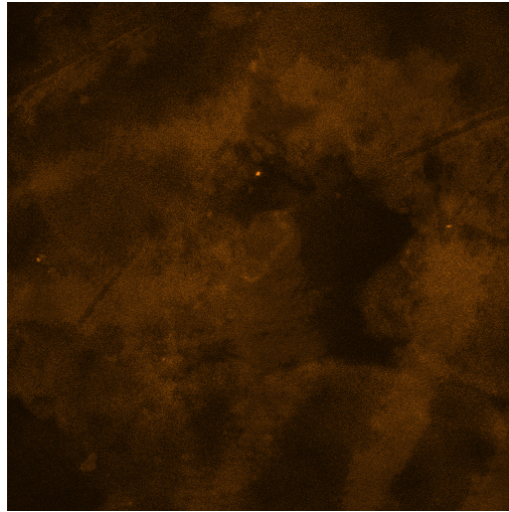
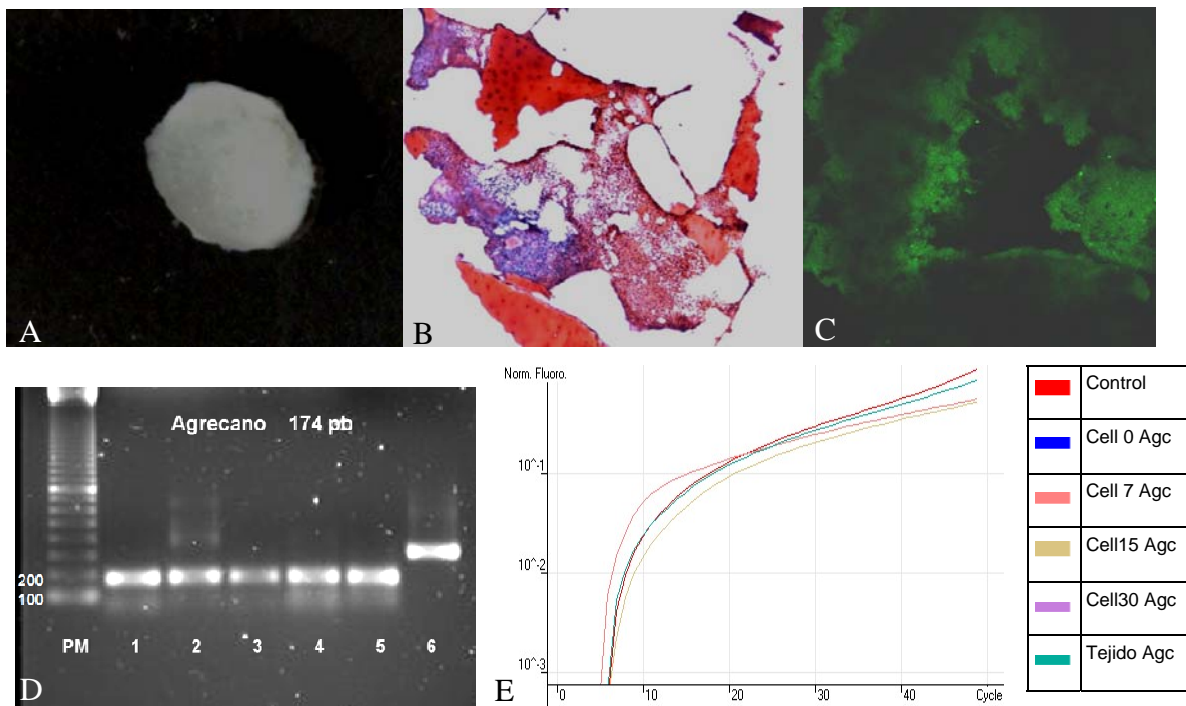


Imagen microscópica confocal de Hibridación *in situ* fluorescente en constructo formado con condrocitos cultivados en pellet.

- A) Detección de Agrecano en el cultivo en pellet
- B) Detección de Colágena tipo II de cultivo en pellet.
- C) Detección de Sox-9 de cultivo en pellet.

Figura 25.



Resumen de evaluación

- A) Pellet obtenido después de 30 días de cultivo.
- B) Corte histológico de pellet 30 días posterior al cultivo 10X , tinción de safranina.
- C) Hibridación *in situ* fluorescente donde se detectó la presencia de agrecano.
- D) Electroforesis de la PCR para detección de la expresión de agrecano, en condrocitos cultivados en pellet, donde se observaron bandas homogéneas para todas las fases de crecimiento de un cultivo en pellet.
- E) RT- PCR, Curva normalizada de la expresión de Agrecano por los condrocitos cultivados en pellet.

VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El condrocito, la única célula del cartílago adulto, responsable de mantener a la matriz cartilaginosa, de baja actividad mitótica y sintética, cuando se cultiva igual que otros tipos celulares, puede aumentar su capacidad de síntesis.

De origen humano o animal, los condrocitos han sido modelos para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos de la osteoartritis y también tienen aplicaciones clínicas, especialmente en la ingeniería de tejidos y en la terapia génica. Sin embargo en el cultivo en monocapa de condrocitos, se presenta un problema de desdiferenciación.

En los cultivos en monocapa de alta densidad, los condrocitos mantienen su fenotipo condrocítico, pero disminuyen su expresión de colágeno tipo II. Para solucionar este problema se han practicado cultivos en suspensión en agitación continua, en pellets, en matrices tridimensionales como gel o agarosa, alginato, esponjas de colágeno, etc., donde se mantienen el fenotipo, pero el crecimiento es lento. Al conocer estos aspectos de los condrocitos, se han resuelto de forma paulatina los problemas encontrados durante el cultivo, se han desarrollado medios específicos para cartílago, se han mejorado las técnicas de cultivo, se han diseñado mejores andamios, con la finalidad de mejorar la posibilidad de reparar el cartílago dañado con condrocitos autólogos.

De la misma forma se debe desarrollar una metodología de evaluación, previo a un implante, para poder predecir el resultado a largo plazo de la reparación por medio de implante de condrocitos autólogos.

En este trabajo se utilizaron diferentes técnicas de biología molecular de aplicación en la ingeniería de tejidos para conocer la mejor para la evaluación tanto de los cultivos, como del constructo resultante.

De acuerdo a los registros del experimento, se obtuvieron mayor número de células de las muestras que provenían de los caballos machos, aunque estos eran menos, pero eran los más jóvenes, así que, probablemente se debe a la relación con la edad, pues hay un efecto en relación a la edad (Brommer 2003) y

al tamaño de los proteoglicanos, como lo menciona Adames (2006) lo que haría también que se disminuyera el volumen del tejido, otro factor importante es que se pueden encontrar pequeñas diferencias de acuerdo al lugar de carga de donde se obtenga la muestra de cartílago, como lo menciona Clegg (2005), para evitar este error se tomó la muestra siempre en el mismo lugar y hacia la misma dirección, pero no se encontró algún dato que mencione si hay relación entre el sexo con la cantidad de tejido. Con las técnicas de PCR y RT-PCR fue posible conocer los niveles de expresión, de agregano, colágena tipo II y Sox9, en el tejido normal.

A diferencia de otras investigaciones en este trabajo se realizó el cultivo en pellet directamente después de la disgregación, algunos autores como Encabo (2005) y Grogan (2006), primero realizan un cultivo en monocapa y posteriormente forman el pellet, esto se relaciona al número de células pues sería necesario una gran biopsia para cada cultivo, pues es necesario que sean millones de células, en este trabajo se utilizaron a partir de 1 millón de condrocitos, pues fue imposible formar un pellet con menor cantidad, de esa manera se estableció el número de células para este tipo de cultivo, por lo que hace que esta técnica de cultivo no sea la apropiada si se quisiera utilizar para un implante, en el caso de los cultivos en monocapa el número de células fue determinado de acuerdo al límite de volumen para la caja.

No se encontraron diferencias entre la proliferación de los condrocitos cultivados en monocapa y los cultivados en pellet, a pesar que estaban cultivados a diferentes densidades.

Respecto a la morfología de los condrocitos, se determinó, aquellos condrocitos que provenían de pellet, conservaban su morfología redonda, los que provenían de la monocapa eran observados cada tercer día, así que se pudo observar el desarrollo de la forma fibroblástica.

Además en el cultivo en pellet era importante que, después de la disgregación celular se conservaran algunos explantes para servir como andamio para las células, puesto que si eran pasadas a través de un filtro, los pellets perdían rápidamente la forma, no se aglomeraban y no se conservaban los

cultivos. Entonces se concluye que, para formar un pellet adecuado y que se conserve su estructura durante el cultivo las células no deben ser filtradas y deben tener una estructura que funcione como base.

En los cultivos control, las células proliferaron muy lentamente, aunque la fase "lag" no tuvo diferencias con el resto de los cultivos, formaron prolongaciones que les dio la apariencia de fibroblastos.

La morfología de los condrocitos cultivados en monocapa se conservó durante los 3 primeros días en la fase "lag" de crecimiento, al igual que los cultivos controles, cuando se agregó 1% de SFB, aumento el crecimiento celular así como cambio la morfología de redonda a alargada, y está se conservó hasta el día 30 de cultivo, en otras investigaciones el porcentaje de SFB es de 5%(Takahashi 2007) 10% (Eyrich 2007; Hannouche 2007; Yang 2006; Yeh 2004; Hendrickson 1994) de hecho este porcentaje es el que se utiliza en el laboratorio de ingeniería de tejidos- INR otros utilizan 20% como Allan (2007), en este trabajo se utilizó un porcentaje tan bajo porque de acuerdo a Garcíadiego (2004) la adición de SFB en altos porcentajes acelera la desdiferenciación de los condrocitos a condrocitos hipertróficos.

La adición de ácido ascórbico en el tratamiento hizo que las células produjeran mayor cantidad de matriz extracelular y aumentó la cantidad de colágena tipo II, aunque no es bien conocido el mecanismo de control genético de la producción de matriz, Clark (2002) investigó el efecto del ácido ascórbico en el metabolismo de los condrocitos, confirmando que el ácido ascórbico estimula la producción de colágena tipo II y moderadamente la de agregano, en este trabajo fue detectado por medio de PCR donde a los 15 días de cultivo expresaba poca colágena tipo II, en la siguiente evaluación, a los 30 días se encontró un aumento significativo, lo cual nos indica que es un excelente tratamiento a las condrocitos y que probablemente, si puedan regresar a su fenotipo normal cuando sean implantadas.

La metodología de evaluación de la histología siguió los principios del Bern Score, desarrollado por Grogan et al (2006) y utilizado de la misma forma que Yang et al (2006). Las tinciones histológicas de hematoxilina eosina revelan que los constructos, difieren del cartílago articular normal en su estructura, esto debido al número de células y a la poca cantidad de matriz extracelular, sin embargo la tinción de safranina muestra que en los constructos, si hay presencia de proteoglucanos, además las características de matriz, de las células, y la tinción se asemeja con el cartílago articular normal. Este método de evaluación utilizado es muy útil, pues permite a nivel microscópico que se conozcan las características del neo tejido.

Se hizo énfasis en lo que refiere al diseño realizado de los primers para agrecano de caballos porque, en la base de datos del banco de secuencias del laboratorio europeo de biología molecular (EMBL) solo se tiene identificado un pequeño fragmento de la proteína central del agrecano, y resulto exitoso al ser sintetizados y probados en RNA proveniente de cartílago de caballos, pues los diseños anteriores con los que contaba el laboratorio de ingeniería de tejidos–INR no habían funcionado, esto determino un gran avance en el laboratorio para la continuidad de esta investigación y las que vengan en el futuro.

Los resultados de PCR convencional, no muestran diferencias entre las expresiones de Agrecano, Colágena II, la expresión de Sox9 durante las etapas que se evaluaron del cultivo, lo importante de conocer esto, es que los condrocitos no pierden la expresión de estos marcadores, y si hay diferencia significativa en la expresión de Colágena I, por lo que se puede concluir de manera cualitativa que en el cultivo en pellet los condrocitos no modificaron su fenotipo.

Los resultados de la RT-PCR también fueron alentadores porque coinciden con los resultados encontrados en la PCR convencional, evaluados por el método de cuantificación relativa o curva relativa estándar, se encontró que los niveles de expresión de agrecano, colágena tipo II, y Sox9 se mantienen estables durante las

diferentes etapas evaluadas en el cultivo en pellet y se encontró colágena tipo I solo a los 30 días posteriores al cultivo pero sin la disminución de los otros marcadores; en el cultivo en monocapa se expresaron también agregano, colágena tipo II, y Sox9 pero la expresión de colágena tipo I se expresó en todas las etapas evaluadas es bien sabido que esto sucede, es por esto que los investigadores como Eyrich (2007) Hannouche (2007) y Yang (2006) solo utilizan este método de cultivo para expandir el número de células, para posteriormente, elaborar un constructo.

Una de las ventajas de la aplicación de esta técnica es que no se requieren gran cantidad de RNA aislado y que detecta los cambios en la expresión aún siendo una muestra muy pequeña (Pfaffl 2001), en este trabajo no se tuvieron limitantes sobre la cantidad de muestra para la extracción de RNA por el origen de las muestras. Clements (2006) utilizó un algoritmo determinado en otro trabajo para la selección de las muestras de mRNA para evitar que se afectara su ensayo, en este caso se utilizaron todas las muestras obtenidas, por que no se tenían referencias acerca de cómo determinar la calidad, sin embargo la ventaja que ofreció el espectrofotómetro es que indicaba si en la muestra se encontraban restos de proteína o DNA, descartando así la contaminación del RNA.

Para la hibridación *in situ* fluorescente fue necesario utilizar dos técnicas diferentes, basado en las técnicas de Darby (2000) y Wilkinson (1999) se estandarizó una técnica para utilizarse en el cartílago normal embebido en parafina, el plan original era que posteriormente se embebiera a los constructos como otros autores como Yang (2006) y se siguiera la misma metodología que en el tejido, pero el pellet al ser incluido en parafina, presentó inestabilidad, se encontraron diversos obstáculos para llevarla a cabo de la misma forma, porque se rompía en el momento de la inclusión, se resolvió pero entonces se desprendió del portaobjetos, en el momento de desparafinar, en este paso se probaron varias técnicas, hasta que se logró conservarlo después de este paso, sin embargo este corte se desprendió cuando se llevo a cabo la digestión, por lo que se desarrollo

una técnica, basada en la técnica hibridación *in situ* fluorescente “whole mount” con algunas modificaciones para adaptarlo al pellet, esto permitió después de mucho tiempo conocer visualmente, la expresión de los marcadores para cartílago, el más importante fue el agrecano que se expresó en la mayoría de las células del pellet la cual coincide con los resultados encontrados en la PCR y RT-PCR. De igual forma se encontró la expresión de Colágena tipo II, su distribución fue más reducida y de igual modo coincide con los resultados de los ensayos de PCR y RT-PCR. La expresión para colágena tipo I no fue encontrada en el cartílago normal, así como tampoco en el pellet, resultados consistentes con el de PCR y RT-PCR. Esta técnica utilizada para la evaluación de los pellets, es un gran avance, pues no se han reportado más casos como este, su utilidad radica en evaluar un constructo que si vaya a ser implantado.

Las técnicas utilizadas en el análisis son de gran utilidad para evaluar constructos antes de su implantación, además que el cultivo en pellet, conserva características del cartílago normal, sin embargo su inestabilidad sugiere que como técnica de cultivo para los implantes, es necesario el uso de andamios.

Es muy importante que el agrecano, la colágena tipo II y el Sox9 como marcadores de cartílago, se encuentren en los condrocitos que están bajo estudio, pero durante esta investigación, a través de la literatura se conocieron otras estructuras moleculares, de gran importancia en el cartílago, que complementarían el avance en la investigación particular del laboratorio de ingeniería de tejidos-INR.

CONCLUSIONES

1. Los condrocitos cultivados en pellet conservan su fenotipo normal condrocítico y mantienen los niveles de expresión de agrecano, colágena tipo II y Sox9.
2. Para obtener un pellet estable, se requiere de una base.

3. Los condrocitos cultivados en monocapa, expresan colágena tipo II, aunque no conservan su fenotipo normal condrocítico.
4. La expresión de agregcano, no se pierde durante el cultivo en monocapa.
5. La evaluación histológica con tinción safranina, es básica para la evaluación de constructos.
6. La evaluación por medio de PCR convencional es muy útil, pero si se cuenta con un rotor para realizar un PCR en tiempo real se debe tomar esta elección, ya que el modo convencional es cualitativo.
7. La RT-PCR es el mejor método de detección de la expresión de mRNA en tejido y en condrocitos.
8. La Hibridación *in situ* fluorescente debe ser realizada de forma rutinaria, en la evaluación de constructos antes de la implantación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Altaman SA, Randers lisa, Rao Govind, Comparision of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations, *Biotechnol* 1993 9: 671-674
- 2 Adams CS, Shapiro IM, The fate of the terminally differentiated chondrocyte: evidence for microenviromental regulation of chondrocyte apoptosis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2002 13(6): 465-473
- 3 Adarmes H, Aracena L, Galleguillos M, González E., Efecto de la edad sobre el tamaño de los proteoglicanos del cartílago articular equino, *Arch Med Vet*, 2006 38 (3):239-245.
- 4 Aigner T, Gickert K, Von del Mark K. Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 3: 183-9
- 5 Akens MK, Hurtig MB, Influence of species and anatomical location on chondrocyte expansion. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2005 6:23
- 6 Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M. Roberts K., Walter P., *Molecular Biology of the Cell* 4th edition. Garland Science, USA 2002, 1090-1125
- 7 Allan KS, Pilliar RM, Wang J, Grynblas MD, Kandel RA., Formation of biphasic constructs containing cartilage with a calcified zone interface. *Tissue Engineering* 2007 13(1):167-77.
- 8 Archer CW, Francis P, The chondrocyte in cells in focus, *International Journal of biochemistry & cell biology* 2003 35:401-404
- 9 Barnewitz D, Evers A, Zimmermann J, Wilke I, Kaps C, Sittlinger M. Tissue engineering: new treatment of cartilage alterations in degenerative joint diseases in horses, preliminary results of a long term study. *Berl. Münch. Tierärztl Wochenschr* 2003 116: 157-161
- 10 Barry FP, Murphy JM, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 36:568-84.
- 11 Barzilla J, *Histology and Immunohistochemistry* 2005. Disponible en línea en:

<http://www-bioc.rice.edu/bios576/immuno/immuno.html#stain>

- 12 Bernier SM, Yamada Y, Modulation of annexin V during chondrocytic differentiation *in vitro*, Annals New York academy of sciences 1998 : 212-214
- 13 Berthiaume F, Yarmush ML, Tissue Engineering in The biomedical Engineering Handbook, second edition , CRC press LLC, USA 2000, 109 1-11
- 14 Bi W, Min J, Zhang Z, Behringer R, De Crombrughe, Sox 9 is required for cartilage formation. Nature Genetics 1999 22:85-89
- 15 Biology Laboratory Web Site , disponible en línea en:
<http://io.uwinnipeg.ca/~simmons/15lb4p5.htm>
- 16 Bonifazi E, Gullota F, Vallo L, Iraci R, Nardone A, Brunetti E, Botta A, Novelli G, Use of RNA fluorescent *in situ* hybridization in the prenatal molecular diagnosis of myotonic dystrophy type I, Clinical Chemistry 2006 52 (2): 319-322
- 17 Boyan BD, Wong KL, Wang L, Yao H, Guldborg RE, Drab M, Jo H, Schwartz Z, Regulation of growth plate chondrocytes by 1,25-dihydroxyvitamin d(3) requires caveolae and caveolin-1, Steroids 1999 64 (1-2): 129-136
- 18 Brommer H, Brama PAJ, Barneveld A, Weeren PR, Differences in the topographical distribution of articular cartilage degeneration between metacarpo and metatarsophalangeal joints. Equine Veterinary Journal 2004 36(6): 506-510
- 19 Brommer H, Van Weeren PR, Brama PAJ, Barneveld A, Quantification and age-related distribution of articular cartilage degeneration in the equine fetlock joint, Equine Veterinary Journal 2003 35 (7): 697-701.
- 20 Cancedda R, Donzin B, Giannoni P, Quarto R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. Matrix biology 2003; 22(1) 81-91.
- 21 Capitan A Guarnido, Rodríguez EV, Albaladejo JM, Torregrosa C, Díaz JA Manzano, Pérez-Mateos J, C Sprekelsen Gassó Auto injerto subcutáneo de cartílago neosintetizado utilizando el polímero Ethisorb® en conejos. Acta Otorrinolaringol Esp 2002; 53:631-636

- 22 Chen Q, Johnson D, Haudenschild DR, Goetinck PF, Annals New York academy of sciences 1998 :238-240
- 23 Chin B H, Chao T, Hin LE, Directing Stem Cell differentiation into the Chondrogenic Lineage In Vitro, Stem Cells Ed. Alpha Med Press 2004 22:1152-1167.
- 24 Chomczynski, P. and Sacchi N, Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Analytical Biochemistry 1987 162: 156-159.
- 25 Clark AG, Rohrbaugh AL, Otterness I, Kraus VB, The effects of ascorbic acid on cartilage metabolism in guinea pigs articular cartilage explants, Matrix Biology 2002 21(2): 175-184
- 26 Clegg PD, Redmond CM, Hardingham TE, Alteration of chondrocyte degradative phenotype in normal and pathological equine articular cartilage, Osteoarthritis and Cartilage 2005 13 S1: S59-S60
- 27 Clements DN, Carter SD, Innes JF, Ollier WER, Day PJR, analysis of normal and osteoarthritic cartilage mRNA expression by quantitative polymerase chain reaction, Arthritis Research and Therapy 2006 8 (6):1-9
- 28 Cohn DH, Briggs MD, King LM, Rimoin DL, Wilcox WR, Lachman RS, Knowlton RG, Mutations in cartilage oligomeric matrix protein (COMP) gene in pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia Annals New York academy of sciences 1998 : 188-194
- 29 Darby I A, *In situ* hybridization Protocols, in Methods in Molecular Biology, Volume 123, Humana Press, USA 2000
- 30 Davis JM, Basic Cell Culture technique and the maintenance of cell lines In: Basic Cell Culture: A practical approach. Irl Press USA 1994, 124-134
- 31 De Crombrugge B, Lefebvre V, Behringer R, Bi W, Murakami S, Huang W, Transcriptional mechanisms of chondrocyte. Matrix Biology 2000 19 (5): 389-394
- 32 Dorak MT, Glossary of real time PCR terms, in Real Time PCR, Taylor and Francis group, UK 2006

- 33 Dudhia J., Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage, *Cell Mol Life Sci*, 2005; 62:2241-56.
- 34 Encabo, A., Mirabet, V., Sepúlveda, P., Carbonell, F., Miñana, M. Optimización de las condiciones de cultivo de las células mesenquimales de médula ósea para uso en traumatología, *Patología del aparato locomotor*, 2005 3 (2):132-143.
- 35 Evans CH, Rosier RN, Molecular biology in orthopaedics: the advent of molecular orthopaedics. *J Bone Joint Surg Am* 2005 87(11):2550-64.
- 36 Eyrich D, Wiese H, Maier G, Skodacek D, Appel B, Sarhan H, Tessmar J, Staudenmaier R, Wenzel MM, Goepferich A, Blunk T., In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds. *Tissue Engineering* 2007 13(9):2207-18.
- 37 F San Román, Tejidos de sostén: Cartilaginoso y óseo. Citología e histología vegetal y animal: biología de las células y tejidos animales y vegetales. 2^a ed. Madrid; México: McGraw-Hill Interamericana, 1997
- 38 Farjanel J, Sève S, Borel A Sommer P, Hulmes DJS, Inhibition of lysyl oxidase activity can delay phenotypic modulation of chondrocytes in two dimensional culture. *Osteoarthritis and Cartilage* 2005 13(2):120-128
- 39 Freshney RI, Culture of animal cells, a manual of basic technique, second edition Ed. Wiley Liss USA 1987
- 40 Frías S, Ordaz G, Blanco B, Molina B, Castillo V, Carnevale A, Detección de aneuploidías por hibridación *in situ* en células de mucosa oral, *Rev Invest Clin* 1996 48:355-360
- 41 Fujimoto T, Hagiwara H, Aoki T, Kogo H Nomura R, Review Caveolae: from a morphological point of view, *Journal of Electron Microscopy* 1998 47 (5) 451-460
- 42 Fukada K, Shibata S, Susuki S, Ohya K, Kuroda T, *In situ* hybridization study of type I, II, X collagens and aggrecan mRNAs in the developing condylar cartilage of fetal mouse mandible, *J Anat* 1999 195:321-329

- 43 Garciadiego D, Rosales C, Katoh M, Chimal J, Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by $\alpha 5\beta 1$ integrin in the developing appendicular skeleton. *Development* 2004 131: 4735-4742
- 44 Goldring MB, Berenbaum F, The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide, *Clin Orthop Relat Res.* 2004 S427: S37-46.
- 45 Goldring MB, Molecular regulation of the chondrocyte phenotype, *Journal Musculoskel Neuron Interact* 2002 2(6):517-520
- 46 Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K , The control of chondrogenesis, *J Cell Biochem.* 2006 97(1):33-44.
- 47 Goldring MB, Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases, *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006 20(5):1003-25
- 48 Goldring MB. Culture of immortalized chondrocytes and their use as models of chondrocyte function, *Methods Mol Med.* 2004 100: 37-52
- 49 Grogan SP, Barbero A, Winkelmann V, Rieser F, Fitzsimmons JS, O'driscoll S, Martin I, Mainil VP, Visual histological grading system for evaluation of *in vitro* generated neocartilage, *Tissue engineering* 2006 12 (8): 2141-2149
- 50 Gu Z, Feng J, Shibata T, Hu J Zhang Z, Type II collagen and aggrecan mRNA expression by *in situ* hybridization in rabbit temporomandibular joint posterior attachment following disc displacement, *Archives of oral biology* 2003 48 (1):55-62
- 51 Guilak F et al. The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis cartilage*, 1999; 7: 59-70.
- 52 Hall AC, Bush PG, Davison MEB, Kempson SA, Equine articular cartilage chondrocytes: opening the black box *Equine Veterinary Journal* 2003 35 (5): 425-428
- 53 Hall BK, Miyake T, All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays* 2000 22: 138-147
- 54 Hangody L, Füles P, Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment

- of full thickness defects of weight Bearing joints, *Osteoarthritis and Cartilage* 2002 10 (6): 432-463
- 55 Hannouche D, Terai H, Fuchs JR, Terada S, Zand S, Nasser BA, Petite H, Sedel L, Vacanti JP, Engineering of implantable cartilaginous structures from bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Tissue Engineering*, 2007 13(1):87-99.
- 56 Helgason CD, Miller CL, Basic cell culture protocols in: *Molecular Biology, Ed humana Press USA* 2005
- 57 Hendrickson DA, Nixon AJ, Grande DA, Todhunter RJ, Minor RM, Erb H, Lust G, Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects. *Journal of orthopaedic research* 1994 12(4): 485-497
- 58 Heinegård D, Saxne T, Molecular markers of processes in cartilage in joint disease, *Br J Rheumatol* 1991 30 suppl 1: 21-24
- 59 Hipp J, Atala A, Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. *Journal of experimental and clinical assisted reproduction* 2004 1:3
- 60 Hirschmann F Verhoeyent E Wirth D Bauwens S Hauser H and Rudent M Vital Marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein *Osteoarthritis and Cartilage* , *Journal of the Osteo Arthritis research Society international* 2001 <http://www.idealibrary.com>.
- 61 Horas U, Pelinkovic D, Herr G Aigner T, Schenettler R, Autologous Chondrocyte Implantation and Osteochondral Cylinder Transplantation in cartilage repair of the knee joint a prospective , comparative trial, *The Journal of bone and joint surgery* 2003 85: 185-192
- 62 Horton W, Progress in human chondrodysplasias: Molecular genetics, *Annals New York academy of sciences* 1998: 150-159
- 63 Huang W, Zhou X, Lefebvre V, De Crombrughe, Phosphorylation of Sox9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances Sox9 ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer 2000
- 64 Hunt M, Real time PCR, disponible en línea en

<http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>

- 65 Hunziker E Articular Cartilage repair : basic science and clinical progress A review of the current status and prospects, *Osteoarthritis and cartilage* 2002 10 (6): 432-463
- 66 Kofron, Laurencin, Gene therapy in orthopaedics. *Current gene therapy* 2005 5 (1):49-58
- 67 Kolettas E, Buluwela L, Bayliss MT, Muir H, Expression of cartilage-specific molecules is retained on long-term culture of human articular chondrocytes. *Journal of cell Science* 1995 108:1991-1995
- 68 Kolettas E, Muir HI, Barret JC, Hardingham TE, Chondrocyte phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox9 transcription factor, *Rheumatology* 2001 40: 1146-1156
- 69 Kollettas E, Muir H, Barret J, HardinghamT, Chondrocyte phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor. *Rheumatology* 2001 40:1146-1156
- 70 Kuon W, Kuhne M, Busch DH, Atagunduz P, Seipel M, Wu P, Morawietz L, Fernahl G, Appel H, Weiss EH, Krenn V, Sieper J., Identification of novel human aggrecan T cell epitopes in HLA-B27 transgenic mice associated with spondyloarthropathy. *J Immunol* 2004 173:4859-66.
- 71 Langer R, Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc xppla. Res* 2000 33:94-101.
- 72 Langer R. and Vacanti J.P. Tissue engineering, *Science* 1993 260: 920–926.
- 73 Lima E, Mauck RL, Han SH, Park s, Ng KW, Ateshian GA, Hung CT, Functional tissue engineering of chondral and osteochondral constructs, *Biorheology* 2004 41: 577-590
- 74 Litzke LE, Wagner E, Baumgaertner W, Hetzel U, Josimovic-Alasevic O, Libera J. Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Annals of biomedical Engineering*

2004 32 (1):57-69.

- 75 Livak KJ, Schmittgen TD, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 2001 25:402-8.
- 76 Lohmander LS, Tissue engineering of cartilage and bone, Novartis foundation 2005
- 77 Lombardero GG, Evaluación por resonancia magnética, artroscopía e histología de defectos condrales en caballos, reparado mediante técnicas de ingeniería de tejidos. (tesis de maestría) Ciudad de México (Distrito Federal) México. UNAM 2005.
- 78 Loren K, Swedish Cartilage Regeneration, 2002. Disponible en línea en: www.chelationtherapyonline.com/articles/p179.htm
- 79 Lumelsky NL, commentary: Engineering of tissue healing and regeneration, *Tissue Engineering* 2007 13 (7): 1-6
- 80 Mallein GF, Kosher RA, Upholt WB, Tanzer ML, Temporal and spatial analysis of cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb development by *in situ* hybridization. *Developmental Biology* 1988 126 (2):337-45
- 81 Mankin HJ, Mow VC, Bukwalter JA, Lannotti JP, Ratcliffe A, Form and Function of articular Cartilage In: *Orthopaedic Basic Science*. American academy of orthopaedic Surgeons. USA 2001
- 82 Martín HC, Estudio mecánico, histológico e histomorfométrico del regenerado de cartílago a partir de injertos de periostio invertido. (tesis doctorado) Barcelona UAB 2002
- 83 Masri M, Ibarra C, Lombardero G, Paasch L, Situacion Actual de la reparación condral en el equino. *Veterinaria México* 2006; 37(3) 369 – 378
- 84 McIlwraith CW, Nixon AJ. Joint resurfacing: attempts at repairing articular cartilage defects. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996: 317-334.

- 85 Montgomery R, et al. Bioquímica: casos y texto. Traducción de Biochemistry. A case-oriented approach Madrid; Harcourt Brace Mexico 1998: 228-240
- 86 Murray R K, Glucoproteínas en Bioquímica Ilustrada. 7ª Edición El Manual Moderno México 2003: 575-595
- 87 Murray R K, Keeley FW, La matriz extracelular en Bioquímica Ilustrada. 7ª Edición. El Manual Moderno México 2003: 597-617
- 88 Nerem RM., Tissue engineering: the hope, the hype, and the future. Tissue Engineering 2006 12 (5):1143-50.
- 89 Nixon, AJ, Osteochondrosis and Osteochondritis Dissecans of the Equine Fetlock In: Lameness in equine practice. The compendium collection USA 1993 1-36
- 90 Okayama M, Pacifici M, Holtzer H., Differences among sulfated proteoglycans synthesized in nonchondrogenic cells, presumptive chondroblasts, and chondroblasts, Proc Natl Acad Sci 1976 73 (9):3224-8
- 91 Olsen BR, Role of cartilage collagens in formation of the skeleton, Annals New York academy of sciences 1998 :124-130
- 92 Parry HD, Alphey L, *In situ* hybridization in DNA Cloning : a practical approach core techniques 2da ed.
- 93 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 29(9): e45
- 94 Platt D, Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition, In McIlwraith CW, Trotter GW, editors. Joint disease in the horse. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996; 29-40
- 95 Rees SG, Curtis CL, Dent C M, Caterson B, Catabolism of aggrecan proteoglycan aggregate components in short-term explants cultures of tendon, Matrix Biology 2005 24 (3): 219-231
- 96 Rees SG, Curtis CL, Dent CM, Caterson B., Catabolism of aggrecan proteoglycan aggregate components in short-term explants cultures of tendon. Matrix Biology 2005 24:219-31.

- 97 Reinharth GU, Hörman K, Riedel F, Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (review), International Journal of Molecular Medicine 2004 13: 505-513
- 98 Rice MA, Dodson BT, Arthur JA, Anset KS, Cell based therapies and tissue engineering, Otolaryngol Clin N Am. 2005 38: 199-214
- 99 Robert S, McCall IW, Darby AJ, et al, Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology, Arthritis Res Ther 2003 5:60-73.
- 100 Rodríguez JI, Tejidos de sostén: Cartilaginoso y óseo, en: Paniagua GA et al, Citología, España 1998.
- 101 Ross JS, Sheehan CE, Fletcher JA, HER-2/ neu Oncogene amplification determined by fluorescent *in situ* hybridization in Methods in molecular medicine vol 49 : Molecular pathology protocols, Ed. Humana press USA
- 102 Ruiz S, Cultivo primario para el estudio de la función osteoblástica. (tesis doctorado) Barcelona UAB 2005
- 103 Saraf A, Mikos A. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. Advanced drug delivery reviews 2006 58 (4):592-603 review
- 104 Schultz O, Sittinger M, Haeupl T, Burmester GR. Emerging strategies of bone and joint repair. Arthritis Research 2000 2: 433-436.
- 105 Semevolos SA, Nixon AJ, Brower-Toland BD., Changes in molecular expression of aggrecan and collagen types I, II, and X, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor-beta1 in articular cartilage obtained from horses with naturally acquired osteochondrosis. Am J Vet Res 2001 62 (7):1088-94.
- 106 Sheldon S, Fluorescent *in situ* hybridization, evaluation for ploidy and gene amplification in: Methods in molecular medicine vol 49: Molecular pathology protocols. Ed. Humana Press USA
- 107 Skiöldebrand E, Studies of articular cartilage macromolecules in the equine middle carpal joint, in joint pathology and training. (tesis doctorado) Uppsala SUAS 2004

- 108 Smith GD, Knutsen G, Richardson JB, A clinical review of cartilage repair techniques. *Journal of Bone and Joint Surgery British Volume*. 2005 87-B (4): 455-449.
- 109 Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Ming DJ, Behringer R, Lefebvre V, the transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Developmental Cell* 2001 1 (2) 277-290
- 110 Spector M, Joints: Regeneration of bone, cartilage, meniscus, ligament, and tendon, Harvard medical school disponible en linea en:
http://www.core.org.cn/CN_NR/rdonlyres/Biological-Engineering-Division / BE-441Fall2003/6AD04FBE-8D79-46E7-94BB-59C7E414E45C /0/118_ch18 _specs.pdf
- 111 Stashak TS, Anatomía funcional de los órganos locomotores del caballo. En: *Claudicación en el caballo*. 5ta ed. Argentina: Ed Intermédica, 2004: 13-15
- 112 Suzuki I, Motokawa T, *In situ* hybridization: an informative technique for pigment cell researchers, *Pigment Cell Res* 2004 17:10-14
- 113 Takahashi T, Ogasa T, Asawa Y, Mori Y, Uchinuma E, Takato T, Hoshi K, Three-dimensional microenvironments retain chondrocyte phenotypes during proliferation culture. *Tissue Engineering* 2007 13(7): 1583-1592
- 114 Todhunter RJ, Anatomy and Physiology of Synovial Joints. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. *Joint disease in the horse*. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1996:1-28
- 115 Torun KG, Korkusuz F, Öskul A, et al Tissue engineered cartilage on collagen and PHBV matrices. *Biotechnology Research Unit* 2005.
- 116 Tuli R, Li WJ, Tuan RS., Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003 5 (5):235-8.
- 117 Uematsu K, Hatton K, Ishimoto Y, Yamauchi J, et al , Cartilage regeneration using mesenchymal stem cells an a tree dimensional poli-lactic-glycolic acid (PLGA) scaffold. *Tissue Engineering Research Center* 2004.
- 118 Vacanti JP, Langer R, Tissue engineering: the design and fabrication of living replacements devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*

1999 354 suppl 1: 32-34.

- 119 Van Der Rest M, Mayne R Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross- linked to type II collagen. *J Biol Chem* 1998 263 1615-1618
- 120 Warford A, Lauder I, In situ hybridization in perspective, *J Clin Pathol* 1991 44:177-181
- 121 Wilkins RJ, Fairfax TPA, Davies ME, Muzyamba MC, Gibson JS, Homeostasis of intracellular Ca²⁺ in equine chondrocytes: response to hypotonic shock. *Equine Veterinary Journal* 2003 35(2) 439-443
- 122 Wilkinson DG, *In situ hybridization a practical approach* second edition, Oxford University Press USA 1999
- 123 Wiseman M, Henson F, Lee DA, Bader DL, Dynamic compressive strain inhibits nitric oxide synthesis by equine chondrocytes isolated from different areas of the cartilage surface. *Equine Veterinary Journal* 2003 35 (5): 451-456
- 124 Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP, Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification, *Bio Techniques* 1997 22:130-138.
- 125 Wollheim, F., Early stages of osteoarthritis: the search for sensitive predictors, *Annals of the Rheumatic Diseases* 2003 62:1031–1032.
- 126 Yang KG, Saris DB, Geuze RE, Helm YJ, Rijen MH, Verbout AJ, Dhert WJ, Creemers LB., Impact of expansion and redifferentiation conditions on chondrogenic capacity of cultured chondrocytes, *Tissue Engineering* 2006 12 (9):2435-47.
- 127 Yeh LC, Lee JC, Identification of an osteogenic protein-1 responsive element in the aggrecan promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2004 323:223-8.
- 128 Zárata B, Reyes A, Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Ciruj* 2006 74(3): 217-222.
- 129 Zijun Zhang, J Mitchel McCaffery, Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultra structural analysis in comparison with cartilage explants. *J. Anat* 2004 205: 229-237.

130 Zwingmann J, Mehlhorn AT, Südkamp N, Stark B, Dauner M, Schmal H.,
Chondrogenic differentiation of human articular chondrocytes differs in
biodegradable PGA/PLA scaffolds, Tissue Engineering 2007 13(9):2335-43.

IX. ANEXOS

Lista de Abreviaturas

AA	Acido ascórbico
PBS	Solución Fosfato Buferada
SFB	Suero Fetal Bovino
GTA	Glutaraldehido
PFA	Paraformaldehido
DEPC	Dietil PiroCarbonato
DMEM	Medio Dubelco's Eagle Modificado
PBT	PBS + Tween 20
TA	Temperature ambiente
DMSO	Dimetil sulfoxido
FISH	Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente
MOP's	Acido 3-(N-Morfolino)-propanesulfonico
TESPA	3 aminopropil trietoxisilano

LISTA DE REACTIVOS

Reactivo	Marca	Catálogo
DMEM alta glucosa	Gibco Life Technologies	10565-018
PBS	Biosource	P315-600
SFB	Gibco Life Technologies	26140-111
Acido Ascórbico	Research Organics	10061
Colagenasa II	Whothington	4177
Penicilina estreptomicina	Gibco Life Technologies	15140-122
Trizol	Invitrogen	15596-026
Etanol	Sigma	E7023
Cloroformo	Sigma	C2432
Isoamil alcohol	Sigma	I9392
Agarosa	Invitrogen	15510-027
Buffer TAE	Bio Rad	161-0743
Buffer TBE	Bio Rad	167-0741
MOP's	Roche	1112468400
Bromuro de etidio	Invitrogen	15585-011
Formaldehido	Merk	K279111103
Glicerol	Sigma	G5516
Azul Bromofenol	Sigma	34725-61-6
Cianol xileno	Sigma	2650-17-1
LB Broth base	Invitrogen	12780-052
LB Agar	Invitrogen	22700-025
IPTG	Invitrogen	15529-019
X-Gal	Invitrogen	15520-034
Hidroxido de Sodio	Hycel de Mexico	40780
tRNA	Roche	10109517001
Anhidro acetico	Sigma	A6404

Dietil pirocarbonato	Sigma	D5758
Acido Etilendiamino tetra acético	Sigma	E9884
Formamida	Invitrogen	15515-026
Glicina	Promega	H5073
Heparina	Sigma	H4784
Paraformaldehído	Sigma	P6148
Parafina Paraplast	Sigma	P3808
Proteinasa K	Promega	B302B
Tris HCl	USB	22676
CaCl	JT Baker	1313
Acetato de Sodio	Sigma	127-09-3
Sulfato dodecil Sódico	Promega	H5113
Trietanolamina	Sigma	T1377
Trimetoximetilsilano	Sigma	M6420
Tween-20	Research Organics	9691T
H ₂ O ₂ 30 %	Merk	K29240510-134
TESPA	Sigma	015K0589

LISTA DE KITS

Kit	Nombre	Marca	Catálogo
RT	1 st Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (AMV)	Roche	11483188001
PCR	PCR core kit	Promega	1578553
RT-PCR	SYBR Green ER qPCR Super Mix Universal	Invitrogen	11762-100
Clonación	Max efficiency DH5 α Competent cells	Invitrogen	18258-012
FISH	FISH Tag RNA Multicolor kit	Invitrogen	F32956

LISTA DE EQUIPOS

Equipo	Marca	Laboratorio
Campana de Flujo	Thermo Electron Corp.	Ingeniería de Tejidos
Incubadora	Nuaire/Thermo	Ingeniería de Tejidos
Centrífuga	Eppendorf	Ingeniería de Tejidos
Centrífuga refrigerada	Eppendorf	Ingeniería de Tejidos
Centrífuga mini Spin	Eppendorf	Ingeniería de Tejidos
Termociclador	Eppendorf	Ingeniería de Tejidos
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc	Ingeniería de Tejidos
Termociclador Rotor gene	Corbett	Biomedicina Molecular
Termociclador Palm Cycler	Corbett	Biomedicina Molecular
Microtomo	Thermo Electron Corp	Microscopía electrónica
Desecador al vacío	Bel Art	Microscopía electrónica
Thermomixer	Eppendorf	Ingeniería de Tejidos
Horno de hibridación	Amersham Pharmacia Biotech	Ingeniería de Tejidos
Agitador magnético	Daigger	Ingeniería de Tejidos
Autoclave	Tommy high pressure steam sterilizer ES315	Ingeniería de Tejidos
Microscopio	Carl Zeiss LSM Meta 100	Biomedicina Molecular