



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD Y DE LA PRODUCCION
ANIMAL.**

**EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE CÉLULAS
PLURIPOTENCIALES MESENQUIMALES DE EQUINO EN UN
POLÍMERO BIODEGRADABLE.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS.

P R E S E N T A :

ABRAHAM PINEDA ARANDA.

TUTOR PRINCIPAL: MARÍA MASRI DABA.

**COMITÉ TUTORAL: JOSÉ CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN.
SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE.**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres y a toda mi familia por el apoyo y esfuerzo empleado en la realización de esta meta.

Al gran amor de mi vida Selina por el apoyo, la comprensión y la tolerancia en los momentos más difíciles.

A la Dra. María Masri por el apoyo brindado en este trabajo.

A cada uno de los compañeros del laboratorio de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación y a los compañeros de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. María Masri Daba por brindarme la oportunidad de alcanzar esta meta profesional, por el apoyo y conocimientos compartidos.

A mis padres por el apoyo y esfuerzo realizado durante este reto profesional.

Al amor de mi vida por apoyarme y darme las fuerzas necesarias para continuar aun en los momentos más difíciles.

A los Dres. Rafael López y Wilfrido Ramírez por ser piezas fundamentales para alcanzar este logro académico y que sin su ayuda no estaría en esta situación.

A todo el personal y las personas que de alguna forma se encuentran en el laboratorio de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa del instituto nacional de rehabilitación.

A cada uno de los miembros de mi comité tutorial y de mí jurado por el apoyo y el tiempo empleado en la revisión de este trabajo.

A Zaira García y Gabriel Luna de CINVESTAV- Querétaro por los polímeros sintetizados para la realización de este estudio.

A Pilar de la Rosa y Roberto Juárez por el apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Cristina Velasquillo por la asesoría en el desarrollo de este trabajo

“Evaluación Morfológica de Células Pluripotenciales Mesenquimales en un Polímero Biodegradable.”

RESUMEN.

La enfermedad articular es la causa más importante de retiro temprano de los caballos atletas y una de las pérdidas económicas de más impacto en la industria equina. En la actualidad hay diversas alternativas de tratamiento, sin embargo los resultados son variables. Actualmente las células troncales mesenquimales han recibido atención al ser una fuente potencial para ser utilizadas con la ingeniería de tejidos y ser una alternativa de tratamiento. El propósito de este estudio fue caracterizar las células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea de equino y diferenciarlas hacia condrocitos para futuras aplicaciones terapéuticas.

Las células cultivadas presentaron características morfológicas correspondientes a células troncales, tienen la capacidad de proliferar y fueron positivas a CD90, CD117, CD166 y CD73, negativas a CD34, CD45 y CD14, además de que expresaron marcadores moleculares NANO-G y Sox 2. Después de colocar un medio de inducción condral las células fueron positivas a la tinción con safranina O y azul alciano. Además de que expresaron colágena tipo II y agregano.

Las células fueron capaces de adherirse al polímero a base de colágena tipo I y III además fueron viables después de 15 días en cultivo. Fueron capaces de expresar colágena tipo II.

PALABRAS CLAVES: CÉLULAS TRONCALES, OSTEOARTRITIS, CARTILAGO, EQUINO.

ABSTRACT.

The joint disease is the leading cause of quander in horses athletes, and one of the economic losses of more impact on the equine industry, currently there are various treatment options but the results are highly variable. Currently mesenchymal stem cells have received attention as a potential source for use in tissue engineering and as a treatment alternative.

The purpose of this study was to characterize mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and differentiate into chondrocytes for future therapeutic applications.

The cultured cells showed morphological characteristics related to stem cells, have the capacity to proliferate and were positive for CD90, CD117, CD166 and CD73, negative CD34, CD45 and CD14, in addition expressed molecular markers such as Sox 2 and NANO-G. Furthermore express collagen type II and agreecan proteins. After placing the induction media chondral cells were positive for safranin O and alcian blue staining.

The cells were capable of adhering onto the polymer of collagen type I and III, and kept viable after 15 days of culture.

KEY WORDS: STEM CELLS, OSTEOARTHRITIS, CARTILAGE, EQUINE.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISION DE LA LITERATURA.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	19
OBJETIVOS.....	20
HIPOTESIS.....	21
MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
RESULTADOS.....	28
DISCUSIÓN.....	31
CONCLUSIONES.....	34
LITERATURA CITADA.....	35
IMÁGENES Y CUADROS.....	43
ANEXOS.....	56

LISTA DE CUADROS.

CUADRO 1.- Factores relacionados con la condrogénesis.

CUADRO2.- Biomateriales utilizados para cultivo de cartílago.

CUADRO 3.- Prueba de hidrofiliidad de polímero de quitosán con ácido hialurónico.

CUADRO 4.- Prueba de hidrofiliidad de polímero de quitosán con resomer.

CUADRO5.- Prueba de hidrofiliidad de polímero de colágena tipo I y III.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.- Moléculas involucradas en la degradación de cartílago articular.

FIGURA 2.- Proceso para la separación de las células mononucleares.

FIGURA 3.- Fotografías de las células en cultivo.

FIGURA 4.- Curva de proliferación de las células.

FIGURA 5.- Histogramas de la citometría de flujo.

FIGURA 6.- Gel de electroforesis

FIGURA 7.- Fotografía de células con tinciones.

FIGURA 8.- Gel de electroforesis.

FIGURA 9.- Fotografía de polímero bajo pruebas de hidrofiliidad.

FIGURA 10.- Fotografía de microscopia electrónica.

FIGURA 11.- Fotografías de microscopia de fluorescencia.

FIGURA 12.- Fotografías con microscopio invertido.

FIGURA 13.- Gel de electroforesis.

INTRODUCCIÓN.

Las lesiones del cartílago articular que no afectan a la integridad del hueso subcondral no se reparan espontáneamente. El carácter asintomático de estas lesiones propicia la progresiva degeneración articular y el desarrollo de un proceso artrósico (Fuentes *et al.*, 2007, Zapata N *et al.*, 2007, Grunder *et al.*, 2004).

Las lesiones del cartílago articular continúan siendo un reto para la medicina moderna, ya que en el adulto el cartílago tiene escasa capacidad de reparación espontánea y predisponen a la aparición temprana de osteoartritis. La enfermedad articular es la causa más importante de desecho en los caballos atletas y una de las pérdidas económicas de más impacto en la industria equina (Masri *et al.*, 2006); sin embargo esta patología no solo afecta a los animales, en el humano es una patología que causa un dolor crónico y puede llegar a provocar incapacidad funcional. En Estados Unidos se reporta que cerca de 46.4 millones de personas padecen osteoartritis (Helmick *et al.*, 2008). En Canadá se espera que los pacientes con osteoartritis pase de 2.9 millones en 1991 a 6.5 millones en 2031. En el 2000 en el Reino Unido se gastaron cerca de 405 millones de libras en cirugías para tratar problemas de osteoartritis (Lin Z *et al.*, 2007).

La osteoartritis no solo impacta negativamente a los caballos, también afecta a los cerca de 4.6 millones de personas asociados a la industria equina. En 2009 Oke mencionó que la American Horse Council reportó que la industria equina produce cerca de \$38.3 billones y tiene un impacto total de cerca de \$100 billones en la economía de los Estados Unidos.

Por esta razón, es importante generar estrategias que permitan la reparación de las lesiones del cartílago y evitar el progreso de la enfermedad articular, para la cual existen numerosos tratamientos, tanto médicos como quirúrgicos. Se han propuesto diversas técnicas quirúrgicas que incluyen: el

lavado artroscópico o la estimulación del hueso subcondral y técnicas de regeneración como los aloinjertos osteocondrales, el injerto osteocondral autólogo, la implantación de condrocitos autólogos cultivados (Mendieta *et al.*, 2005).

Sin embargo los resultados son muy variables y el tejido formado muchas veces es diferente en estructura y composición al tejido normal, por eso recientemente se han realizado varios estudios que sugieren que la encapsulación de condrocitos en diferentes biomateriales mantiene el fenotipo cartilaginoso *in vitro* por periodos más largos. Éstos permiten la generación de una matriz extracelular compuesta por fibras de colágeno tipo II y agregano, lo que hace de este tejido un sustituto más funcional de cartílago, con ciertas similitudes al encontrado *in vivo* (Zapata N *et al.*, 2007; Saas *et al.*, 2004; Grunder *et al.*, 2004; Almqvist *et al.*, 2003 Masuda *et al.*, 2001).

El implante de células con capacidad condrogénica o el acceso a la médula ósea son modalidades de terapia celular para reparar lesiones del cartílago articular. El objetivo final no es sólo “cicatrizarse” el defecto condral (reparación), sino generar un tejido de nueva formación con una estructura, una composición bioquímica y un comportamiento funcional iguales a los del cartílago articular nativo (regeneración) (Fuentes *et al.*, 2007).

El propósito de este estudio fue caracterizar a las Células Pluripotenciales Mesenquimales (CPM) obtenidas de medula ósea de equinos a partir de aspirados a nivel de hueso esternal, dichas células fueron caracterizadas por medio de citometría de flujo en busca de un fenotipo característico de células indiferenciadas y negativas a marcadores de células hematopoyéticas, además de que se analizó la expresión de marcadores “stemness” SOX2 y NANO-G por medio de RT-PCR. Una vez caracterizadas, las células se les colocó un medio de inducción condral a base de Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β) y Proteína Morfogénica Ósea tipo 2 (BMP2) además de insulina y ácido ascórbico durante 7, 14 y 21 días subsecuentemente se realizaron pruebas histoquímicas

tales como safranina-o y azul alciano para la detección de proteoglicanos. Para confirmar la diferenciación se realizó RT-PCR en busca de expresión de Colágena tipo II y agregano.

Una vez realizada la diferenciación las células fueron sembradas en diferentes polímeros a base de quitosán y colágena para determinar en qué polímero las células podían sobrevivir, adherirse y mantener el fenotipo condral, el polímero con mejores resultados fue el polímero en base de colágena tipo I y III.

REVISIÓN DE LITERATURA.

La integridad del cartílago es esencial para la adecuada función articular, con frecuencia resulta lesionado por traumatismos o por condiciones de degeneración que pueden ocasionar osteoartritis; esto es particularmente frecuente en articulaciones sometidas a carga tanto en equinos como en humanos.

CARTILAGO ARTICULAR.

Es un tejido de color blanquecino brillante, es avascular y aneural, de tipo hialino. Su unidad funcional son los condrocitos los cuales sólo son cerca del 2% del total del tejido, además está compuesto por una matriz extracelular (MEC) compuesta de agua en un 75%, fibras de colágena en un 15% y proteoglicanos en un 10% (Flores E. *et al.*, 2008, Zapata N *et al.*, 2007, Goodrich R. *et al.*, 2006, Masri M., 2006, McIlwraith C., 1982). Los condrocitos son células que sintetizan la MEC, proceso regulado por diversos factores de crecimiento (**cuadro 1**). Esta matriz les permite almacenar agua gracias a que los proteoglicanos presentan carga negativa con lo cual atraen cationes de sodio (Na⁺) y por ende, moléculas de agua, hidratando la matriz del cartílago hasta en un 80% (Zapata N *et al.*, 2007), además de que producen colágena tipo II que presenta una estructura de triple hélice y le confiere una gran capacidad de flexión y extensión, sin embargo también se encuentran fibras de colágena tipo VI, IX, XI, XII y XIV (Angulo J. 1999, McIlwraith, C.1982).

Estructuralmente presenta diferentes arreglos, a nivel microscópico se divide en tres zonas no mineralizadas y una mineralizada. La zona superficial donde hay una capa acelular la cual presenta gran contenido de proteoglicanos, por debajo de ésta hay otra capa con una alta densidad de condrocitos que son relativamente pequeños y alargados casi no hay proteoglicanos y las fibras de

colágena se encuentran posicionadas de manera paralela lo que impide el paso de grandes moléculas y células inflamatorias hacia los condrocitos. La zona de transición se caracteriza por presentar células alargadas y redondas, las fibras no presentan un arreglo especial y el contenido de glicosaminoglicanos es alto. En la zona profunda las células son más largas, las fibras de colágena se arreglan de manera perpendicular y el contenido de agua es bajo. En la zona calcificada es la más profunda y separa al cartílago hialino del hueso subcondral (Flores 2008, Masri 2006, Goodrich 2006, Angulo 1999, McIlwraith C. 1982).

PROTEOGLICANOS

Son cadenas de glicosaminoglicanos que son disacáridos aniónicos que se repiten y que tienen una hexosa, primordialmente son; N-acetil glucosamina o N-acetil galactosamina, casi siempre están sulfatados y se encuentran unidos a una proteína central que pueden ser agrecano (el más abundante) o decorina, son los encargados de mantener el agua dentro de la MEC, además las cadenas forman enlaces con las fibras de colágeno dando la capacidad de absorción de impactos. Los principales glicosaminoglicanos son: condroitin sulfato, dermatán sulfato y el queratán sulfato éstos se encuentran unidos al agrecano. El ácido hialurónico es el único proteoglicano que no está sulfatado (Flores E. 2008, Zapata N *et al.*, 2007, Goodrich R. 2006, Masri M. 2006, Angulo J. 1999, Adarmes H, 1993 McIlwraith C.1982). Estas cadenas además forman enlaces electrostáticos con el colágeno, de esta forma, la sustancia básica y las fibras de la matriz forman una estructura molecular cruzada resistente a las fuerzas de tensión (Hall *et al.*, 1996).

Sin embargo se ha comprobado que el dermatán sulfato y algunos proteoglicanos son antiadhesivos lo cual limita la capacidad de reparación del cartílago en la superficie de la lesión. También se ha establecido que el líquido sinovial tiene propiedades que inhiben la proliferación de los condrocitos *in vitro* (Masri M. *et al.*, 2006).

LÍQUIDO SINOVIAL.

Es un dializado de plasma con importantes proteínas como ácido hialurónico y lubricina las cuales actúan como lubricantes. Es un líquido claro, muy viscoso y de pH ligeramente alcalino. El líquido sinovial nutre al cartílago articular, a los discos adyacentes y a la lubricación de las superficies de la articulación. Las células dentro del líquido sinovial son importantes para la fagocitosis, con lo que se eliminan microorganismos y detritos de la articulación (Masri M. 2006, Goodrich R. 2006, McIlwraith C.1982).

FISIOPATOLOGIA DE LA OSTEOARTRITIS.

Los componentes mencionados son los principales involucrados en el proceso de osteoartritis, debido a varias causas tales como trauma, osteocondrosis o degeneración; cuando el proceso inflamatorio comienza en la membrana sinovial, cartílago, cápsula articular o hueso subcondral, inicia una cascada de mediadores inflamatorios causando un “efecto dominó” liberando metabolitos del ácido araquidónico en la membrana celular, tales como prostaglandinas específicamente la E y la I 2 (PGE_2 y PGI_2) (**Figura 1**).

Además algunos factores de crecimiento, citocinas y moléculas de señalización intracelular liberadas por el cartílago contribuyen a este proceso. Es conocido que la expresión de interleucina-1(IL-1) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) están aumentados en la osteoartritis. Se ha visto que la IL-1 estimula la producción de las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP's) proteasas de serina, colagenasa y plasminógeno activador de tejidos que degradan los componentes de la matriz extracelular del cartílago, además de que favorecen la producción de Prostaglandina E2 e inhiben la producción de los Inhibidores tisulares de la metaloproteinasas 1 y 2 (TIMP-1 y TIMP-2) (Zhen L *et al.*, 2006, Adarmes H. 2006, Goodrich R. *et al.*, 2006, McIlwraith W. 1982).

Clínicamente, las lesiones del tejido cartilaginoso se deben a defectos generalizados o a defectos focales. Los primeros afectan todo el tejido y se deben ante todo a la osteoartritis; los segundos comprometen una pequeña porción y se deben a trauma en las articulaciones (Zapata N *et al.*, 2007, Toegel *et al.*, 2007, Grunder *et al.*, 2004).

La integridad del cartílago articular se mantiene mediante la liberación regulada de hormonas, factores de crecimiento y citocinas (**cuadro 1**) producidas por los condrocitos, que a su vez regulan la división celular, la síntesis y la degradación de la matriz extracelular condrogénica. Cuando el cartílago se lesiona, pierde el equilibrio proporcionado por los factores presentes en el tejido (Zapata N *et al.*, 2007, Martin *et al.*, 2005, Buckwalter 1998).

Después de una lesión, el cartílago articular tiene una capacidad muy limitada de autoregeneración, ya que no es irrigado por vasos sanguíneos ni linfáticos (Zapata N *et al.*, 2007, Ibarra C. *et al.*, 2007, Masri *et al.*, 2006, Martín *et al.*, 2004, Bryant y Anseth 2001).

En la industria equina las claudicaciones debido a lesiones articulares son la causa más prevalente de disminución en la función atlética y desecho de los caballos (Pieter 2007, Goodrich R. 2006, Masri M. *et al.*, 2006). Se ha calculado que el 60% de las claudicaciones de los caballos de uso deportivo están relacionadas con osteoartritis (Masri M. *et al.*, 2006).

Las lesiones articulares son comunes en los caballos de uso deportivo, se tratan convencionalmente con anti-inflamatorios no esteroideos (AINE's) con el fin de detener el proceso inflamatorio, en casos severos los tratamientos son prolongados y de alto costo. Además estos tratamientos solo disminuyen la probabilidad de aumento de la lesión, sin embargo no tienen ningún efecto para reparar el cartílago dañado, por lo cual se requieren nuevos procedimientos para abordar el problema en forma más adecuada.

TERAPIAS PARA LA REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR.

En 1950 Haggart *et al.*, abordaron el tratamiento de la osteoartritis sintomática de la rodilla mediante la resección quirúrgica del cartílago fragmentado y los osteofitos, los pacientes tuvieron una mejoría clínica (Masri M *et al.*, 2006).

Las prótesis, por lo general, eliminan el dolor y restablecen en forma parcial la funcionalidad, pero su durabilidad es limitada (Zapata N *et al.*, 2007, Risbud *et al.*, 2001; Temenoff 2000).

En 1986, Lanny Johnson describió el uso de una fresa motorizada para realizar la “artroplastia por abrasión” que consistía en remover la capa más superficial y esclerótica del hueso subcondral para estimular el sangrado hacia el defecto experimental y, de esta forma, conseguir la formación de fibrocartílago en la zona de lesión (Masri M. *et al.*, 2006, Angulo J. 1999).

La técnica de microfractura consiste en romper algunos vasos intra-óseos, e inducir la formación de un coágulo de fibrina, sin embargo este coagulo forma un tejido tipo fibrocartílago, lo cual no representa una condrogénesis verdadera (Masri 2006). Los resultados de Steadman (2003) con la técnica de microfracturas, acompañada de un protocolo de rehabilitación conservador logró disminuir los síntomas y mejorar la función en el 95% de los pacientes tras un seguimiento medio de 11 años en humanos.

La mosaicoplastia consiste en la obtención de cilindros autólogos de hueso con cubierta de cartílago hialino de zonas de no carga articular, para ser implantados en defectos osteocondrales que se localicen en zonas de carga articular (Masri M. 2006, Gómez R. 2005, Hangody *et al.*, 2003).

Sin embargo, el tejido de reparación es histológicamente diferente al cartílago articular, por lo que la reparación es defectuosa, al formarse un tejido fibrocartilaginoso. Se ha descrito en diferentes estudios que el fibrocartílago tiene propiedades biomecánicas inferiores a las del cartílago articular. Más aún, es frecuente que el nuevo tejido de reparación no se integre a la zona adyacente de cartílago normal, debido a las propiedades antiadhesivas de la MEC del cartílago (Ibarra *et al.*, 2007; Masri *et al.*, 2006, Mendieta R. 2005, Gómez R. 2005, Steadman J. 2003, Hangody L. 2003, Angulo J. 1999).

Las limitaciones de estas técnicas han inducido el desarrollo de otros procedimientos para mejorar los resultados, como el uso de implante de condrocitos autólogos, terapia génica y el trasplante de células madre mesenquimales.

La técnica de implante de condrocitos autólogos consiste en aislar enzimáticamente condrocitos articulares sanos, los cuales son expandidos por medio de cultivo en monocapa y luego reinsertados en el sitio del defecto debajo del periostio. Las principales limitantes de esta técnica son el mecanismo de fijación del injerto y la confiabilidad de los métodos utilizados para evaluar la funcionalidad de los implantes *in vivo* (Zapata *et al.*, 2007; Fuentes *et al.*, 2007; Masri *et al.*, 2006; Martin J. 2005).

La introducción de productos génicos en el ámbito del daño tisular puede favorecer el proceso de restauración del cartílago articular. Este proceso implica determinar los genes y las células adecuadas para la transferencia génica (condrocitos, células condrogénicas y células de la membrana sinovial) usando diferentes vectores para incorporar los cDNA. Distintos factores anabólicos (miembros de la superfamilia de TGF- β , IGF-1 y FGF) pueden inducir condrogénesis y síntesis de los componentes de la membrana extracelular, en

tanto que las moléculas antiinflamatorias (IL-4, IL- 10, IL-1Ra, TNFsR) pueden actuar como inhibidores de la degradación del cartílago (Fuentes *et al.*, 2007).

Las células troncales (pluripotenciales) mesenquimales (CPM) pueden diferenciarse *in vitro* en una gran variedad de tipos celulares, como adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Así, las CPM constituyen una herramienta potencial para reparar tejidos eludiendo problemas relacionados con el rechazo inmunitario y el conflicto ético por usar células madre embrionarias. Todavía hay dudas sobre la utilización de CPM para tratar lesiones condrales, en gran medida porque no se conoce con suficiente detalle las etapas de diferenciación condrogénica de estas células y no se dispone de protocolos que garanticen la diferenciación hacia el fenotipo deseado (Fuentes *et al.*, 2007; Masri *et al.*, 2006).

INGENIERIA DE TEJIDOS

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 que restauren, mantengan o mejoren las funciones de un tejido específico (Flores E. 2008; Zapata *et al.*, 2007; Masri *et al.*, 2006; Langer y Vacanti 1993).

El principio de la ingeniería de tejidos se basa en el cultivo y la expansión de células sembradas en estructuras o andamios tridimensionales biocompatibles y biodegradables que, con o sin la ayuda de factores de crecimiento, dan lugar a la formación de tejido nuevo para reparar o regenerar la estructura o función de tejidos lesionados o ausentes (Ibarra *et al.*, 2007).

El implante de tejido cartilaginoso generado *in vitro*, comparado con los procedimientos mencionados previamente permite una mejor fijación y una recuperación más eficiente de la actividad de la articulación. Para generar *in vitro*

tejido cartilaginoso uniforme a partir de células, es necesario primero identificar una fuente apropiada de células y, segundo, definir los factores bioactivos requeridos para estas células, las características de las matrices de cultivo tridimensionales en las que las células se cultivan y la estimulación física que deben tener para facilitar el desarrollo y la maduración del cartílago en un ambiente controlado (Zapata *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2000).

FUENTES CELULARES.

Los condrocitos articulares maduros tienen una capacidad de proliferación limitada y el número de divisiones *in vitro* disminuye conforme se incrementa la edad del paciente. Además, al crecer en una sola capa, los condrocitos pierden su fenotipo condral y en ocasiones también su capacidad de rediferenciación (capacidad de regresar a su fenotipo original), por lo que se ha propuesto el uso de factores de crecimiento y estructuras tridimensionales para mantener o activar la rediferenciación (Ibarra *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2007).

Una alternativa al uso de condrocitos diferenciados es el uso de células madre. Estas tienen mayor capacidad de proliferación, mejor respuesta a los factores de crecimiento y potencial de diferenciarse en diversos tipos de células especializadas (Martin *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2004).

En la década de 1970 diversos investigadores comenzaron a realizar estudios de células simples de la médula ósea y observaron que estas células podían generar todos los tipos de células hematopoyéticas *in vivo* dando lugar a las células que hoy conocemos como células troncales (Pearce *et al.*, 2007).

Las células troncales mesenquimales son un tipo de células que se encuentran en la médula ósea y se caracterizan por ser indiferenciadas y ante determinadas señales se pueden especializar para realizar una función concreta,

una de las ventajas de utilizar estas células es que a pesar de ser menos del 0.001% de las células nucleadas, éstas se pueden multiplicar a grandes números *in vitro* (Ibarra *et al.*, 2007).

Las células troncales mesenquimales (CPM), son células progenitoras no hematopoyéticas encontradas en varios tejidos adultos, son caracterizadas por su fácil aislamiento y rápido crecimiento *in vitro*, pueden mantener el potencial de diferenciación el cual es mantenido por factores de transcripción tales como Sox 2, NANO-G y Oct 4, tienen la capacidad de dividirse (autorreplicarse) y bajo las condiciones apropiadas o señales correctas del microambiente pueden dar origen (diferenciarse) a diferentes linajes con características y funciones especializadas (Rodríguez-Pardo 2005). Además presentan la expresión de varios marcadores fenotípicos específicos que reflejan la presencia o ausencia de antígenos característicos de esas células. Se ha demostrado que las CPM se caracterizan por expresar marcadores positivos para CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD117, CD166 y STRO-1 y negativos para CD11a, CD11b, CD14, CD33, CD34, CD28 y CD45 (Anzaldúa *et al.*, 2007, Baksh D. *et al.*, 2004, Minguell José *et al.*, 2001); también se considera como característica de célula troncal la capacidad de adherencia de las células a las superficies de cultivo y una morfología semejante a los fibroblastos. Estas propiedades hacen a las células un candidato ideal para ser utilizadas con la ingeniería de tejidos para generar tejidos de reemplazo y reparar lesiones (Chen *et al.*, 2008).

La diferenciación de estas células hacia cartílago puede ser obtenida *in vitro* modificando las condiciones de los cultivos mediante el uso de factores de crecimiento durante su multiplicación, los mejores candidatos que proveen las señales para inducir la condrogénesis son los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β 1) (Ibarra *et al.*, 2007; Roman *et al.*, 2007).

La activación transcripcional de SOX9 (SRY-type high mobility group box 9) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) son necesarias para la diferenciación condrogénica. El TGF- β es un miembro de la superfamilia de factores con varios procesos celulares tales como diferenciación, proliferación y apoptosis. A nivel embrionario el TGF β es importante para estimular a las células troncales mesenquimales y diferenciarlas hacia cartílago (Watabe *et al.*, 2009).

Uno de los mecanismos de estimulación requiere la presencia de proteínas SMAD, SMAD2 y SMAD3 son fosforilados por el receptor de TGF- β 1 (TGF- β R1) y forman un complejo heteromérico asociándose con SMAD4, este complejo se transloca al núcleo y regula la expresión de genes blanco a través de la unión directa a elementos de unión a SMAD en secuencia de DNA. La actividad de unión al DNA es dependiente de dominios de homología Mad hairpin 1 (MH1) de SMAD3 y SMAD4. No obstante el MH2 de SMAD3 ha sido reportada que se asocia con varios factores de transcripción tales como Runx2 y MyoD actuando como factores de transcripción críticos para miogénesis. En adición MH2 de SMAD2 y SMAD3 interactúa con una proteína de unión a proteínas de unión a elementos que responden a cAMP (CBP) y su paralogo p300, el cual tiene actividad de acetiltransferasa en histonas (Furumatsu *et al.*, 2005).

SOX9 codifica para varios grupos de dominios de unión a DNA y ha sido identificado como un factor de transcripción crítico para la diferenciación condral, la expresión de colágena tipo II el mayor componente de la matriz extracelular condral está regulada por SOX9 dada por la unión de SOX9 al gen *Col2a1*, SMAD3 estimula primero la condrogénesis y modula la asociación entre SOX9 y p300. SOX9 específicamente se une al intrón de *Col2a1* y regula la transcripción.

TGF- β también estimula la vía de MAPK durante la condrogénesis. Así MAPK estimula la expresión de *Col2a1* y *Sox9* y estas dos vías son importantes para la

expresión del gen de agregano el mayor proteoglicano en el cartílago (Palmer et al., 2005).

BIOMATERIALES.

Las matrices de sostén o andamios juegan un papel muy importante en la ingeniería de tejidos como un soporte físico y también como un substrato adhesivo ya que permite la adhesión de las células, promueven el crecimiento celular y la retención de la diferenciación funcional de las células (Ibarra *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2007; Pearce *et al.*, 2007; Tateishi *et al.*, 2006).

Las características necesarias para estas matrices son: a) ser reproducible; b) ser tridimensional; c) tener una estructura porosa que permita la adhesión celular; e) degradarse homogéneamente y f) ser biocompatibles (Ibarra *et al.*, 2007).

Se han estudiado diferentes tipos de materiales tanto biológicos como sintéticos, sin embargo los compuestos biológicos pueden llegar a tener ligeros procesos inflamatorios o reacciones de rechazo, mientras que en los compuestos sintéticos probablemente pueda controlarse con mayor facilidad el tiempo de degradación (Ibarra *et al.*, 2007).

Dentro de los polímeros biológicos se encuentran geles y esponjas de colágeno, pegamentos de fibrina, hialuronatos, alginato, agarosa y óxido de polietileno. Entre los materiales sintéticos más utilizados se encuentran el ácido poliglicólico (PGA), el ácido poliláctico (PLA) y sus copolímeros (PGLA), la polidioxanona (PDS) y otros hidrogeles termopolimerizables y fotopolimerizables (**Cuadro 2**).

Uno de los obstáculos para la ingeniería del tejido cartilaginoso ha sido el desarrollo de una matriz de cultivo tridimensional que tenga las propiedades

mecánicas que se requieran, tales como la capacidad para enfrentar los grandes esfuerzos de contacto y las tensiones de una articulación.

QUITOSÁN

Un biopolímero de creciente interés para la ingeniería de tejidos es el quitosán, el segundo polímero más abundante en la Tierra, el cual puede ser encontrado en grandes cantidades en el esqueleto de crustáceos, insectos y en la pared celular de algunos hongos. El quitosán es un polisacárido consistente de enlaces β (1-4) de glucosaminas con un número variable de grupos N-acetilglucosamina (Fabela et al., 2009, Yong et al., 2008, Xuebing et al., 2000, Hirano 1999).

Las tendencias actuales en la investigación biomédica han demostrado que los materiales naturales tienen una mejor biocompatibilidad. Estudios con el quitosán han demostrado una baja citotoxicidad y excelentes propiedades de biodegradabilidad. Adicionalmente, la estructura del quitosán es muy similar a los glicosaminoglicanos, heparina, condroitin sulfato y ácido hialurónico (Chin *et al.*, 2009, Young *et al.*, 2009).

El creciente uso del quitosán se debe a ciertas propiedades que posee tales como su capacidad para formar estructuras porosas lo que favorece que numerosos tipos celulares puedan ser sedimentados en la superficie y puedan migrar hacia el interior. Asimismo su naturaleza catiónica genera interacciones electrostáticas con glicosaminoglicanos aniónicos y proteoglicanos distribuidos ampliamente en el cuerpo, esta propiedad es una de las más importantes para la ingeniería de tejidos debido al gran número de citocinas y factores de crecimiento que se unen o modulan a los glicosaminoglicanos (Yong *et al.*, 2008).

Recientemente se ha utilizado al quitosán como base de polímeros, de nanoesferas y de hidrogeles. Se han desarrollado nanopartículas con base en

quitosán para diferentes aplicaciones biomédicas. Ha sido utilizado para la fabricación de cementos con aplicación odontológica, para la regeneración de membrana timpánica por medio de parches a base de quitosán y en la fabricación de injertos para la reparación ósea (Young *et al.*, 2009, Demitri *et al.*, 2009, Mi-Kyong *et al.*, 2009).

La similitud estructural del quitosán con varios glucosaminoglicanos encontrados en el cartílago articular lo hace un material ideal para la ingeniería de tejidos cartilaginoso, el quitosán también ha sido conjugado con hialuronanos para obtener matrices biomiméticas para los condrocitos (Yong *et al.*, 2008).

En 2007 la Sociedad Internacional de Reparación de Cartílago (ICRS) evaluó algunos materiales de quitosán y glicerol en el tratamiento de reparación cartilaginosa y se observó que los implantes favorecían la formación de hueso intermembranoso (Fabela 2009).

Sá-Lima *et al.*, en 2009 desarrolló un hidrogel inyectable a base de quitosán para la reparación de lesiones articulares usando células estromales derivadas de grasa. Guillaume *et al.*, 2009 comparó la proliferación y la condrogenesis de células troncales mesenquimales en redes de quitosán y en esponjas de quitosán demostrando que no hubo diferencia en la adhesión celular, sin embargo la condrogenesis estuvo aumentada en las redes en comparación a las esponjas.

Recientemente Zarate-Triviño *et al.*, 2009 desarrollaron un hidrogel híbrido natural-sintético con base en Quitosán-g-glicidilmetacrilato-xantana el cual fue utilizado para comprobar la viabilidad celular de diferentes linajes tales como neuronas de corteza cerebral, células de sistema nervioso entérico y condrocitos de humano, demostraron que el material mantiene la morfología y viabilidad celular. Sin embargo el material se volvía demasiado friable, por lo cual le adicionaron glutaraldehído y realizaron las mismas pruebas con las mismas líneas

celulares y demostraron que este nuevo material mantenía la morfología, viabilidad y consistencia del material.

Dicho lo anterior, se considera al quitosán como una alternativa para ser empleado como matriz de sostén, sin embargo con el fin de determinar si este nuevo material para implantes cumple con los requerimientos de biocompatibilidad y seguridad, se deben realizar rigurosos estudios *in vitro* e *in vivo* ya que los resultados obtenidos *in vitro* no se pueden extrapolar de manera directa a una situación *in vivo*.

COLÁGENA.

La colágena es el mayor componente del tejido conectivo de los mamíferos, se ha calculado que el 30% de toda la proteína del cuerpo es colágena, existen 14 tipos de colágena siendo la más abundante la colágena tipo I (Vacanti *et al.*, 2007).

Una de las ventajas del uso de la colágena como matriz para las células es que las enzimas celulares la reconocen y puede ser remodelada y degradada para permitir suficiente espacio para el tejido en crecimiento (Lombardero 2009).

La colágena tipo I ha sido ampliamente usada como una fuente para andamio con bajo potencial antigénico. La colágena tipo I ha sido el andamio mas estudiado y su uso ha sido exitoso. Es extraída de la piel, huesos o tendones de los bovinos, cerdos (Ikada 2006).

Los condrocitos pueden retener su fenotipo y su actividad celular cuando son cultivados en andamios de colágena. Tales resultados sugieren que la colágena puede servir como soporte para regeneración tisular (Langer *et al.*, 2007).

En un estudio llevado a cabo por Lombardero en el 2009 usando condrocitos autólogos para la reparación de lesiones condrales en equino asume que la colágena usada influye de manera positiva en la regeneración.

JUSTIFICACIÓN.

Las células troncales mesenquimales obtenidas de aspirados de médula ósea en equinos adultos pueden ser obtenidas de una manera práctica y mínimamente invasiva con los animales sedados de pie, evitando de esta manera posibles complicaciones secundarias a un muestreo en caballos anestesiados.

Las CPM constituyen una herramienta potencial para reparar tejidos eludiendo problemas relacionados con el rechazo inmunitario y el conflicto ético por usar células madre embrionarias.

La diferenciación de estas células hacia cartílago puede ser obtenida *in vitro* modificando las condiciones de los cultivos mediante el uso de factores de crecimiento durante su multiplicación, los mejores candidatos que pueden proveer las señalizaciones para inducir la condrogénesis son los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (TGF β 1).

Las propiedades funcionales de un sustituto de cartílago obtenido por medio de la ingeniería de tejidos dependen en gran parte de la selección del biomaterial apropiado para la construcción de una matriz de sostén tridimensional y uno de los grandes obstáculos para la ingeniería del tejido cartilaginoso ha sido el desarrollo de una matriz de cultivo tridimensional que tenga las propiedades mecánicas que se requieren, tales como la capacidad para enfrentar los grandes esfuerzos de contacto y las tensiones de una articulación.

OBJETIVOS

Objetivo general

Utilizar Células Pluripotenciales Mesenquimales (CPM) obtenidas de médula ósea de equinos para cultivarlas, expandirlas y diferenciarlas *in vitro* para ser sembradas en un polímero biodegradable para evaluar morfología y bioquímica de las células.

Objetivos específicos

Caracterizar las CPM de médula ósea.

Determinar la diferenciación de las CPM hacia condrocitos.

Evaluar el comportamiento celular en diferentes polímeros.

Determinar la viabilidad celular en el polímero biodegradable.

HIPÓTESIS

El uso de células troncales mesenquimales obtenidas de medula ósea de equinos sembradas en un polímero biodegradable tendrá características morfológicas y moleculares similares al cartílago normal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento y cultivo: las células troncales fueron obtenidas de aspirados de médula ósea de ocho caballos machos con un rango de edad de 3-5 años. Los caballos fueron sedados de pie con xilacina (Fort Dodge, México 1.1 mg/Kg) y butorfanol (Fort Dodge, México 0.01mg/kg), se rasuró el área del esternón y se realizó el procedimiento de embrocado de la zona, se infiltró a nivel subcutáneo un analgésico local (lidocaína al 2% Pisa, México) y con aguja de aspirado de médula ósea (Rosenthal, Texas, EUA, Kendall) se procedió a realizar el aspirado con jeringa la cual contenía heparina de sodio a una concentración de 1000 UI/ml (Fortier *et al.*, 1998), este aspirado fue llevado al laboratorio de la unidad de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación en condiciones de refrigeración. En el laboratorio las muestras fueron procesadas en una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA), primero se hizo una dilución de la muestra de médula ósea con solución salina fosfatada buferada (PBS) [Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA], posteriormente se colocaron en Ficoll Paque™ (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) y se centrifugaron a 1500 RPM por 30 minutos, se separaron y se lavaron las células con PBS. Una porción de la muestra se resuspendió en medio de cultivo DMEM F12 (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA) con 10% de Suero Fetal Bovino y 1% de antibióticos y antimicóticos (gentamicina y anfotericina B) y fueron sembradas en cajas de cultivo T75 (Becton Dickinson) por un lapso de 15 días a 37°C y mantenidas en una atmósfera de 5% de CO₂, el medio de cultivo fue renovado cada dos días.

Análisis por Citometría de Flujo: una vez separadas las células del Ficoll y lavadas con PBS una porción de aproximadamente 250, 000 células de médula ósea fueron colocadas en tubos de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson) con 10µl de la suspensión de anticuerpos y se dejó incubar por 30 minutos a 4°C, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti CD34, CD45, CD90, CD117, CD73, CD166 y CD14 (BD, Pharmigen™), debido a que no hay anticuerpos específicos

contra caballos se utilizaron anticuerpos dirigidos contra los marcadores de humano buscando la presencia de una reacción cruzada. Los datos fueron analizados por el software Cell Quest PRO™ (Becton Dickinson) con una media de 75, 000 eventos.

RT-PCR: Se extrajo el RNA de células al momento del muestreo, al pase 1, al pase 2 (resembrado de las células), además de condrocitos y de células que estuvieron con medio de inducción condral, se utilizó TRIzol Reagent™ siguiendo las instrucciones del producto, posteriormente se cuantificó el RNA con ayuda de un espectrofotómetro. Se generó un cDNA utilizando el kit de RT-FIRST STRAND cDNA SYNTHESIS (Roche) y posteriormente fue amplificado por el kit de VENT DNA POLYMERASE (New England Biolabs).

Para los fragmentos de Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (*Equus caballus*) se utilizaron las siguientes secuencias de iniciadores:

PRIMER UP: 5'GCCATCACCATCTTCCAG^{3'}

PRIMER DOWN: 5'TCACGCCCATCACAAACA^{3'}

TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO: 54°C 20 segundos por 35 ciclos.

PRODUCTO ESPERADO: 190 pares de bases

Para los fragmentos de SOX2 (*Equus caballus*) se utilizaron las siguientes secuencias de iniciadores:

PRIMER UP: 5'TGGTTACCTCTTCCTCCCAC^{3'}

PRIMER DOWN: 5'GGGCAGTGTGCCGTTAAT^{3'}

TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO: 54°C 20 segundos por 40 ciclos.

PRODUCTO ESPERADO: 181 pares de bases.

Para los fragmentos de NANO-G (*Equus caballus*) se utilizaron las siguientes secuencias de iniciadores:

PRIMER UP: 5'TACCTCAGCCTCCAGCAGAT^{3'}

PRIMER DOWN: 5'CATTGGTTTTTCTGCCACCT^{3'}

TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO: 47°C 20 segundos por 40 ciclos.

PRODUCTO ESPERADO: 119 pares de bases.

Para los fragmentos de Colágena tipo II (*Equus caballus*) se utilizaron las siguientes secuencias de iniciadores:

PRIMER UP: 5'CCGAGGTGACAAAGGAGAAG^{3'}

PRIMER DOWN: 5'CAACAACCAGATCGAAGAGCA^{3'}

TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO:

PRODUCTO ESPERADO: 454 pares de bases.

Para los fragmentos de Agrecano (*Equus caballus*) se utilizaron las siguientes secuencias de iniciadores:

PRIMER UP: 5'AGTCACACCTGAGCATC^{3'}

PRIMER DOWN: 5'TCTTCAACAGCCCGACCAA^{3'}

TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO: 63°C 20 segundos 35 ciclos.

PRODUCTO ESPERADO: 174 pares de base.

PROLIFERACIÓN CELULAR: para determinar si las células mantienen la capacidad de proliferar se realizaron conteos celulares con azul tripano el cual es un compuesto hidrofílico que se utiliza para determinar la viabilidad celular ya que por sus propiedades fisicoquímicas, penetra en las células muertas dando una tonalidad de morado distinta al blanco que reflejan las células vivas por no dejar entrar el colorante (**ANEXO 1**). Este conteo se realizó al momento del muestreo y

en cada uno de los pases (resembrado de las células) así como al momento del sembrado en los polímeros

INDUCCIÓN CONDRA: para generar un estímulo condral se adicionó al medio de cultivo sustancias relacionadas con el proceso de condrogénesis tales como TGF- β (100ng/ml) y BMP-2 (100ng/ml) además de insulina y ácido ascórbico. Se realizaron pruebas a los 7, 14 y 21 días.

POLÍMEROS: se usaron los siguientes polímeros

1. Quitosán con ácido hialurónico.
2. Quitosán con resomer.
3. Colágena tipo I y colágena tipo III.

SEMBRADO EN POLÍMEROS: una vez determinado el mejor momento de diferenciación las células fueron tripsinizadas (**ANEXO 2**) y sembradas en una proporción de 5×10^4 por cm^2 .

PRUEBAS DE VIABILIDAD CELULAR: Para determinar que las células colocadas en los polímeros estaban vivas se utilizó el kit de live/dead (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA) el cual está hecho a base de calceína y hemodímero de etidio (EthD-1) los cuales emiten fluorescencia de dos tipos que permite la evaluación simultánea de células vivas y muertas con marcadores que miden la actividad de estearasa intracelular y la integridad de la membrana plasmática. Para la evaluación se utilizó un microscopio invertido con filtros de 485 ± 10 nm (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, New York).

PRUEBAS DE HIDROFILICIDAD EN POLÍMEROS: para determinar el grado de absorción de los polímeros se realizaron pruebas de hidrofiliidad (hinchamiento) con la finalidad de determinar el momento de mayor absorción de líquidos y así poder evaluar su comportamiento ya que algunos polímero pierden

estructura durante estas pruebas y dado que el medio articular es acuoso es importante verificar que los polímeros mantengan su estructura. Para esto se midieron los polímeros y se pesaron en seco y posteriormente se colocaron en solución de fosfato buferada (PBS) y cada cierto tiempo se midieron y pesaron y con la siguiente fórmula se determinó el porcentaje de hinchamiento:

$$\% \text{ de hinchamiento} = \frac{\text{Peso final} - \text{Peso inicial}}{\text{Peso inicial}}$$

Tinciones de safranina-O:

1. Eliminar el medio de cultivo.
2. Fijar las células con etanol al 96% por 30 segundos.
3. Lavar con agua destilada más PBS al 1x por 30 segundos.
4. Hematoxilina de Weigert por un minuto.
5. Lavar con agua destilada varias veces hasta que salga limpia.
6. Verde rápido por 30 segundos.
7. Ácido acético al 1% por 30 segundos.
8. Lavar con PBS y observar al microscopio.
9. Safranina-O por 5 minutos.
10. Lavar con PBS y ver al microscopio.
11. Fijar las células con glicerina/gelatina [1/1].

Tinciones de azul alciano:

1. Fijador Khale por 20 minutos.
2. Azul alciano toda la noche a temperatura ambiente.
3. Ácido Clorhídrico 0.1 N por 5 minutos.
4. Glicerol 50% por 30 minutos.
5. Glicerol 75% por 30 minutos.
6. Glicerol 100% se almacena 4°C.

Tinciones de hematoxilina & eosina en cultivo con polímero.

1. Fijar en paraformaldehído (PFA) al 1% a temperatura ambiente.
2. Incubar a 4°C por 20 minutos,
3. Aspirar PFA.
4. Agregar PBS 1x por 2 minutos a temperatura ambiente.
5. Aspirar PBS.
6. Agregar PBS y guardar a 4°C.
7. Aspirar PBS.
8. Agregar agua bidestilada.
9. Hematoxilina de Harris por 8 minutos.
10. Lavar hasta que el agua salga limpia.
11. Carbonato de litio.
12. Enjuagar con agua.
13. Eosina acuosa al 0.5% dejar 1 minuto.
14. Lavar con agua hasta que salga limpia.
15. Fijar en gelatina/glicerol.

RESULTADOS

Se obtuvo aspirados de médula ósea del esternón de los caballos, este aspirado fue llevado al laboratorio de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación en donde se separaron las células por centrifugación en Ficoll (**Figura 2**) una vez obtenidas dichas células se procedió a evaluar las características que deben de poseer las células troncales.

Como primera característica evaluamos la morfología de las células las cuales al momento de sembrado eran células redondeadas (**Figura 3a**) después de 15 días de cultivo las células cambiaron su morfología a una tipo fibroblastoide la cual se mantuvo en cada uno de los pases de las células (**Figura 3b**).

Como segunda característica las células deben de tener la capacidad de autorenovarse (multiplicarse) para evaluar dicha capacidad se realizaron pruebas de proliferación lo cual permitió obtener una curva de proliferación (**Figura 4**) en la cual observamos que dichas células si tienen dicha cualidad. Como promedio el número de células al momento del muestreo fue de $5 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^4$, después de 15 días de cultivo (primer pase) obtuvimos en promedio $3.5 \times 10^6 \pm 5 \times 10^4$, en el segundo pase $5.7 \times 10^6 \pm 3 \times 10^4$ y en el tercer pase $7.3 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^4$.

Un punto importante es el inmunofenotipo de las células para determinarlo se procedió a evaluar la presencia de marcadores de células indiferenciadas tales como CD117, CD90, CD166 y marcadores de células hematopoyéticas como CD34, CD14 y CD45 todo esto por medio de citometría de flujo (**Figura 5**), como resultado se obtuvo una población celular negativa a CD34 (99.97%), CD14 (98.98%) y CD45 (99.32%) positivas a CD117 (20.03%), CD90 (96.23%) y CD166 (3.93%) con lo cual se considera que las células obtenidas son células en un

estado indiferenciado y con capacidad de replicarse además de que no son células del linaje hematopoyético.

No obstante dichas pruebas son un tanto subjetivas debido a que se usaron anticuerpos para humanos por lo cual podrían haber generado falsos negativos, por lo cual se procedió a utilizar técnicas más específicas como es la biología molecular, se decidió buscar la presencia de genes llamados “stemness” tales como SOX2 y NANO-G, se ha reportado que estos genes son los encargados de mantener a las células en un estado indiferenciado, por lo cual se realizaron las pruebas al momento del muestreo, en diferentes pases y en células que estuvieron en presencia de factores de crecimiento para inducir una diferenciación condral, se usó como control de expresión el gen constitutivo de gliceraldehido y como control negativo condrocitos (**Figura 6**) obtuvimos expresión de dichos genes en las células al momento del muestreo, en el pase 1 y 2 como se esperaba no hay expresión en los condrocitos ni en las células que estuvieron bajo el estímulo condral, con esto se puede confirmar que las células que se obtuvieron son células pluripotenciales mesenquimales.

Sin embargo el punto importante de las células troncales es la capacidad de diferenciarse hacia otros linajes, una vez colocadas en el medio de inducción a diferentes tiempos se obtuvieron células positivas a tinciones de azul alciano a los 7, 14 y 21 días lo mismo que a safranina-O (**Figura 7**) con lo cual se puede pensar que las células están produciendo matriz extracelular, en comparación al grupo control al cual no se le adicionó ningún factor de crecimiento.

Para asegurar la expresión de marcadores condrales se procedió a analizar la expresión de colágena tipo II y agregano por medio de RT-PCR, en el cual observamos expresión a los 7, 14 y 21 días (**Figura 8**)

Con respecto a las pruebas de hidrofiliidad el polímero a base de quitosán con ácido hialurónico alcanzó su punto máximo de absorción de líquido a los 7.5 minutos (**cuadro 3**) sin embargo perdió estructura a los diez minutos (**Figura 9**) y se termino de disolver a los 30 minutos por lo cual fue descartado para ser usado en la investigación.

El polímero a base de quitosán con resomer mantuvo un comportamiento homogéneo, no perdió estructura en ningún momento de la medición y alcanzó el porcentaje máximo de absorción de líquidos a los 30 minutos (**cuadro 4**) sin embargo fue descartado de la investigación dado que en su composición contiene alcohol polivinílico.

El polímero a base de colágena tipo I y III mantuvo igualmente un comportamiento homogéneo durante las mediciones, el punto máximo de absorción lo alcanzó a los 7.5 minutos (**cuadro 5**) y no perdió estructura en ningún punto de las mediciones, por lo cual se procedió a analizarlo mediante microscopia electrónica con la finalidad de determinar la estructura del polímero y se observó que es un polímero con una composición laminar (**Figura 10**).

Dados los resultados se procedió a sembrar las células en dicho polímero con la finalidad de ver si se adherían y si eran capaces de sobrevivir en este material, para determinar la viabilidad se utilizó el kit de live/dead (**Figura 11**). Se observaron células vivas en el material esto determinado por medio de fluorescencia, de manera paralela se realizó una tinción de hematoxilina & eosina para ver las células (**Figura 12**) con mayor detalle, las células se adhieren al polímero y son capaces de sobrevivir dentro en el polímero. Posteriormente se evaluó si las células fueron capaces de mantener ese fenotipo condral dentro del polímero para lo cual se obtuvo el RNA de las células dentro del polímero y se evaluó la expresión de colágena tipo II y agrecano, obteniendo expresión únicamente de colágena tipo II. (**Figura 13**).

DISCUSIÓN

Las Células Pluripotenciales Mesenquimales son un tipo de células que se encuentran en la médula ósea y se caracterizan por ser indiferenciadas y ante determinadas señales se pueden diferenciar para realizar una función concreta, una de las ventajas al utilizar estas células es que a pesar de ser menos del 0.001% de las células nucleadas, éstas se pueden multiplicar a grandes números *in vitro* (Ibarra *et al* 2007).

Las células pluripotenciales mesenquimales de aspirados de médula ósea de equinos adultos pueden ser obtenidas de una manera práctica y mínimamente invasiva en caballos sedados de pie, evitando de esta manera posibles complicaciones secundarias a un muestreo en caballos anestesiados como pudieran ser un hemotórax o un neumotórax.

El método de separación con Ficoll es un método sencillo y que permite de esta forma una separación completa de eritrocitos evitando así la contaminación de las células y permite asegurar que las células que se obtienen son células indiferenciadas.

Actualmente no existe un marcador específico para células troncales mesenquimales, sin embargo por consenso general se considera a una célula troncal cuando no expresa los marcadores hematopoyéticos CD34, CD45 y CD 14 (Chamberlain *et al.*, 2007, Rodríguez Pardo 2005, Prósper 2004, Fickert *et al.*, 2004, Badoo *et al.*, 2003), lo cual concuerda con los resultados obtenidos, pero además los principales marcadores de una células troncal son el CD90 y CD117 los cuales deben estar presentes en las células que se consideran troncales y en éste estudio la población estudiada fue positiva a dichos marcadores, además de que se encontró una pequeña población positiva a CD166 y CD73 lo cual concuerda a lo publicado por Robert *et al.*, 2000.

Pittenger *et al.*, en 1999 definió como el estándar de oro para una célula troncal el hecho de que fuera adherente y morfológicamente una célula de tipo fibroblasto, lo cual en este estudio se cumplió, sin embargo con la finalidad de demostrar que estas células se encuentran realmente en un estado indiferenciado se procedió a analizar la presencia de los marcadores “stemness”; NANOG y SOX2, los cuales son expresados en células en un estado indiferenciado y que tienen la capacidad de autorenovarse (Rodda *et al.*, 2005), los resultados derivados demuestran que las células obtenidas de médula ósea expresan dichos marcadores de la misma forma que lo publicado por Violini *et al.*, 2009 y de esta forma se puede concluir que las células que se aislaron de médula ósea son células en un estado indiferenciado y que podrían ser capaces de diferenciarse hacia cualquier linaje celular.

Existen diversas publicaciones donde se agregan diversos componentes a los medios de cultivo para poder diferenciar a las células troncales en condrocitos (Koerner *et al.*, 2006), sin embargo se requiere de un lapso de 15 días para lograr la diferenciación, no obstante en esta investigación el método de diferenciación consistió en colocar solo TGF- β y BMP-2 como factores inductores y se pudo observar que a los 7 días ya había síntesis de proteoglicanos lo cual fue evidente con las tinciones propias y el RT-PCR, lo cual concuerda con lo publicado por Kisiday *et al.*, 2008, Vidal *et al.*, 2009,

Este tipo de células se encuentran en diversos tejidos adultos tales como médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica, periostio, tracto gastrointestinal, membrana sinovial y otros. Sin embargo las más utilizadas en tratamientos ortopédicos en equinos han sido las de tejido adiposo y médula ósea, no obstante diversos estudios han demostrado que las células de médula ósea comparadas con la de tejido adiposo tienen una mayor y mejor producción de colágena tipo II y agrecano (Frisbie *et al.*, 2009, Kisiday *et al.*, 2008), Wakitani *et al.*, (1994)

demostró que las lesiones condrales tratadas con células obtenidas de médula ósea en comparación con células de periostio generan un mejor tejido de reparación, Gómez *et al.*, 2008 realizó la recuperación de células troncales sanguíneas a partir de sangre periférica sin movilizarlas de médula ósea; los cultivos se estimularon para generar cartílago; sin embargo los resultados obtenidos no fueron del todo satisfactorios; quizás los precursores obtenidos sin movilización se encuentran en mayor número comprometidos hacia un linaje hemático y es difícil su diferenciación hacia mesenquimales, Asimismo Koerner *et al.*, 2006 demostraron que las células de médula ósea tienen una mejor diferenciación hacia condrocitos y osteocitos que los de sangre periférica.

Las matrices de sostén o andamios juegan un papel muy importante en la ingeniería de tejidos como un soporte físico y también como un substrato adhesivo ya que permite la adhesión de las células, promueven el crecimiento celular y la retención de la diferenciación funcional de las células (Ibarra *et al.*, 2007; Zapata *et al.*, 2007; Pearce *et al.*, 2007; Tateishi *et al.*, 2006).

Las características necesarias para estas matrices son: a) ser reproducible; b) ser tridimensional; c) tener una estructura porosa que permita la adhesión celular; e) degradarse homogéneamente y f) ser biocompatibles (Ibarra *et al.*, 2007, Temmenof 2000).

Uno de los obstáculos para la ingeniería del tejido cartilaginoso ha sido el desarrollo de una matriz de cultivo tridimensional que tenga las propiedades mecánicas que se requieran, tales como la capacidad para enfrentar los grandes esfuerzos de contacto y las tensiones de una articulación. Los resultados obtenidos demuestran que las células son capaces de sobrevivir en el polímero a base de colágena tipo I y III lo cual concuerda con diversos estudios en humanos donde han usado dicho polímero (Lind *et al.*, 2008, Seedhom *et al.*, 2007, Mistry *et al.*, 2007).

CONCLUSIÓN.

Conjuntando todos los resultados obtenidos podemos señalar que las células que se obtuvieron son células indiferenciadas y que tienen la capacidad de diferenciarse a diversos linajes celulares demostrado parcialmente al diferenciarlas hacia condrocitos, lo cual permite considerarlas como una fuente potencial de células para estrategias de reemplazo o para combinarlas con la ingeniería de tejidos para lesiones a nivel de cartílago de articular, sin embargo los resultados obtenidos son únicamente en condiciones *in vitro*, por lo cual es necesario realizar nuevos estudios en un modelo de reparación articular como el equino e implantar las células vía artroscópica.

Literatura citada.

Adarmes H, Croxatto A., Galleguillos M, González E. Contenido de glicosaminoglicanos, aldehídos y proteínas en el líquido sinovial de la articulación metacarpofalángica equina normal y alterada. Archivos de Medicina Veterinaria. 2006. 38 (1): 47-52.

Almqvist K., Wang L., Wang J., Baeten D., Cornelis M. Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: Characteristics of the cells over a period of eight weeks. Annals of the Rheumatic Diseases. 2001. 60:781-790.

Ameer G., Mahmood T., Langer R. A biodegradable composite scaffold for cell transplantation. Journal of Orthopaedic Research. 2002. 20: 16-19.

Angulo J. Cartílago articular, degeneración y reparación. Tesis 1999. Facultad de Medicina U.N.A.M.

Anzaldúa S, Juárez M, Villaseñor H, Ríos M, Cornejo M. ¿Qué son las células troncales o “células madre”? Veterinaria México 2007; 38(1): 81-104.

Au A., Polotsky A., Krzyminski K., Gutowska A. Evaluation of thermoreversible polymers containing fibroblast growth factor 9 (FGF-9) for chondrocyte culture. Journal of biomedical materials research. Part A. 2004. 367-372.

Awad H., Wickham M., Leddy H., Gimple J. Chondrogenic differentiation of adipos-derived adult stem cells in agarosa, alginate and gelatin scaffolds. Biomaterials. 2004, 25: 3211-3222.

Baddoo M., Hill K., Wilkinson R., Gaupp D., Hughes C., Kopen C., Phinney G. Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Murine Bone Marrow by Negative Selection Journal of Cellular Biochemistry. 2003, 89:1235–1249.

Breinan H., Hsu H., Spector M. Chondral defects in animal models: Effects of selected repair procedures in canines. Clin Orthop Relat Res. 2001. 391: 219-230.

Bryant S., Anseth K. The effect of scaffolds thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinkedpoly (ethylene oxide) hydrogels. Biomaterials. 2001, 22: 619-626.

Buckwalter J. Articular cartilage: Injuries and potential for healing. Journal Orthopedic Sports Physiology Therapy. 1998; 28 (4): 192-202.

Butler D., Goldstein S., Guilak F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng.* 2000. 122: 570-575.

Cao Y., Rodriguez A., Vacanti M., Ibarra C., Arevalo C. Comparative study of the use of poly(glicolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym.* 1998. 9: 474-487.

Chamberlain G., Fox J., Ashton B., Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing STEM CELLS 2007;25.

Chin L., Sukari A. In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical-Grade Chitosan Derivatives in Wound Management. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 1300-1313

Cho J., Kim S., Park K., Jung M., Yang M. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer. *Biomaterials.* 2004. 25: 5743-5751.

Demitri C., Scalera F. Santin M. Chitosan nanoparticles for biomedical applications: compararison between different production methods. 2nd World Congress TERMIS. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2009. 6 (12). República de Corea.

Fabela-Sánchez O., Zarate-Triviño G., Elizalde-Peña A., García-Carvajal Z. Mammalian Cell Culture on a Novel Chitosan-Based Biomaterial Crosslinked with Gluteraldehyde. *Macromol. Symp.* 2009, 283–284, 181–190.

Fickert S., Fiedler J., Brenner F. Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers *Arthritis Research & Therapy* 2004.Vol 6 No 5.

Flores E. Detección de colagena tipo II, agrecano, Sox 9 y colagena tipo I, análisis molecular comparativo de cartílago articular normal y condrocitos en dos tipos de cultivo primario. Tesis de Maestría. 2008 FMVZ- UNAM. México.

Frisbie D., Kawcak C., Mcllwraith W. Evaluation of Bone Marrow Derived Stem Cells and Adipose Derived Stromal Vascular Fraction for Treatment of Osteoarthritis Using an Equine Experimental Model. *J Orthop Res* 2009; 27:1675–1680,

Fuentes I, Arufe M, Silvia María Díaz, Hermida T, Toro F y Blanco F. Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular. *Reumatol Clin.* 2007;3 Supl 3:63-9.

Furumatsu T., Tsuda M., Taniguchi.,Tajima Y., Asahara T. Smad3 Induces Chondrogenesis through the Activation of SOX9 via CREB-binding Protein/p300 Recruitment. *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 9, Issue of March 4, pp. 8343–8350, 2005

Giroto D., Urbani S., Brun P., Reiner D., Barbucci R. Tissue specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds. *Biomaterials.* 2003. 24: 3265-3275.

Gómez R, Rey A. Tratamiento de las lesiones condrales de rodilla mediante técnica de mosaicoplastia artroscópica. *Acta Ortop. Castellano-Manch.* Núm. 6. 2005.

Goodrich R. Nixon J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review *The Veterinary Journal.* 2006. 171:51–69.

Grunder T., Gaissmaier C., Fritz J., Stoop R., Hortschansky P., Mollenhauer J. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *Osteoarthritis and Cartilage* 2004, 12: 559-567.

Guillaume R., Hae-Beom L., Dominique G., Page L., Yong S. Effect of chitosan scaffold microstructure on mesenchymal stem cells chondrogenesis. 2nd World Congress TERMIS. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine.* 2009. 6 (12). República de Corea.

Gutowska O., Jasinowski M., Morris J., Christler W. Polymer formulations for cartilage repair. *Biomaterials.* 2001. 566.

Hall A., Horwitz E., Wilkins R. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol.* 1996; 81: 535-545.

Hangody, L. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am.* 2003. 85-A Suppl 2 :25-32.

Helmick G., Felson D., Lawrence R., Gabriel S., Hirsch R., Kent Kwok C. Matthew H. Maradit H., Mayes M., Merkel P., Pillemer S. Estimates of the Prevalence of Arthritis and Other Rheumatic Conditions in the United States. *Arthritis & rheumatism* Vol. 58, No. 1, January 2008, pp 15–25.

Hirano S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International Polym Int.* 1999, 48:732-734.

Ibarra C., Garcíadiego D., Martínez V., Velasquillo C. Ingeniería de tejidos y osteoartritis. Consultado en línea en: <http://www.doyma.es> Diciembre 2007.

Ikada Yoshito. *Tissue engineering fundamentals and applications.* Elsevier 2006.

In-Yong K., Seong.Jin S., Hyun-Seuk M., Mi-Kyong Y. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances* 2008, 26; 1–21.

Kisiday D., Kopesky W., Evans H., Grodzinsky J., McIlwraith C., Frisbie D. Evaluation of Adult Equine Bone Marrow- and Adipose-Derived Progenitor Cell Chondrogenesis in Hydrogel Cultures. *J Orthop Res* 2008; 26:322–331,

Koerner J., Nestic D., Romero J., Brehm W., Mainil-Varlet P., Patrick S. Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2006;24;1613-1619

Langer R. y Vacanti J. *Tissue engineering.* Science, New Series. 1993. 260, 5110: 920-926.

Langer R., Lanza R., Vacanti J. *Principles of Tissue Engineering.* Elsevier. 3th edición, 2007.

Lee C., Grodzinky A., Hsu P., Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res.* 2000. 21: 272-281.

Lin Z., Willers C., Xu J., Zheng M. The chondrocyte: Biology and Clinical Application. *Tissue Engineering*, 2006, 12 (7): 1-14.

Lin Z, Pavlos J. Cake M, Word D, Xu J, Zheng H. Evidence that human cartilage and chondrocytes do not Express calcitonin receptor. *Osteoarthritis and cartilage.* 2007.

Lind M., Larsen A. Equal Cartilage Repair Response Between Autologous Chondrocytes in a Collagen Scaffold and Minced Cartilage Under a Collagen Scaffold: An In Vivo Study in Goats. *Connective Tissue Research*, 2008 49:437–442,

Loeser R., Pacione C., Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* . 2003; 48 (8): 2188-2196.

Lombardero G. Tratamiento artroscópico para lesiones del cartílago articular equino basado en el implante de una malla de colágena con células autólogas encapsuladas. Tesis de doctorado. UNAM. 2009.

Mainil-Varlet P., Thomas A., Brittberg M. Histological Assessment of Cartilage Repair a report by the histology endpoint committee of the international cartilage repair society (ICRS). *The Journal Of Bone & Joint Surgery*. 2003 Volume 85-A · supplement 2

Martin J., Schafer D., Dozin B. Repair of osteochondral lesions. 200-2005. Landes Bioscience. Consultado en línea en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eurekah>. Enero 2009.

Martin J., Wendt D., Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotech*. 2004; 22 (2): 80-86.

Masri M. Función del Cartílago Articular. Jornadas internacionales de cirugía veterinaria (SECIVE). Barcelona del 11 al 12 de noviembre del 2006.

Masri M, Ibarra C, Lombardero G, Paasch L. Situación actual de la Reparación Condral en el Equino. *Veterinaria México*, 2006, Vol 3 (3): 369-378.

Mauck R., Seyhan S., Ateshian G., Hung C. Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationship of chondrocyte-seeded agarosa hydrogels. *Ann Biomed Eng*. 2002. 21: 1046-1056.

McIlwraith, C.W., Current concepts in equine degenerative joint disease. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1982. 180: 239–250.

Mendieta R., López A., Vaquero I., Bermejo F., Cambero R., Fernández M. Tratamiento de las lesiones condrales de rodilla mediante técnica de mosaicoplastia artroscópica. *Acta Ortop. Castellano-Manch*. 2005, 6: 7-10.

Mi-Kyong Y., Jin-Hunk C., Sang-Ki K. Mohammad A. Chitosan nanoparticles functionalized by the M-Cell-homing peptide for oral vaccine delivery. 2nd World Congress TERMIS. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2009. 6 (12). República de Corea.

Mistry S., Prabbruwe M., Hollander A. Large scale three-dimensional cartilage tissue engineering using adult bone marrow stem cells from OA patients. Bone and Cartilage Regeneration, Newsletter 1/2008.

Palmer D., Steinert A., Pascher A., Gouze E., Gouze G., Betz O., Johnstone B., Evans C., Ghivizzani S. Gene-Induced Chondrogenesis of Primary Mesenchymal Stem Cells in Vitro. MOLECULAR THERAPY. 2005. Vol. 12, No. 2,

Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E. Animal models for implant biomaterial research in bone. European Cells and Materials 2007; 13: 1-10.

Pittenger F., Mackay M., Beck C. multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999; 284: 143-147.

Prósper F., Herreros J. Células madre adultas Rev Argent Cardiol 2004;72: 68-73.

Risbud M., Ringe J., Bhonde R., Sittinger M. In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: Implications for engineering cartilage tissue. Cell Transplantation. 2001, 10: 755-763.

Rodda D., Chew J., Leng-Hiong L., Yuin-Han L., Wang B., Huck-Hui N., Robson P. Transcriptional Regulation of *Nanog* by OCT4 and SOX2. The Journal Of Biological Chemistry 2005. Vol. 280, No. 26, Issue of July 1, pp. 24731–24737,

Rodríguez-Pardo V. Células Madre: Conceptos Generales Y Perspectivas De Investigación Universitas Scientiarum 2005, Vol 10, No. 1, 5-14.

Sá-Lima H., Caridade S., Mano J., Reis R. articular cartilage regeneration using adipose derived stromal cells encapsulated in chitosan-starch based injectable hidrogel. 2nd World Congress TERMIS. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2009. 6 (12). República de Corea.

Schneider N., Lejeune J., Deby C., Serteyn D. Viability of equine articular chondrocyte in alginate beads exposed to different oxygen tension. Vet J. 2004. 168: 167-173.

Seedhom BB., Luo ZJ., Goldsmith AJ, Toyoda T., Lorrison JC, Guardamagna L. In-situ engineering of cartilage repair: a pre-clinical in-vivo exploration of a novel system. Proc Inst Mech Eng. 2007. 221 (5); 475-88.

- Steadman JR. Outcomes of Microfracture for Traumatic Chondral Defects of the Knee: Average 11-Year Follow-up. *Arthroscopy*. 2003. 19 (5): 477-484
- Tateishi T, Chen G, Ushida T. Polyfunctional Scaffolds for Tissue Engineering. *Journal of biomechanical Science and Engineering* 2006; 1 (1).
- Temenoff J., Mikos A. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*. 2000, 21: 431-440.
- Toegel S., Huang W., Piana C., Unger F., Wirth M., Goldring M. Selection of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action. *BMC Molecular Biology*. 2007, 8 (13).
- Truong N., West J. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002, 23: 4307–4314
- Valcourt U., Ronziere M., Winkler P. Different effects of bone morphogenetic proteins 2,4,12 and 13 on the expression of cartilage and bone markers in the MC615 chondrocyte cell line. *Exp Cell Res* 1999, 251: 264-274.
- Varghese S., Theprungsirikul P., Sahani S., Hwang N. Glucosamine modulates chondrocyte proliferation, matrix synthesis, and gene expression. *OsteoArthritis and Cartilage*. 2007, 15: 59-68.
- Vidal M., Robinson S., Lopez M., Paulsen D., Borkhsenius O., Johnson R., Moore R., Gimble J. Comparison of Chondrogenic Potential in Equine Mesenchymal Stromal Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow. *Vet Surg*. 2008 December ; 37(8): 713–724.
- Wakitani S., Goto T., Pineda S., Young R., Mansour J., Caplan A., Goldberg V. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76:579-592
- Watabe T., Miyazono N. Roles of TGF- β family signaling in stem cell renewal and Differentiation. *Cell Research* (2009) 19:103-115
- Xuebing L., Yohsuke T., Minoru M., Hiroyuki S. Biological Activity of Chitosan-Sugar Hybrids: Specific Interaction with Lectin. *Polym. Adv. Technol*. 2000, 11, 176-179
- Young-Kwon S., Hee-Hoon Y., Jung-Keug P. Extracellular and natural polymers for tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Engineering and regenerative medicine*, 2009, 6 (12), 1088-1106.

Young, Jin K. Jae-Eok K., Won K. Preparation and characterization of chitosan-based blend nanofibers. 2nd World Congress TERMIS. Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 2009. 6 (12). República de Corea.

Zapata N., Zuluaga N., Betancur S., López L. Cultivo de Tejido Cartilaginoso articular: acercamiento conceptual. Revista Escuela de Ingeniería de Antioquia. 2007, 8: 117-129.

Zaucke F., Dinser R., Maurer P., Paulsson M. Cartilage oligomer matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. J Biochem. 2001, 358: 17-24.

Cuadro 1. Factores relacionados con la condrogénesis y mantenimiento de la integridad del tejido cartilaginoso. (Zapata N *et al* 2007, Lin Z. *et al* ., 2006, Martin *et al* ., 20005, Au *et al* ., 2004, Loeser *et al* ., 2003, Valcourt *et al* ., 1999)

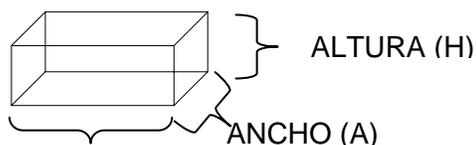
Familia de factores	Sigla	Aplicaciones
Factores transformantes de crecimiento tipo beta	TGF- β	Permiten la formación del hueso endocondral. Permiten la regeneración del tejido después de una fractura. Favorecen la síntesis de colágena tipo II y agregano. Contraestán los efectos inhibidores de los mediadores inflamatorios sobre la síntesis de proteoglicanos en el cartílago. Estimulan la síntesis de proteoglicanos en el cartílago defectuoso <i>in vivo</i>
Proteínas morfogenéticas de hueso	BMP	Induce el desarrollo de las yemas en las extremidades durante la embriogénesis. Participan en la formación ectópica de hueso. Favorecen la diferenciación de células mesenquimatosas a osteoblastos y condrocitos.
Factores del crecimiento de los fibroblastos	FGF	Regulan la mitosis, la diferenciación y expresión génica en varios tipos de células. Tienen efectos negativos sobre la deposición y acumulación de matriz extracelular. Promueven las actividades anabólicas y catabólicas en los condrocitos.
Insulina y factores de crecimientos tipo insulinoide	IGF	Modulan la producción de matriz extracelular en el cartílago. Induce la síntesis y deposición de proteoglicanos. Mantienen el metabolismo de los condrocitos. Inhiben el catabolismo de la matriz.
Factor de crecimiento epidérmico.	EGF	Estimula de forma sinérgica la síntesis de proteoglicanos. Induce la proliferación de los condrocitos.
Factor de crecimiento derivado de las plaquetas	PDGF	Facilita la deposición de proteoglicanos.

Cuadro 2. Biomateriales utilizados en la construcción de matrices tridimensionales para cultivo de cartílago. (Zapata *et al.*, 2007; Awad *et al.*, 2004; Cho *et al.*, 2004 ; Schneider *et al.*, 2004 ; Giroto *et al.*, 2003 ; Ameer *et al.*, 2002; Mauck *et al.*, 2002; Almqvist *et al.*, 2001; Zaucke *et al.*, 2001 ; Gutowsaka *et al.*, 2001 ; Breinan *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2000 ; Cao *et al.*, 1998).

MATERIAL	VENTAJAS	DESVENTAJAS
ALGINATO	Material inerte, biocompatible y biodegradable. Provee una viabilidad del 95% en el cultivo de células condrocíticas. Mantiene el fenotipo de las células condrocíticas. Permite la formación de una matriz extracelular con propiedades fisicoquímicas y bioquímicas similares al cartílago normal. No presenta contracción al implantarse.	Presenta una reacción inflamatoria baja después de su implantación <i>in vivo</i> . Posee propiedades mecánicas bajas
AGAROSA	Permite la recuperación del fenotipo diferenciado de condrocitos rediferenciados. Favorece el incremento de la síntesis de colágeno y proteoglicanos en el tiempo. Permite la inmovilización celular completa en una matriz inerte	Posee propiedades mecánicas bajas. Presenta contracción después de implantado
Polímeros de ácido glicólico y ácido láctico	Promueven el crecimiento de tejido cartilaginoso nuevo. Son adecuados para la reparación de fibrocartílago	Las matrices deben ser fabricadas antes de sembrar las células, por lo cual se presenta una disminución en la densidad celular y del contenido de glucosaminoglicanos.
Oxido de polietileno	Permite incrementar el espesor de la matriz tridimensional de cultivo y a su vez obtener una densidad celular uniforme. Favorece la producción de tejido cartilaginoso con composición bioquímica estable. Permite la distribución radial y longitudinal de los glucosaminoglicanos en el gel	Posee propiedades mecánicas bajas.

<p>Polímeros de gelificación termoreversible</p>	<p>Permite la proliferación de condrocitos sin alterar el fenotipo. Favorecen la producción normal de colágeno II y agregano. Son biodegradables y biocompatibles. Tienen una adecuada permeabilidad de moléculas pequeñas.</p>	<p>La producción de los componentes de la matriz es más lenta que con otros materiales.</p>
<p>Compuestos derivados de la matriz extracelular</p>	<p>Permite la inmovilización de las moléculas de agua dentro del tejido. Ayudan a la movilidad y la diferenciación de los condrocitos. Permite la expresión de marcadores de diferenciación condrogénica. Tienen potencial para la liberación de condrocitos en el tratamiento de cartílago.</p>	<p>Algunos compuestos promueven la formación de fibrocartílago en lugar de cartílago hialino, lo que hace que las propiedades mecánicas de este sustituto sean inferiores.</p>
<p>Matriz de hueso demineralizada</p>	<p>Material inerte. Posee características inductivas y conductivas apropiadas para hueso y cartílago. Es una fuente natural de factores condrogénicos. Estimula la reparación osteogénica en fracturas y defectos segmentales. Es un material biodegradable compuesto de colágena tipo I</p>	<p>El tamaño de sus poros varía dentro de un rango muy alto. Puede transmitir agentes infecciosos. Puede inducir el deterioro de las propiedades mecánicas del tejido resultante.</p>
<p>Ácido poliláctico/poliglicólico</p>	<p>Material sintético biodegradable. La degradación del biomaterial es por hidrólisis. Permite la homogeneidad del tejido. Promueve la expresión de colágeno tipo II</p>	<p>Las propiedades mecánicas varían de manera negativa, de conformidad con las modificaciones químicas que se les realicen.</p>

POLIMERO DE ACIDO HIALURONICO CON QUITOSÁN.



LARGO (L)

A) Dimensiones:

L= 4.98 mm

A= 2.03 mm

H= 1.54 mm

Peso= 1.9 mg

B) dimensiones:

L= 4.50 mm

A= 2.85 mm

H= 1.07 mm

Peso= 1.8 mg

C) dimensiones:

L= 4.08 mm

A= 2.49 mm

H= 0.75 mm

Peso= 2.8 mg

D) dimensiones.

L= 4.23 mm

A= 2.34 mm

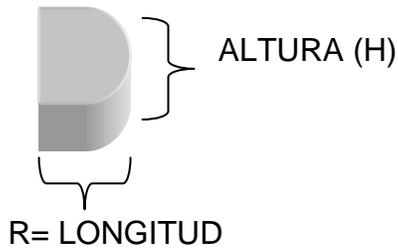
H= 1.34 mm

Peso= 3.1 mg

TIEMPO	valores	POLIMERO A	POLIMERO B	POLIMERO C	POLIMERO D
2.5 MINS	L= mm	3.97	4.58	5.1	5.05
	A= mm	3.81	4.12	2.95	4.24
	H= mm	2.24	2.25	2.39	2.16
	Peso= mg	12.6	15.8	19.8	24.8
	% hinchamiento=	563.16	777.78	607.14	700.00
5 MINS	L= mm	5.56	4.89	5.86	5.49
	A= mm	4.49	3.59	4.33	4.65
	H= mm	2.99	1.95	2.86	2.62
	Peso= mg	18	14.5	26.4	37.7
	% hinchamiento=	947.37	805.56	942.86	1216.13
7.5 MINS	L= mm	5.55	4.83	5.65	6.74
	A= mm	4.03	3.92	4.18	5.95
	H= mm	2.77	2.79	2.76	2.94
	Peso= mg	23.4	13.6	23.4	42
	% hinchamiento=	1231.58	755.56	835.71	1354.84
10 MINS	L= mm	6.73	4.73	5.51	6.43
	A= mm	3.91	3.5	4.29	5.25
	H= mm	3.42	2.34	3.49	3.15
	Peso= mg	21.1	12.5	22.6	42.8
	% hinchamiento=	1110.53	694.44	807.14	1380.65

CUADRO 3. Mediciones realizadas a los polímeros con la finalidad de determinar el momento de mayor absorción de agua, en este caso se obtuvo a los 7.5 minutos no obstante a los diez minutos el polímero pierde estructura por lo cual no se continuaron las mediciones.

POLIMERO DE QUITOSÁN CON RESOMER.



A) dimensiones
 R= 4.87 mm
 H= 2 mm
 Peso= 3.8 mg

B) dimensiones
 R= 5.56 mm
 H= 2 mm
 Peso= 4.9 mg

C) dimensiones
 R= 5.82 mm
 H= 2 mm
 Peso= 4.6 mg

TIEMPO	VALORES	POLIMERO A	POLIMERO B	POLIMERO C
2.5 MINS	R=mm	7.51	7.87	7.87
	H= mm	2.41	2.74	2.9
	PESO= mg	55.8	63.1	67.9
	% hinchamiento=	1368.42	1187.76	1376.09
5 MINS	R=mm	8.06	8.83	8.19
	H= mm	3.06	2.99	2.93
	PESO= mg	61.3	67.5	79.4
	% hinchamiento=	1613.16	1377.55	1726.09
7.5 MINS	R=mm	7.96	8.19	8.05
	H= mm	2.76	2.79	2.87
	PESO= mg	68.2	85	78
	% hinchamiento=	1794.74	1734.69	1695.65
10 MINS	R=mm	8.35	8.45	8.53
	H= mm	3.32	2.79	3.21
	PESO= mg	68.4	84.8	79.8
	% hinchamiento=	1800.00	1730.61	1734.78
15 MINS	R=mm	8.04	8.22	8.01
	H= mm	3.45	3.25	3.2
	PESO= mg	64.2	81.9	78.8
	% hinchamiento=	1689.47	1671.43	1713.04
20 MINS	R=mm	8.39	8.68	8.45

	H= mm	2.91	2.7	3.05
	PESO= mg	66.6	85.4	95.8
	% hinchamiento=	1752.63	1742.86	2082.61
25 MINS	R=mm	7.34	8.45	8.24
	H= mm	3.12	2.9	3.14
	PESO= mg	65.6	79	84.8
	% hinchamiento=	1726.32	1612.24	1843.48
30 MINS	R=mm	8.1	8.6	7.88
	H= mm	3.28	3.11	3.15
	PESO= mg	72.4	79.9	86.5
	% hinchamiento=	1905.26	1630.61	1880.43
45 MINS	R=mm	8.3	9.3	9.74
	H= mm	2.91	2.79	2.1
	PESO= mg	59.3	74.6	78.8
	% hinchamiento=	1560.53	1522.45	1713.04
60 MINS	R=mm	7.57	9.2	9.06
	H= mm	2.92	2.89	3.15
	PESO= mg	60.7	69.8	95.1
	% hinchamiento=	1597.37	1424.49	2067.39
120 MINS	R=mm	7.78	7.77	8.17
	H= mm	2.12	2.67	2.82
	PESO= mg	56.2	73.5	99.9
	% hinchamiento=	1478.95	1500.00	2171.74
24 HRS	R=mm	7.21	9.35	8.37
	H= mm	1.93	1.38	2.48
	PESO= mg	37.1	50.6	51.4
	% hinchamiento=	976.32	1032.65	1117.39

CUADRO 4. Mediciones realizadas a los polímeros con la finalidad de determinar el momento de mayor absorción de agua, en este caso se alcanzó a los 30 minutos y el polímero después de 24 horas mantuvo su estructura.

% Hinchamiento				
	Chondro guide			
min	Muestra1	Muestra2	Muestra 3	Mean
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
2,5	366,18%	331,52%	363,24%	353,65%
5	308,82%	348,37%	401,62%	352,94%
7,5	323,04%	385,33%	427,57%	378,64%
10	357,35%	313,04%	332,97%	334,46%
15	289,71%	277,72%	305,41%	290,94%
20	289,22%	317,93%	385,95%	331,03%
25	360,29%	367,39%	362,16%	363,28%
30	330,88%	322,83%	328,11%	327,27%
60	326,96%	336,96%	358,38%	340,77%
90	343,14%	352,17%	314,05%	336,46%
120	328,92%	377,17%	387,57%	364,55%
180	359,80%	394,57%	382,70%	379,02%
240	290,69%	372,28%	322,70%	328,56%
1440	268,14%	341,30%	331,89%	313,78%
2880	265,69%	333,70%	324,86%	308,08%
4320	260,29%	325,00%	319,46%	301,58%
5760	257,84%	321,20%	318,38%	299,14%
7200	258,33%	319,57%	317,30%	298,40%

CUADRO 5. Mediciones de polímero a base de colágena tipo I y III donde podemos ver que el polímero alcanza un porcentaje máximo de hinchamiento a los 7.5 minutos sin embargo nunca pierde estructura.

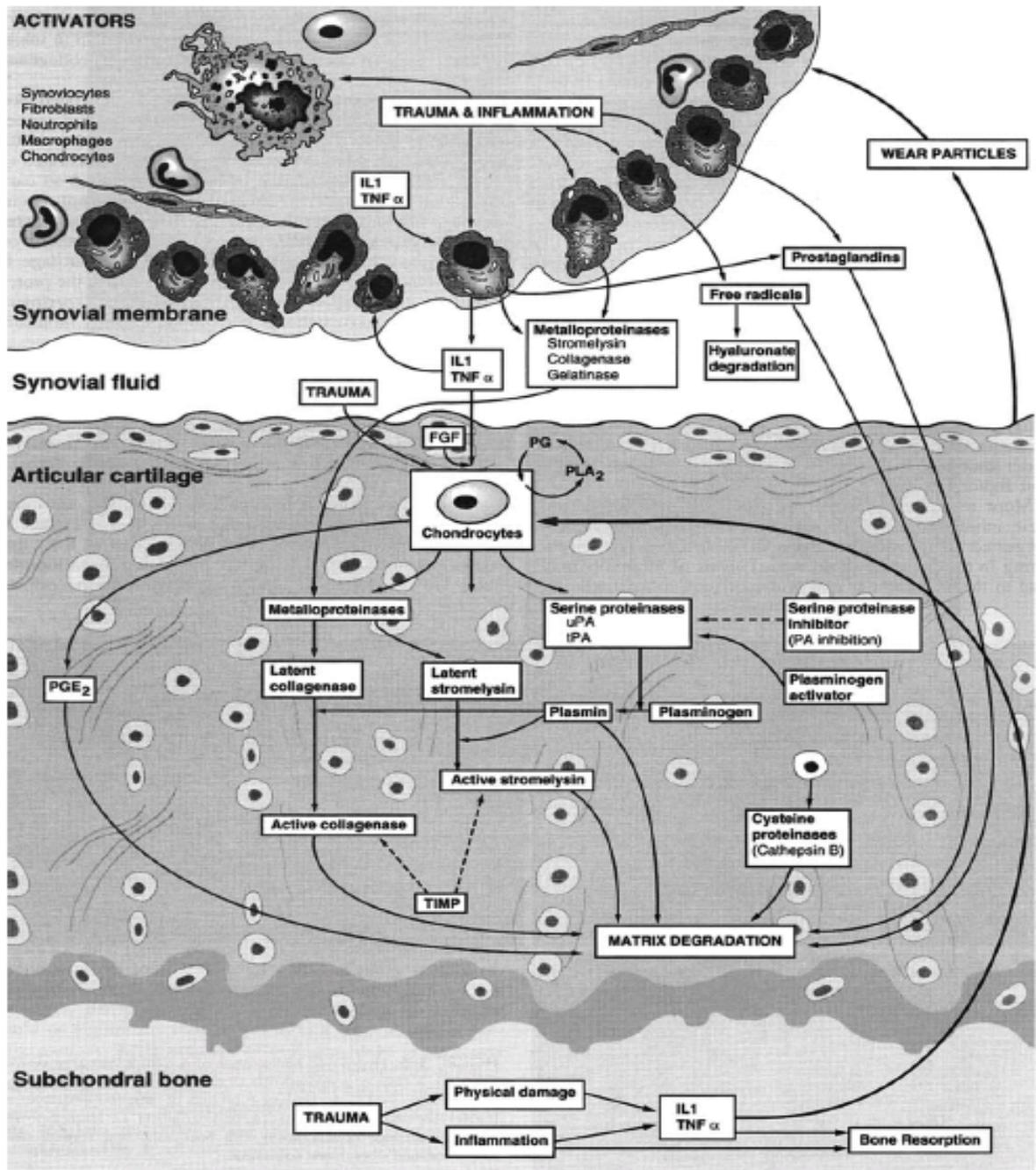


Figura 1.- moléculas involucradas en la degradación de cartílago articular. IL-1, interleucina 1; TNF-α, Factor de Necrosis Tumoral alfa; FGF, Factor de Crecimiento de los Fibroblastos; PG, Prostaglandina; PLA2, Fosfolipasa A2; uPA, Activador de plasminógeno urocinasa; tPA, Activador de Plasminógeno Tisular; PA, Activador de Plasminogeno; PGE2, Prostaglandina 2; TIMP, Inhibidor Tisular de las Metaloproteinasas. (McIlwraith, 1996.)

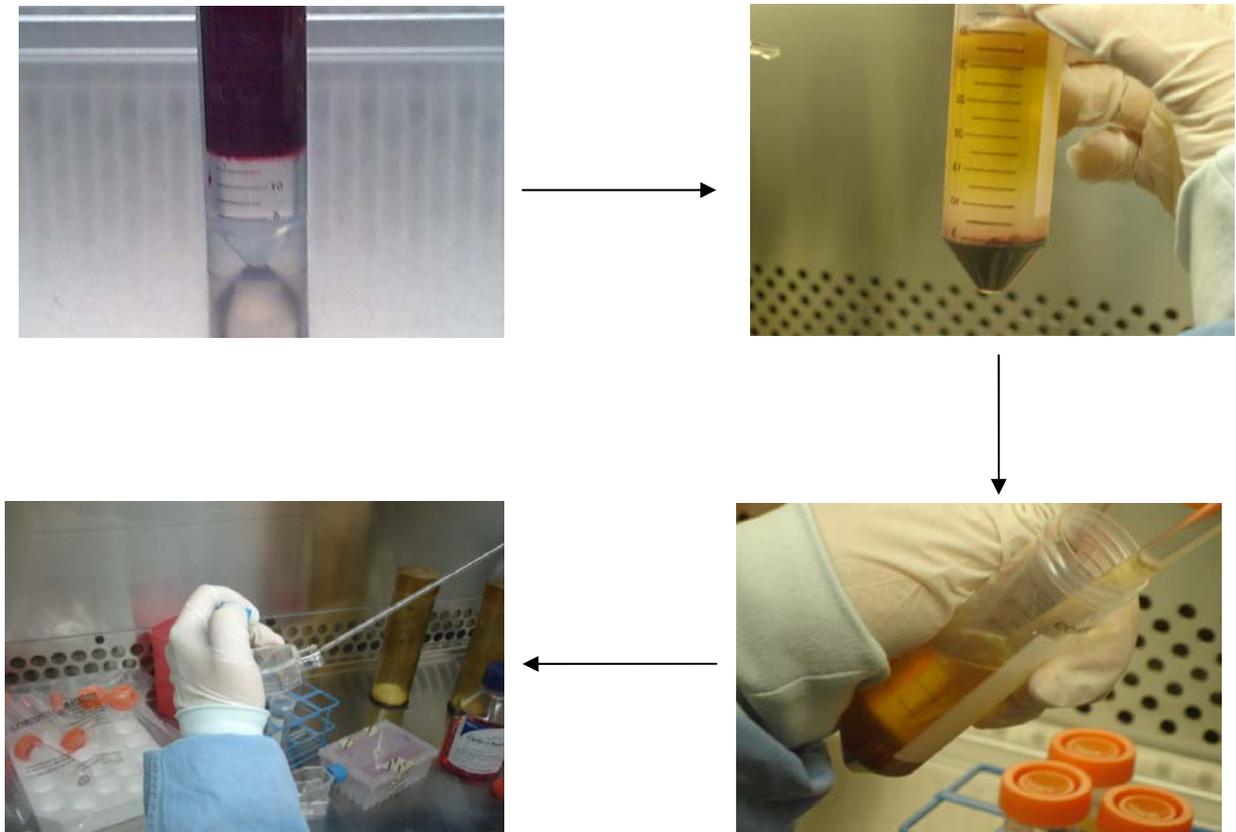


FIGURA 2. Proceso para la separación de las células mononucleares que es donde se encuentran las células pluripotenciales mesenquimales.



FIGURA3. Fotografías de las células en cultivo, células con morfología redondeada correspondiente a células al momento de sembrarse (3a fotografía con microscopio invertido 10x), células con morfología tipo fibroblasto correspondiente a células con 15 días de cultivo (3b fotografía estereoscópica). Fotografía con microscopio invertido donde se observa mejor la morfología de las células (3c 10x)

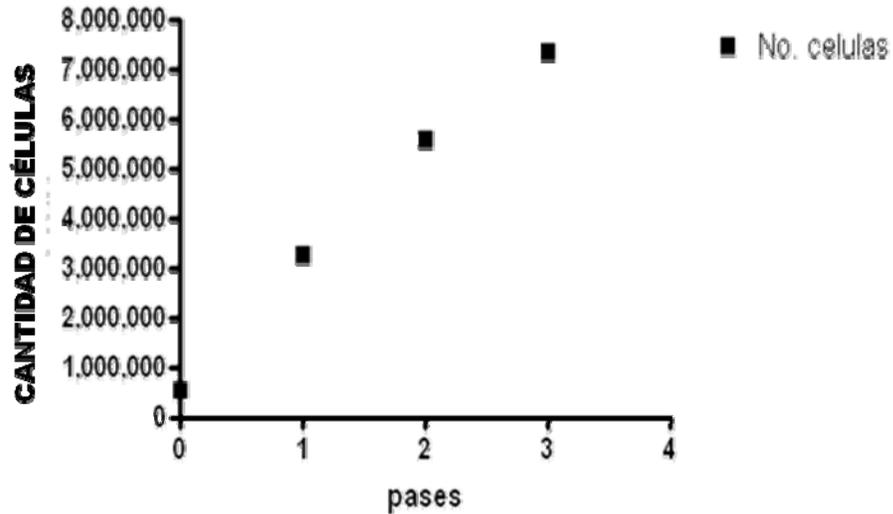


FIGURA 4. Curva de proliferación de las células al momento del muestreo y en cada uno de los pases, podemos observar que las células que estamos obteniendo tienen la capacidad de multiplicarse.

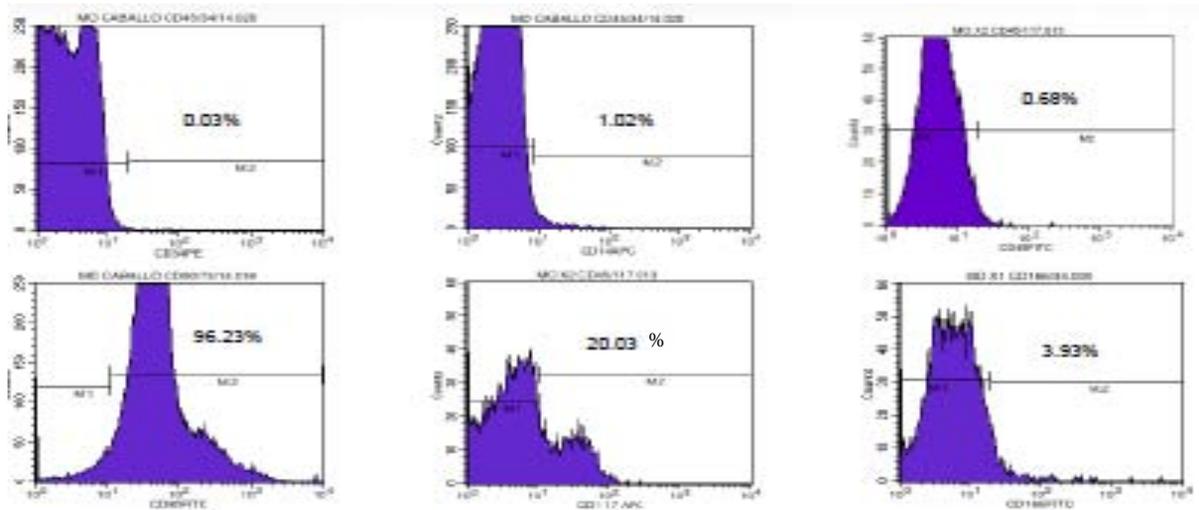


FIGURA 5. Histogramas de la citometría de flujo en donde observamos el inmunofenotipo de las células, obteniendo células negativas a marcadores hematopoyéticos (CD34, CD45 y CD14) y positivas a marcadores de células en un estado indiferenciado (CD90, CD117 y CD166)

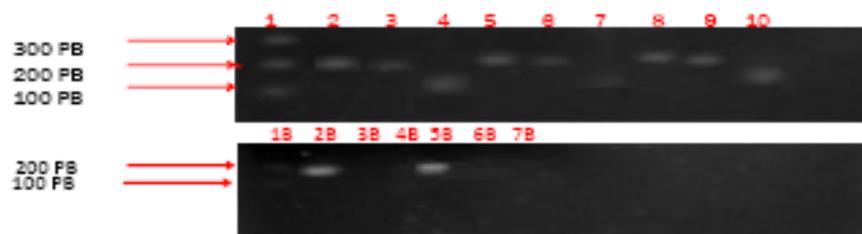


FIGURA 6. Gel de electroforesis en los carriles 1 y 1B observamos el marcador de peso molecular, en el carril 2, 2B, 5B, 5, 8 observamos el fragmento de GAPDH (190PB) en el carril 3, 3B, 6, 6B y 8 observamos al fragmento correspondiente a SOX2 (181 PB) y en los carriles 4, 4B, 7, 7B y 10 observamos al fragmento correspondiente a NANO-G (119 PB), como vemos hay expresión en las células obtenidas al momento del muestreo, en el primer y en el segundo pase, no hay expresión en condrocitos ni en las células que recibieron estímulo condral.

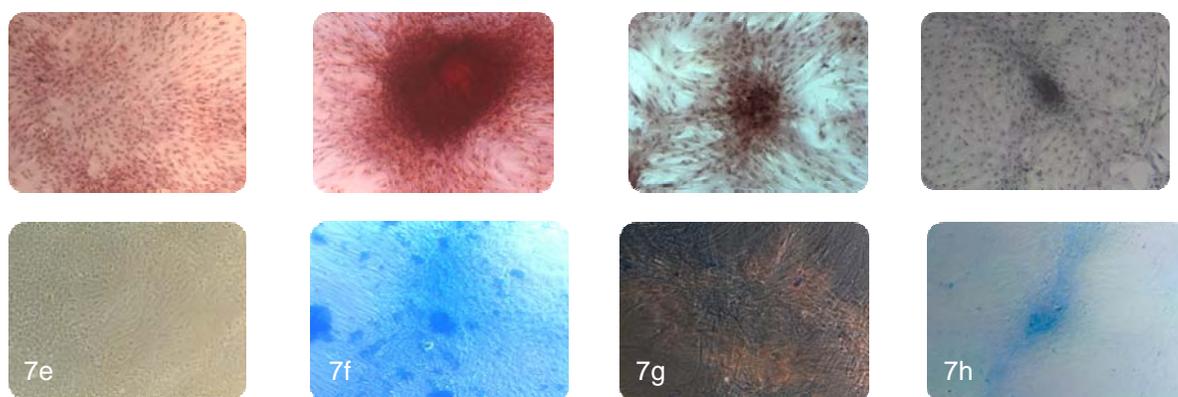


FIGURA 7. Fotografías de células control a las cuales no se les adicionó factores de crecimiento negativo a safranina-O (7a 10x) y negativo a azul alciano (7e 10x). Fotografías de células experimentales positivas a safranina-O a los 7 días (7b 10x), a los 14 días (7c 10x) y negativas a los 21 días (7d 10x). fotografías de células positivas a azul alciano a los 7 días (7f 10x), a los 14 días (7g 10x) y a los 21 días (7h 10x).

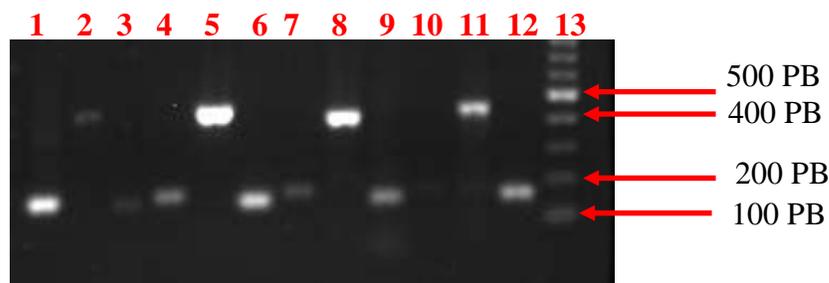


FIGURA 8. Gel de electroforesis en donde se observan los diferentes fragmentos productos del PCR. Carril 1 fragmento de GAPDH (190 PB) de las células de 7 días bajo estimulo, carril 2 fragmento de colágena tipo II (454 PB) de células de 7 días bajo estimulo, carril 3 fragmento de agregcano (174 PB) de células de 7 días bajo estimulo. Carril 4 fragmento de GAPDH de células de 14 días bajo estimulo, carril 5 fragmento de colágena tipo II de células con 14 días bajo estimulo, carril 6 fragmento de agregcano de células con 14 días bajo estimulo. Carril 7 fragmento de GAPDH de células con 21 días de estimulo condral, carril 8 fragmento de colágena tipo II de células bajo 21 días de estimulo condral, carril 9 fragmento de agregcano. Carril 10 vacío. Carril 11 fragmento de colágena tipo II de condrocitos, carril 12 fragmento de agregcano de condrocitos. Carril 12 marcador de peso molecular.



FIGURA 9. Fotografías a diferentes tiempos del polímero en las pruebas de hidrofiliicidad, se observa como el polímero va perdiendo estructura hasta convertirse en un hidrogel por lo cual fue descartado para la investigación.

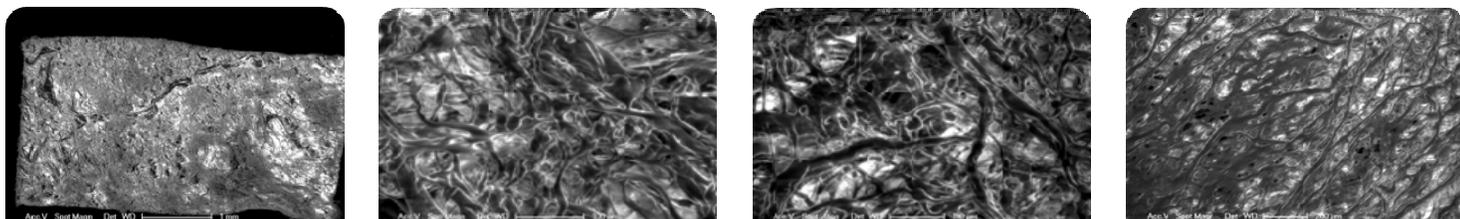


FIGURA 10. Fotografías de microscopía electrónica a diferentes aumentos en polímero de colágena tipo I y III donde se puede observar una estructura laminar a base de fibras con gran porosidad.

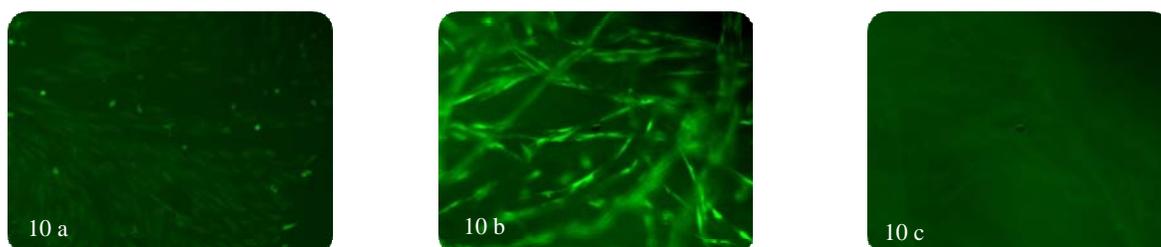


FIGURA 11. Fotografías de microscopía de fluorescencia en polímeros con células, se observan células adheridas en la caja de cultivo (10a 10x), células en polímero (10b 10x), polímero sin células (10c).

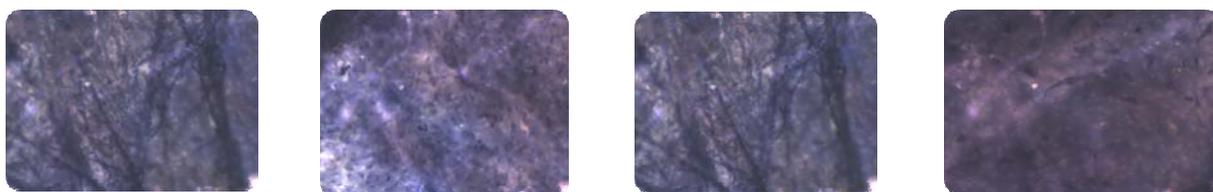


FIGURA 12. Fotografías con microscopio invertido (10x) en donde se observan células entre las fibras del polímero.



FIGURA 13. Gel de electroforesis en los carriles 1 observamos el marcador de peso molecular en el carril 2 el fragmento de GAPDH (190PB) en el carril 3 el fragmento correspondiente a colágena tipo II (464 PB) y en el carril 4 el fragmento correspondiente a agrecano (174 PB).

ANEXO 1.

- 1.- Se centrifuga la muestra a 300g por 5 minutos.
- 2.- Se elimina el sobrenadante.
- 3.- Se resuspende en medio de cultivo el pellet de preferencia pocos mililitros.
- 4.- Se toman 100 microlitros de la muestra y 100 microlitros de azul tripano; se revuelven bien.
- 5.- Se recuperan 100 microlitros de la suspensión celular y se deslizan en la cámara de Neubauer.

Nota: la cámara de Neubauer consta de ranuras finamente marcadas en el vidrio, en las cuales se lleva a cabo el conteo de células vivas, tomándose como vivas a las células que emitan un color blanco.

La cámara de la zona de conteo tiene 25 zonas de las cuales se toman las 4 zonas de las esquinas y la zona central para calcular el promedio de células vivas

Se multiplican por dos ya que son dos cámaras, y el resultado dará el total de células por 10^4 en 1 ml y multiplicado por el número de mililitros empleados para resuspender la muestra y nos da el número total de células vivas en la muestra.

ANEXO 2.

Para separar las células se lava la caja de cultivo con 8ml de PBS (Solución Buferada Fosfatada) y 2ml de ácido-etilen-diamino-tetracético (EDTA) de 1mM y se agregan 5ml de tripsina al 0.25% (Invitrogen, Gibco NY, EUA) para desprender las células del fondo de la caja. Posteriormente, esta se incuba con CO₂ a 37 °C durante menos de 5 minutos. A los tres minutos se evalúa la separación de las células al microscopio óptico de luz y se le agregaron 5ml de SFB (Suero Fetal Bovino) para bloquear la actividad de la tripsina. Se centrifuga a 126 x g por 12 minutos y el botón celular se resuspende con 5ml de PBS y se vuelve a centrifugar. Se resuspende en 2ml de medio de cultivo DMEM con SFB al 10%. Se observa al microscopio para calcular número, morfología y viabilidad celular.