

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Movilización de Células Troncales Mesenquimales a Circulación
Periférica utilizando el Factor de Estimulación de Colonias de
Granulocitos en Equinos**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

GRISELDA JOCABED ROLDÁN CHÁVEZ

ASESORES:

MVZ MSc DC MARÍA MASRI DABA

MVZ M en C ENRIQUE NUÑEZ HERNÁNDEZ



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.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a muchas personas que me han apoyado en todo momento, que aunque fue un proceso lento siempre me alentaron y apoyaron en muchas cosas para que por fin me pudiera titular, pero solo mencionare a algunas: Ricardo G, Carlitos (Instituto Nacional de Rehabilitación) y Abraham P. por su apoyo, paciencia y tiempo dedicado para realizar pruebas y todo lo que necesite para mis muestras, a los integrantes (alumnos, académicos y administrativos) del DMCZE-FMVZ que de igual manera me apoyaron y ayudaron con el manejo de los équidos que utilice, a mis asesores quienes me brindaron tiempo y disposición a ayudarme, y de este departamento en especial agradezco a Karola, Bruno, Tabaco, Boxito, Angustias y Pistolera que son los equinos que utilice; a Karola†, Bruno† y Campero† por que ellos desde que entre a la carrera me enseñaron mucho de lo que ahora se .

Y a todas y cada una de las personas que han pasado por mi vida ya sean buenas o malas, porque gracias a todas ellas me soy lo que soy

Por ultimo y no por ser menos importante a mi Familia, a mi mamá que me ha dado todo y más y a la cual le debo lo que soy, a mis bebes (hermanas) que siempre han estado para mi y me han apoyado en todo y a mis amigas (os).

II

DEDICATORIA

Va dedicada con todo mi corazón primero a Dios por que es el eje de mi vida y por que el me regalo lo mas importante para mi que son mi familia y amigos, en segundo lugar a mi mamá, Ges, Gaby, Emi y Danny (que esta por llegar) que son parte fundamental de mi vida, a los cuales amo hasta el infinito y más allá.

Tambien se la dedico a mis amigas (os): Montse, Diego, Lupita, Za, Patty, Carlitos, Xincon; quienes son super importantisimos y le dan un plus gigantezco a mi vida y a quienes han aguantado mis locuras y por ser unas personas inigualables los amo y agradezco que sean parte de mi.

Y como no dedicarla a mi universidad que fue la me hizo y enseñó tanto, por eso con orgullo llevare a la UNAM en el corazón siempre

III

CONTENIDO

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCIÓN | 2 |
| • Medicina Regenerativa y Terapia Celular. | |
| • Sistema Hematopoyético | |
| • Hematopoyesis | |
| • Médula ósea | |
| • Matriz Extracelular | |
| • Citocinas | |
| • Células Troncales | |
| • Celulas Troncales Mesenquimales | |
| • Factor De Estimulación De Colonias De Granulocitos (G-CSF) | |
| JUSTIFICACIÓN..... | 37 |
| HIPÓTESIS..... | 38 |
| OBJETIVOS..... | 39 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 40 |
| RESULTADOS..... | 46 |
| DISCUSIÓN..... | 51 |
| CONCLUSIÓN..... | 53 |
| ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS | 54 |
| REFERENCIAS..... | 78 |

IV

RESUMEN

ROLDÁN CHÁVEZ GRISELDA JOCABED Movilización de Células Troncales Mesenquimales a Circulación Periférica utilizando el Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos en Equinos (bajo la dirección de MVZ, MSc DC María Masri Daba y MVZ M en C Enrique NúñezHernández)

En el presente estudio se presenta una opción de obtención de Células Troncales Mesenquimales (CTM) para la reparación de diversas lesiones del sistema músculo-esquelético de equinos. Este es un método más sencillo y con menos riesgos, minimizando el dolor; teniendo como finalidad que las CTM ubicadas en médula ósea, se movilicen a sangre periférica. Esto se hizo con la administración subcutánea del Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos (G-CSF) en modelos equinos, evitando así la punción del hueso esternón (forma más común para obtener células troncales mesenquimales). Por medio de este trabajo se determinó que después de administrar G-CSF, las células troncales mesenquimales fueron movilizadas a sangre periférica obteniendo el mayor número de células (512.77%) después de 48 horas. Siendo corroborado este efecto con los hemogramas que se realizaron cada 24 horas; también se llevó a cabo citometrías de flujo y cultivos celulares de las muestras, para evaluar la existencia de células troncales, obteniendo así resultados positivos a cada prueba realizada.

INTRODUCCIÓN

En la medicina existen diversas áreas de estudio y una de ellas es la medicina regenerativa; la cual está teniendo mayor auge e importancia en la actualidad. Es un campo interdisciplinario de investigación y aplicaciones clínicas que está enfocada en la regeneración de tejidos y órganos (conjunto asociado de células de la misma naturaleza, diferenciadas de un modo determinado, ordenadas regularmente, con un comportamiento fisiológico común) que hasta hace poco se consideraban irreparables, para así poder recuperar tanto sus características biológicas como funcionales, que se han visto alteradas por diversas causas incluyendo malformaciones, enfermedades y traumatismos.^{1, 2, 3}

La medicina regenerativa se ha centrado en las células troncales como una opción de terapia, por lo que es necesario saber que es una célula troncal. El primer nombre que se le dio a las estas fue “Célula Germinal Primordial Inactiva Mitótica” en 1896 por Edmund Beecher Wilson; y la primera vez que se logró identificar en médula ósea y diferenciarla de los osteoblastos fue en 1960.⁴

Una Célula Troncal Mesenquimal según el Comité de la Sociedad Internacional de Células Troncales Mesenquimales y Tejidos debe tener tres características indispensables: adherencia y plasticidad (*in vitro*), expresar antígenos de superficie y una renovación continua. La adherencia y plasticidad se refiere a la condición que mantienen en el cultivo; los antígenos de superficie que deben de tener son los positivos a: CD105, CD73 y CD90 y carecer o negativos a: CD45, CD34, CD11a y b, CD79, CD19 y HLA-DR así como poder diferenciarse a: osteoblastos, condroblastos y adipocitos de manera *in vitro*.^{4, 5}

La terapia celular es una línea de investigación aún en desarrollo, es parte de la medicina regenerativa, por consecuencia es de reciente aparición, aunque este tipo de terapia ya se ha empezado a utilizar en la clínica.⁶

En la medicina veterinaria se ha utilizado como aplicaciones terapéuticas en lesiones músculo-esqueléticas, sin embargo aún no están bien implementadas y establecidas en el tratamiento clínico de pacientes.⁷ La terapia celular con células troncales, se refiere al uso de las mismas con la finalidad de regenerar o sustituir células o tejidos dañados y restaurar su función alterada por causas que comprenden: malformaciones congénitas, enfermedades o traumatismos; esta terapia se puede administrar por vía intravenosa o directamente en el tejido dañado (intralesional).^{2,4}

En medicina veterinaria la primera vez que se usó esta terapia y se reportó, fue en un modelo equino en el 2002 por Hertel, se utilizó para tratar desmitis del ligamento suspensor del menudillo; de ahí se ha seguido utilizando para el tratamiento de afecciones músculo-esqueléticas de caballos y perros.⁷ Esta terapia utilizada en equinos no sólo es un avance en la medicina veterinaria, a la vez ayudará en la medicina humana ya que los modelos pre-clínicos en los que se basan muchas de las veces son animales como el borrego y el cerdo; donde las lesiones son inducidas; a diferencia de los caballos, que sufren lesiones ortopédicas en condiciones naturales debido a su función zootécnica (atletas de alto rendimiento).⁸

La terapia celular está basada en colocar una población multi y pluripotencial en la parte afectada del tejido donde puedan proliferar, diferenciarse y organizarse, de forma que el resultado sea una reestructuración y funcionamiento normal del tejido.⁸ Esta terapia en caballos se ha utilizado principalmente en afecciones ortopédicas como tendinopatías y osteoartritis, ya que son las dos patologías con mayor incidencia del caballo atleta, sin dejar de lado las lesiones en los ligamentos que al igual que los tendones son las principales causas de afectación ortopédica y por lo tanto del retiro temprano de la función zootécnica del equino.⁹ Pero debido a que el tendón y el cartílago son tejidos con una pobre capacidad de regeneración intrínseca, producen un tejido de reparación fibroso en una lesión o proceso inflamatorio; teniendo como consecuencia la limitación o reducción en la mayoría de las veces en la vida atlética del equino.⁸

Para poder utilizar las Células Troncales Mesenquimales es necesario aislarlas del organismo y caracterizarlas; las técnicas descritas hasta ahora de punción de médula ósea como la que describe el doctor Verma en su artículo, son traumáticas para los pacientes y necesitan de estudios y logística para la manipulación de las muestras; de tal forma que un perfeccionamiento de la técnica representa un avance en el bienestar de los pacientes.¹⁰

Existen diversos métodos para obtener estas células, el procedimiento más común para la obtención de CTM es el aspirado de médula ósea, la técnica se puede llevar a cabo en huesos planos (esternón, costillas y vertebras) y en huesos largos (coxis, fémur y húmero).^{11, 12} En humanos y caballos jóvenes generalmente se realiza en esternón, íleon o costillas. Otra forma del aislamiento de las CTM puede hacerse en diferentes tejidos como:

- Periostio.⁵
- Tejido adiposo.⁵
- Membrana sinovial.⁵
- Tejido músculo-esquelético.⁵
- Pulmón.⁵
- Cordón umbilical.⁵
- Sangre periférica.⁵
- Piel.⁵
- Orejas.⁵
- Embrión.⁴
- Gelatina de Wharton.⁴
- Hígado fetal.⁴

Lo complejo de estos procedimientos es que las CTM son una fracción muy pequeña del total de la población de células nucleadas. En investigaciones de la Dra. Fortier menciona que en médula ósea (MO) del 0.001% al 0.01% de las células mononucleadas aisladas son CTM.⁷

Existen factores que estimulan la hematopoyesis, se mencionan cuatro factores de estimulación de colonias clásicos: Interleucina 3, Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF), Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos

(G-CSF), Factor de Estimulación de Colonias de Monocitos(M-CSF o CSF-1). Estos son un grupo de glicoproteínas de bajo peso molecular y significativamente homólogos en las proteínas y en los niveles de nucleótidos.¹³

El Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos (G-CSF) es inducido de forma natural por la exposición a proteínas de paredes bacterianas, endotoxinas y citocinas inflamatorias. El G-CSF lo podemos encontrar en dos presentaciones: endógeno y exógeno. El endógeno es producido por monocitos y macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células del estroma de la médula ósea. Y el G-CSF exógeno puede ser administrado vía intravenosa o subcutánea; su distribución principalmente es a médula ósea, glándulas adrenales, riñones e hígado.¹⁴ Es un inmunomodulador que induce la proliferación y diferenciación de las células progenitoras de granulocitos, aumentando la producción de neutrófilos principalmente y acortando el tiempo que requieren los neutrófilos para madurar.¹⁵

En medicina veterinaria el G-CSF es utilizado en la clínica de pequeñas especies para disminuir la duración de la neutropenia en pacientes oncológicos y neutropenia por infecciones de origen viral principalmente, así como, para la movilización de células troncales; siendo administrado por vía intravenosa o subcutánea.^{1, 7, 16, 17} Este factor en caballos se ha usado para el tratamiento y profilaxis de neutropenia causada por septicemia, endotoxemia e hipoplasia linfóide inducida por fármacos.¹⁷

Es importante resaltar que en cualquier investigación no se debe de perder de vista la bioética. En la investigación internacional, se ha trabajado poco sobre “justicia distributiva” cuyo requerimiento básico es la exigencia de tener una equidad entre los riesgos y los beneficios de las investigaciones. En años anteriores la mayoría de las investigaciones realizadas en México no trajeron beneficios a la población, sino que estos se destinaron a los países primermundistas. A nivel de investigación de la salud en 1996 en el “research and development” de la OMS mostró que anualmente de los 50 – 60 millones de dólares gastados tanto en el sector privado como público solo el 10% sirven para la resolución de problemas de salud del 90% de la población mundial; datos que se reafirmaron en el año de 2004 en la misma cumbre que se llevó a cabo en la Ciudad de México, sólo que la inversión aumentó a 100 millones de dólares.¹⁸

El uso de animales en la investigación ha permitido grandes avances en el conocimiento y en el desarrollo de las ciencias biomédicas. Sin embargo el hecho de realizar experimentos con seres vivos capaces de sentir dolor, implica una responsabilidad hacia ellos por parte de la comunidad científica. Estas experimentaciones requieren de normas y lineamientos éticos que les aseguren condiciones mínimas de sufrimiento y maximizar su bienestar.¹⁸

El dolor de los animales también es una respuesta emotiva a un estímulo sensorial aversivo por lo tanto no existe razón para suponer que la experiencia de dolor sea demostrado diferente entre el humano y las especies que tienen un Sistema Nervioso parecido.¹⁸

En este proyecto se contó con toda la atención médica a los equinos utilizados para la investigación, abarcando los siguientes puntos que la Comisión Nacional de Bioética estipula hecho por el Comité Específico de Bioética: ¹⁹

- Los procedimientos se realizaron con plena seguridad, con contención física y sólo en los casos que lo ameritaba con contención química, conocimientos previos de los procedimientos y bajo la supervisión de un MVZ especialista en equinos.
- En procedimientos no tan invasivos, el equino se mantuvo en el área donde vive, para evitar estrés por separarlo de los demás equinos con los que vive.
- Durante los procedimientos invasivos se utilizó tanto un sedante (Xilazina), como un anestésico local (lidocaína 2%) en el área a puncionar.
- Como son caballos que pertenecían al departamento de Medicina, Cirugía y Zootecnia para Équidos de la FMVZ-UNAM, se mantuvieron en monitoreo constante, viviendo en condiciones buenas, alimentados y cuidados de manera óptima.

MEDICINA REGENERATIVA Y TERAPIA CELULAR

El comienzo de esta rama es en 1957 con los trabajos de Ed Thomas, que empezó con el trasplante de médula ósea. En los años 70^s Fridstein describió por primera vez la presencia de las células adherentes en médula ósea, capaces de originar hueso y cartílago. A lo largo de los años 80^s fueron caracterizando estas células y en 1987 Friedstein demostró de manera *in vitro* sus propiedades (proliferación, auto-renovación y multipotencialidad) y las denominó por primera vez como “célula troncal estromal”; pero fue hasta 1998 cuando Fortier y Cols lograron aislar, cultivar y expandir las CTM equinas.³

La medicina regenerativa es un campo interdisciplinario de investigación y aplicaciones clínicas, el cual se centra en el proceso de reparación, sustitución o regeneración de las células, tejidos u órganos. Para restaurar o restablecer estas funciones biológicas alteradas por diversas causas que incluyen mal formaciones congénitas, enfermedades o traumatismos.^{1, 2, 3} La restauración funcional de los tejidos se pretende alcanzar mediante alguno de los siguientes puntos:

- Estímulos de los propios mecanismos del cuerpo para reparar los tejidos dañados (CT, factores de crecimiento y terapia inmunomoduladora).³
- Reemplazando la matriz extracelular (mallas biológicas).³
- Reemplazo total de los tejidos u órganos creados *in vitro* (ingeniería de tejidos).³

El objetivo final de lo antes mencionado, es llegar a conseguir una curación funcional y total, y de este modo pasar de una simple cicatrización a una completa regeneración.

Algunos enfoques y áreas que incluye la medicina regenerativa son el uso de Células Troncales, Moléculas Solubles, Ingeniería genética, Ingeniería de tejidos y Terapia Celular Avanzada.²

En esta área no solamente abarca CTM, sino existen otros “Productos” que se utilizan como tratamientos terapéuticos, por ejemplo:

- Aspirado de médula ósea sin cultivar: en algunos equinos lo utilizan en osteosíntesis, artrodesis y cirugías maxilofaciales, en otros lo están usando para algunas lesiones en tendones y ligamentos, a pesar de que se han sugerido riesgos de formación de islotes óseos.³
- Fracción vascular estromal derivada de grasa: en el 2001 se publicó un trabajo donde del tejido adiposo se logró aislar CTM y diferenciar a otros linajes celulares, de ahí se empezó a comercializar; sin embargo en otros estudios no se han visto diferencias significativas con este derivado y el grupo control, en caballos con osteoartritis inducida.³
- Factores de crecimiento: son sustancias naturales producidas por el organismo, capaces de estimular el crecimiento, la proliferación y diferenciación celular. Son moléculas activas importantes en la regulación de una gran variedad de procesos celulares. Actualmente son más de 16 factores que existen y siguen en aumento con las nuevas investigaciones. El uso de estos va en incremento debido a que la obtención y concentración de estas moléculas es a partir de la sangre del caballo.³

- Fracción de Plasma Rico en Plaquetas (PRP): se basa en aumentar la concentración de plaquetas del plasma (mediante centrifugación), incrementando así su concentración en diversas moléculas activas derivadas de estas células sanguíneas. Las plaquetas son una fuente vital de factores de crecimiento, quimiocinas y citocinas, que son liberadas durante los procesos reparativos que ocurren en las primeras fases de la reparación de la lesión. El PRP se inyecta intralesional y guiado por ecografía, una o varias veces.³
- Suero Autólogo Condicionado (IRAP): consiste en incubar sangre completa con esferas de vidrio cubiertas desulfato de cromo, se adiciona una proteína denominada IL-1ar o IRAP (proteína antagonista de receptores de interleucina) que actúa como antagonista de la IL-1, que es una citocinaproinflamatoria especialmente activa en equinos con osteoartritis incipiente.³

La Terapia Celular está basada en un concepto de poblaciones celulares multi o pluripotenciales puestas en el tejido dañado, pudiendo proliferar, diferenciarse y organizarse espacialmente de manera que los resultados sean una estructura y funcionamiento normal del tejido.⁸ En medicina humana se están usando en diversas áreas, sin embargo, en equinos sólo se está aplicando en afecciones del sistema músculo-esquelético.^{1, 7, 9, 20, 21, 22} La primera vez que se usó la terapia celular que fue publicada fue en el año 2002 por Hertel y lo uso para el tratamiento de desmitis del ligamento suspensor del menudillo.⁷

El objetivo es lograr una reparación funcional y total para pasar de la cicatrización a la completa regeneración y así disminuir el riesgo de nuevas lesiones ⁴. Aunque desgraciadamente en la ciencia de la terapia celular específicamente de CTM y en la parte clínica que es el potencial para la regeneración de tejidos, la medicina veterinaria presenta un nivel de atraso debido a que son pocos los años que se ha mostrado interés en la biología de las CTM, ingeniería de los tejidos y su aplicación en el campo terapéutico. ⁶ El uso de las CTM puede llegar a ser la clave de la regeneración celular de forma natural, enfocado al potencial de nuevos cultivos de tejidos y órganos, reemplazando el daño o enfermedad del tejido; ya que se ha visto que las CTM tienen un potencial de revolucionar el tratamiento de enfermedades ortopédicas equinas, pues como se ha mencionado tienen la habilidad de renovarse y diferenciarse a varios tipos de tejidos bajo condiciones específicas.

⁴ Las investigaciones realizadas se han hecho en su mayoría en humanos y animales pequeños de laboratorio, pero en caballos se ha hecho muy poco. Aún cuando las grandes especies son esenciales como modelos pre-clínicos en la medicina humana, debido a que son atletas de alto rendimiento y a diferencia de otras especies como suinos y ovinos donde se requiere inducir la lesión, los equinos sufren de estas lesiones ortopédicas en condiciones naturales.

La terapia de CTM en caballos está enfocada principalmente a tendinopatías y osteoartritis, ya que tanto el tendón como el cartílago son tejidos con pobre capacidad de regeneración intrínseca, produciendo un tejido de reparación el cual es fibroso; este tejido fibroso provoca un problema atlético. ⁸

Pero como en todo existen disyuntivas, en evaluaciones que se han hecho mostraron que el tratamiento a base de CTM se ve una aparente mejoría en las tasas de relesiones en caballos en comparación con los grupos control histórico, cosa que apoyaría este tipo de terapia; sin embargo en un estudio reciente experimental no se pudo identificar una respuesta positiva en relación con la síntesis de la matriz con el tratamiento.⁹

En un experimento de la Dra. Fortier, hicieron dos grupos a los cuales se les indujo osteoartritis (OA), a uno se le trató con BM-SCM (células troncales mesenquimales de médula ósea) y al otro grupo con la fracción estromal vascular de derivado adiposo (AD-SVF). A ambos grupos se les aplicó una inyección directa en la lesión 14 días después de inducirla, los resultados más sobresalientes fueron los siguientes:

| A) BM-SCM | B) AD-SVF |
|------------------------|------------------------------|
| Menor efusión sinovial | Mayor efusión sinovial |
| Menos síntesis de PGE2 | PGE2 en niveles más elevados |

Osteoartritis inducida y tratada con BM-SCM (células troncales mesenquimales de médula ósea) vs AD-SVF fracción estromal vascular de un derivado adiposo.

Aunque no se observaron diferencias en las bioquímicas, histologías de los cartílagos, en los análisis del líquido sinovial y en otros parámetros clínicos, se observó que las concentraciones de las PGE2 en el líquido sinovial en el tratamiento con BM-CTM disminuyeron. Siendo la PGE2 un mecanismo por el cual la MO regula células inmunes y ejerce efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores, como el de suprimir la proliferación de los linfocitos y actividad de las células T.⁷

El artículo de Roger K.W. Smith en donde a caballos de carreras con tendinitis del tendón flexor superficial a unos se trataron con CTM y a otros con solución salina fisiológica. Concluye que el tratamiento con CTM parece reducir las tasas de nuevas lesiones en el tendón flexor digital superficial en caballos de carreras, pues en los parámetros morfológicos, mecánicos y compositivos hubo mejoría. ¹

Se cree que la terapia celular tiene diferentes efectos los cuales derivan de una doble acción:

A. INTEGRARSE AL TEJIDO DAÑADO: Esto se puede hacer de tres formas:

1) Migración o “Homing” que es la capacidad de las CTM de dirigirse al tejido diana. 2) Injerto o “Engraftment” es la capacidad de incorporarse a un tejido u órgano (no implica necesariamente funcionalidad celular). 3) Nidación o “Niche” es el ambiente que permite que las células se diferencien (factores paracrinos y autocrinos) y hay una reparación funcional. ³

B. FUNCIONES SECRETORAS DE MOLÉCULAS ACTIVAS: La actividad regenerativa de las CTM se lleva a cabo por sus efectos paracrinos y de señalización celular y no tanto por su capacidad de diferenciación y proliferación en su “nicho”.

Los principales efectos de la actividad terapéutica y regenerativa de las CTM son antiapoptosis, quimioatracción, angiogenesis, efecto anti-fibrosis, permitir el crecimiento y diferenciación de células progenitoras; y por último la inmunomodulación (alto poder antiinflamatorio en fases agudas). ³

MÉDULA ÓSEA

Es un órgano difuso y altamente activo, que se ajusta a las necesidades del organismo. En una persona adulta produce alrededor de 2.5 billones de hematíes, 2.5 billones de plaquetas, un billón de granulocitos por kilogramo de peso corporal de manera normal. Esta se localiza en el conducto medular de los huesos largos y las cavidades de los huesos esponjosos. Existen dos tipos de médula: roja o hematógena, que debe su color a los hematíes en las diversas fases de maduración; y la amarilla que es rica en adipocitos y no producen células sanguíneas, este tipo de médula se va formando cuando el individuo va creciendo, debido a que la médula roja va perdiendo la capacidad para generar células de la sangre.²³

Médula ósea roja:

Está formada por células reticulares, asociadas con fibras reticulares (colágeno tipo III). Estas células y fibras forman un tejido esponjoso surcado por numerosos capilares sinusoidales.

La liberación de las células de la médula hacia la sangre está controlada por los factores de liberación, que son moléculas producidas en respuesta a las necesidades del organismo. Algunos de los factores de liberación es el C3 del complemento (un conjunto de proteínas de la sangre que actúa de forma secuencial como una cascada, para identificar y destruir agentes invasores), también se encuentran hormonas como los glucocorticoides y andrógenos.^{2, 23}

MATRIZ EXTRACELULAR

Es un entramado de moléculas, proteínas y carbohidratos que se disponen en el espacio intercelular que es sintetizado y secretado por las propias células. La matriz del hueso contiene colágeno tipo I y III, fibronectina, hemonectina (es la que interactúa con los receptores celulares fijando transitoriamente las células), cristales de fosfato cálcico, proteoglicanos y glicoproteínas.²⁴

Sus principales funciones son: mantener la forma de las células, aportar propiedades mecánicas a los tejidos, permitir la adhesión de las células para formar tejidos y modular la diferenciación y fisiología celular (figura 1).²⁴

MICROAMBIENTE

Ninguna de las células que existen crecen como unidades autónomas e independientes, sino que están rodeadas por el microambiente de la medula ósea. Este microambiente consiste en una estructura tridimensional altamente organizada que incluye diversos tipos celulares y sus productos, las interacciones célula-célula y por último la exposición a combinaciones y concentraciones variables de citocinas y quimiocinas, las cuales regulan la localización y el destino de las células hematopoyéticas.²⁵

Para que sea llamado “nicho” se ha propuesto la necesidad de cubrir dos criterios: que en él residan las CT *in-vivo* y el otro que promueva su mantenimiento. El nicho es un sitio anatómico donde se localizan las CT y es regulada su fisiología, se ha visto que existen al menos dos tipos: el osteoblástico y el vascular. El primero se localiza en el endosteo, en la

interfase del hueso y la médula ósea.²⁵ Este tejido está constituido por una capa de osteoblastos y algunos osteoclastos en equilibrio dinámico. Los osteoblastos expresan factores que presumiblemente mantienen los números de células troncales hematopoyéticas (CTH) en la MO, incluyendo reguladores positivos y negativos mientras que los osteoclastos producen factores de crecimiento y quimiocinas que son críticos para el mantenimiento y la localización de las células hematopoyéticas dentro de la MO. Por otro lado el nicho vascular reside alrededor de los sinusoides, los cuales son vasos sanguíneos especializados que transportan circulación venosa y a través de su endotelio las células hematopoyéticas pueden entrar y salir de la circulación. El ambiente perivascular en la MO parece estar marcado también por células reticulares que promueven la estancia de las CT. Las CTM parecen contribuir sustancialmente a la creación de nichos hematopoyéticos.²

ASPIRADO DE MÉDULA ÓSEA

Durante el desarrollo embrionario las cavidades de la médula ósea se forman cuando el modelo del cartílago de huesos es invadida por vasos sanguíneos con calcificación provisional del cartílago, seguido por las células osteoblásticas que forman una cavidad hueca dentro del “marco jurídico” del cartílago.

La función normal de la médula ósea es el mantenimiento de un volumen del tejido hematopoyético apropiado para cada individuo. Cada linaje de células de la médula tienen cadenas específicas de factores inductores que actúan para inducir la diferenciación de las CT y la maduración de la progenie.²³ En la homeostasis de la hematopoyesis, existe

una relación constante de 1:4 entre la proliferación celular de la MO y su progenie en la maduración celular.²³

En las evaluaciones de médula podemos encontrar hasta 25 tipos celulares morfológicamente diferentes.

Regularmente el aspirado de la MO se ha venido haciendo para evaluación hematopoyética de los equinos, sin embargo como se ha mencionado anteriormente el auge que tiene este tratamiento en la medicina regenerativa y la utilización de CT, a provocado que este procedimiento se realice con mayor frecuencia.²⁴ El procedimiento se debe hacer con el paciente bajo sedación y en un lugar apto para manejarlo de manera sencilla y así minimizar riesgos tanto para el caballo como para el médico que lo realizará.

Para el aspirado se recomienda una aguja de Jamshidi o Rosenthal de 13-15G y de 5 cm de largo, para una muestra con mayor cuerpo se requiere del uso de agujas del calibre 11-13G. El sitio donde se pueden hacer los muestreos es en el sector craneal del esternón, la tuberosidad coxal y el tercio dorsal de las costillas; son lugares donde la actividad hematopoyética se mantienen de por vida, siendo el esternón el de mayor frecuencia para su muestreo.

El muestreo del esternón se hace sobre la línea media ventral, entre los dos codos (entre 3ª y 5ª esternebra), una vez seleccionado el sitio se rasurará el área y se preparará todo de manera aséptica, inyectando posteriormente anestésico local subcutáneo. Se realiza con una hoja de bisturí número 11, una pequeña incisión de la piel para que la aguja con el estilete no lleve los contaminantes de piel al introducirlo. Al llegar al esternón se realizan

movimientos giratorios con una presión firme y constante, se introducirá de 1 - 1.5 cm, al llegar se retira el estilete y se acopla una jeringa de 20 mL previamente heparinizada. Para reducir el riesgo de que la muestra se contamine con sangre periférica es necesario hacer el aspirado de forma enérgica, haciendo la succión cuando la sangre sea evidente en la jeringa. De manera inmediata se tiene que empezar a homogenizar la muestra con el anticoagulante para preservar la morfología celular y evitar la formación de coágulos. La muestra se debe procesar lo más rápido posible y si se necesita trasladar se hará bajo condiciones de refrigeración.

Las complicaciones del aspirado/biopsia de MO son poco frecuentes. Las infecciones iatrogénicas se evitan haciendo el procedimiento con una técnica estéril, el exceso desangrado es uno de los problemas que pudiera presentarse, así como: neumotórax, hemotórax y laceraciones cardiacas, si se lleva a cabo por costilla o esternón; la probabilidad que existe de causarlas se disminuye utilizando agujas menos largas o el ultrasonido para determinar que no se encuentre entre esternebras.

Las complicaciones de tomar la muestra en las costillases similar alas del esternón.La técnica más segura es la de la tuberosidad coxal tanto para el examinador como para el paciente, aunque también se ha asociado a un menor número de complicaciones, tiene la desventaja de que en caballos geriátricos la colección de médula ósea es más difícil siendo los primeros 5ml son los más importantes.^{26, 27, 28, 29}

HEMATOPOYESIS

Es la producción de células sanguíneas y es un proceso complejo a través del cual las células troncales hematopoyéticas proliferan y se diferencian dando lugar a los distintos tipos de células maduras circulantes (eritrocitos, granulocitos, linfocitos, monocitos y plaquetas). Tiene lugar en la médula ósea, en donde una intrincada red de células estromales y sus producciones regulan cada una de las etapas que conducen a la generación de células primitivas, intermedias y maduras. Diariamente se producen en el organismo cantidades extraordinarias de células sanguíneas.^{2, 23}

Para su estudio es más sencillo dividirlo en compartimentos:

El primero corresponde a las células más primitivas, llamadas Células Troncales Hematopoyéticas (CTH). Estas tienen dos características funcionales que las distinguen: la capacidad de auto-renovarse y la de ser multipotenciales². Además presentan antígenos de superficie denominados: CD34, CD90, CD117 y CD133.²

Estas células dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), las cuales han perdido su capacidad de auto-renovación pero conservan su potencial proliferativo. Pueden llegar a ser multipotenciales o estar restringidas a dos o a un sólo linaje. Lo anterior forma el segundo compartimento del sistema hematopoyético. Las CPH dan lugar a las células precursoras que son reconocibles por su morfología y son el tercer compartimento las cuales constituyen la gran mayoría de las células de la médula ósea, estas células al madurar darán origen a las células circulantes que es el último compartimento.²

Las células de la sangre se dividen en dos grandes grupos: Mieloides y Linfoides.

El grupo mieloide comprende a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), monocitos, eritrocitos y trombocitos. Estas son producidas a través de un proceso conocido como mielopoyesis. El grupo linfoide lo integran los linfocitos B, linfocitos T y células NK; el proceso de producción de estas células se llama linfopoyesis.^{13, 23, 30, 31}

MIELOPOYESIS

Este es un proceso que se lleva dentro de la MO, las células encargadas de realizarlo son los progenitores mieloides comunes (PMC). Los PMC son células con una alta capacidad proliferativa, pero incapaces de auto-renovarse y cuyo potencial de diferenciación está restringido a un determinado tipo y número de citocinas. Los PMC se pueden ir diferenciando a otros progenitores más específicos, como los granulo-monocíticos (PGM), y los eritroides-monocíticos (PEM). La maduración posterior en cada uno de los linajes hematopoyéticos está definida por dos procesos fundamentales: la pérdida definitiva del potencial de auto-renovación y la adquisición de una identidad específica. Estos procesos son controlados por programas genéticos en donde los genes que regulan la diferenciación se encienden y los que mantienen la capacidad de auto-renovación se apagan. Los Progenitores Granulo-Monocíticos incluyen unidades formadoras de colonias granulo-monocíticas, que a su vez dan origen a unidades formadoras de colonias granulocíticas (CFU-G) y unidades formadoras de colonias monocíticas (CFU-M). Las CFU-G dan lugar a los mieloblastos, promielocitos, mielocitos, metamielocitos, promielocitos, mielocitos y células maduras (eosinófilos, neutrófilos y basófilos). Las CFU-M dan origen a los monoblastos, promonocitos, monocitos y macrófagos.^{2, 23, 28}

CITOCINAS

En todo el proceso de la hematopoyesis las células de linaje mieloide son reguladas por un amplio número de citocinas, entre ellas están: el factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de estimulación de colonias de monocitos (M-CSF), interleucina-3 (IL3), IL-6 y el factor de células seminales (SCF).^{23,32}

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular, secretadas al inicio de la activación celular por diferentes leucocitos, principalmente linfocitos T (LT), CD4+ cooperadoras y células presentadoras de antígenos como los macrófagos y células dendríticas, así como otros leucocitos, células endoteliales y epiteliales, todo es en respuesta a diferentes estímulos.³²

La función principal de las citocinas es la regulación de diversas funciones celulares como activación, diferenciación, proliferación, quimiotaxis, secreción y degranulación, entre otras. También contribuyen al desarrollo de células efectoras como macrófagos activados, células plasmáticas y células T CD8+ citotóxicas; y algunas tienen funciones efectoras directas donde logran inducir a muerte celular por apoptosis.³²

Funcionan como moléculas mensajeras intercelulares que inducen una actividad biológica en particular después de unirse a su receptor en una célula blanco competente, es decir que expresan receptores específicos.³²

Algo importante de mencionar es que las citocinas frecuentemente inducen la síntesis de otras citocinas, lo que resulta en una cascada de efectos en las que las citocinas producidas en estadios posteriores en la cascada, pueden influenciar la respuesta a las citocinas producidas en los estadios tempranos.³²

En el cuadro 1 se muestran las principales citocinas, sus células de origen, las células blanco y la función principal que llevan a cabo.³²

Tienen un papel fundamental en la comunicación entre diferentes tipos celulares y son secretadas por diferentes células. Algunas son llamadas INTERLEUCINAS (IL) que nos indican que son secretadas por leucocitos y permiten la comunicación entre estos y con otras células, actualmente se conocen 35 interleucinas (IL1- IL35). Existen otras citocinas como el FACTOR de NECROSIS TUMORAL (TNF- α) y los INTERFERONES (IFN- α , IFN- β , IFN- γ). Hay otras que son agrupadas bajo el término de QUIMIOCINAS que incluyen a la IL8 y 50 quimiocinas más, que han recibido nombres triviales o acrónimos como la Proteína Quimiotáctica para Monocitos-1 (MCP1), Proteína Inflamatoria para Macrófagos 1 α (MIP1- α) entre otros nombres; sin embargo todas las quimiocinas siguen una nomenclatura específica que consiste en las siglas CCL, CXCL, XCL y CX3CL. Actualmente el término citocina incluye todas las interleucinas, quimiocinas, interferones, factores de necrosis tumoral y algunas otras como los factores estimuladores de colonias (GM-CSF y G-CSF).³²

CÉLULAS TRONCALES

La célula troncal también es conocida como “*célula madre*”, “*stemcells*”, “*cellulesouches*”, “*celulestaminali*”, entre otras. Su definición está basada en las características funcionales debido a que no poseen características morfológicas diferentes para que se puedan distinguir del resto de las células del tejido al que pertenecen.^{2, 33, 34}

A continuación se citarán algunas definiciones que se han dado a lo largo del tiempo por diferentes autores:

- En 1896 Edmund Beecher Wilson dió el primer término: Célula Germinal Primordial Inactiva Mitótica.⁶
- En el 2004 y 2005 por Baksh y Ryan respectivamente, dijeron que las células deben tener dos características básicas: ser capaces continuamente de auto-renovarse y de tener la capacidad de diferenciarse en múltiples tipos de células especializadas.⁶
- En 2006 Weissman las nombro Unidades Naturales de Generación Embriónica o de Regeneración de varios tejidos (en adultos).⁶
- En 2011 Rosana Pelayo *et al.* la definieron como: célula inmadura, no diferenciada, con alta capacidad de auto-replicación y que puede diferenciarse en uno o más tipos de células especializadas con funciones específicas en el organismo.²

Por lo que se puede decir que una CT es: totipotencial, porque es capaz de crear un organismo completo; pluripotencial, las células crecieron del blastocito embrionario por lo que son capaces de diferenciarse en tres líneas germinales en mamíferos ectodermo, mesodermo y endodermo bajo condiciones de señalamiento específico; multipotencial, este

término se le da a las CT capaces de diferenciarse dentro de un número limitado de diferentes linajes. Son capaces de diferenciarse en más de un tipo de células especializadas y tiene plasticidad, que es la habilidad para conseguir madurez fenotípica hacia diferentes tejidos de diferente origen.^{6, 38}

Las CT tienen una división asimétrica, quiere decir que cuando hay división celular una de las dos células resultantes conserva casi en su totalidad las características biológicas de la célula original y la otra se convertirá en otro tipo de célula.

En la figura 2 representa la reducción de la plasticidad que va teniendo una célula mientras se vuelve más específica.

CÉLULA TRONCAL MESENQUIMAL

El Comité Internacional de Células Troncales Mesenquimales y Tejidos, establece que es aquella célula que tenga las siguientes características:

- Adherencia y plasticidad: son condiciones que deben mantener en el cultivo.
- Expresar antígenos de superficie: Positivos (CD105, CD73, CD90) y negativos (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79 α , CD19 y HLA-DR).
- Diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*.¹¹

Sus principales características funcionales son:²⁸

- Regeneración
- Soporte hematopoyético

- Capacidad inmunorreguladora
- Autorenovación
- Generar Progenitoras

Presentan una morfología tipo fibroblastoide (forma de huso), son clonogénicas y no fagocíticas.^{35,36}

Se localizan en diferentes tejidos como médula ósea, tejido adiposo, periostio, membrana sinovial, músculo esquelético, pulmón, cordón umbilical, sangre, piel (dermis), orejas, gelatina de Wharton, así como varios tejidos fetales.^{5, 6, 35, 36, 37}

En el cuadro 2 se muestran los diferentes tejidos en donde se pueden obtener CT y en qué tipo célula se pueden diferenciar.

El estudio de las CTM comienza en los años 60's. Los pioneros fueron Fiedenstein y Petrokova quienes descubrieron que las CTM se encuentran en el compartimento estromal de la médula ósea, sin embargo en medicina veterinaria este tema tiene pocos años que empezó a utilizarse. Su interés radica especialmente en el potencial del uso clínico en la reparación de heridas, ingeniería de tejidos y la aplicación en el campo terapéutico incluyendo la cirugía regenerativa.^{6, 35, 36}

Las CTM sólo ocupan un 0.001-0.01% del total del número de células nucleadas que están en la médula ósea.^{7, 36, 38}

Otra característica que presentan las CTM son sus antígenos de superficie como:

- Positivos: CD29, CD44, CD75, CD90, CD105.^{1, 4, 8, 38, 39}

- Negativos: CD14, CD34, CD45, CD79 α , HLA-DR I. ^{1, 4, 5}

En el cuadro 4 podemos ver los diferentes antígenos de superficie que tienen algunas de las células.

En médula ósea hay dos sistemas: el Hematopoyético, donde se forman las células de la sangre; y el sistema Estromal, que da soporte sobre el cual proliferan y se diferencian las células hematopoyéticas. En el sistema estromal se encuentran las Células Troncales Hematopoyéticas ^{2, 38} y macrófagos estromales que son los que expresan el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II) ²³.

En el sistema Estromal la población celular es heterogénea, que incluyen células reticulares, adipocitos, osteoblastos, células endoteliales, células vasculares, células del músculo liso de las paredes de los vasos sanguíneos y macrófagos; todos ellos participan de manera activa en la producción hematopoyética, debido a su secreción de proteínas de matriz extracelular y citocinas, tanto inhibiendo como estimulando; a todo esto también se le conoce como Microambiente o Nicho hematopoyético. Aquí se localizan las Células Troncales Mesenquimalescaplan A que es el papá de la Mesenquimal. ^{2, 38, 40}

La regulación de la producción de las células sanguíneas y de las CTM recae de manera importante en la capacidad que tienen de producir citocinas responsables de la proliferación y diferenciación de las CT y Progenitoras hematopoyéticas.

De las citocinas que se han detectado que participan en la diferenciación de las células hematopoyéticas son: IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15. ²

Como se mencionó anteriormente las CTM son capaces de regular la función de diferentes componentes del sistema inmune como linfocitos T (LT), células dendríticas, linfocitos B y células asesinas naturales (NK). Este efecto puede darse a través del contacto celular o mediante la secreción de diversos factores. Estudios *in-vitro* han demostrado una capacidad de inhibición de linfocitos T, generando un ambiente antiinflamatorio caracterizado por la presencia de LT reguladores y citocinas; así también, disminuye la producción de las células dendríticas, NK y linfocitos B.²

Su aislamiento generalmente se hace con el aspirado de médula ósea, sin embargo, Fernández reportó la detección de estas células en sangre periférica movilizadas con G-CSF en pacientes oncológicos.³⁷

CICLO CELULAR

El ciclo celular de las células eucariotas se divide en cuatro fases G₁, S, G₂ y M; en la fase G₁ las células son estimuladas por mitógenos o factores de crecimiento, llegando a la síntesis de DNA en la fase S y alcanzar G₂ que es el intervalo entre la culminación de la fase de síntesis y mitosis que es la fase M.

Se ha demostrado que las CT se encuentran en una fase G₀, es decir fuera del ciclo celular o en estado quiescente.²

- Fase G₁: En este punto la célula contiene dos copias de cada cromosoma, el estado diploide normal de una célula eucariota y después se desencadena el compromiso para dividirse.

- Fase S o de Síntesis: Replicación del DNA, las histonas y las proteínas no histonas se depositan sobre las moléculas hijas de DNA para reproducir las estructuras de la cromatina. Una vez terminando la replicación pasa a la siguiente fase.
- Fase G₂: En este periodo la célula tiene un contenido de DNA de cuatro veces la cantidad haploide. Y al final de esta etapa ya está preparada para iniciar el proceso denominado *mitosis*.

Estas tres fases llevan muchas horas en realizarse y se les denominan *interfase*, es aquí donde la cromatina está dispersa por todo el núcleo y ocupada activamente en la transcripción.

- Fase M o Mitosis: La mitosis es un proceso de varias etapas (profase, metafase, anafase y telofase) y es donde se divide la célula
- Fase G₀: esta es una fase de quiescencia, donde las células se quedan detenidas en la fase G. ^{24, 38, 41}

En la figura 3 esta representado el ciclo celular donde se incluye la etapa G₀

FACTORES DE ESTIMULACIÓN DE COLONIAS

Existen factores que estimulan la hematopoyesis, hay cuatro factores de estimulación de colonias clásicos: Interleucina 3, Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos y Monocitos (GM-CSF), Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos (G-CSF) y Factor de Estimulación de Colonias de Monocitos (M-CSF o CSF-1)^{3,20, 52}. Son un grupo de glicoproteínas de bajo peso molecular y entre ellos son significativamente homólogos en las proteínas y niveles de nucleótidos.^{25, 43} Todos estos están clasificados como citocinas que regulan el crecimiento, desarrollo y función hematopoyética de linajes celulares²⁴, capaces de inducir la sobrevivencia y proliferación de células progenitoras hematopoyéticas, conduciéndolas hacia linajes específicos dependiendo de la combinación de los factores empleados.⁴²

En el cuadro 3 estan los principales factores de estimulación hematopoyética, las células que lo producen y su principal actividad.

FACTOR DE ESTIMULACIÓN DE COLONIAS DE GRANULOCITOS

(G-CSF)

Es una proteína recombinante que actúa sobre los neutrófilos, que son los cuerpos de mayor defensa durante infecciones. Es producido por macrófagos, monocitos, células endoteliales, fibroblastos y células del estroma en médula ósea, y es inducido de forma natural por la exposición a proteínas de paredes bacterianas, endotoxinas y citocinas inflamatorias.¹⁴

El aislamiento, purificación y clonación de los factores de estimulación de colonias fueron hechos para una nueva clase de agentes terapéuticos. En 1983 fue descubierto el G-CSF, pero entre los años 1984 y 1986 se realizó la purificación y clonación molecular de éste; a partir de 1986 su utilización y desarrollo clínico inicio. Inicialmente fue identificado como un factor de crecimiento capaz de soportar la proliferación clonal de progenitores granulocíticos normales.⁴⁴

El Filgrastim es el más utilizado por que se ha visto que es el factor de menor toxicidad en humanos. 18 Comenzó siendo administrado a pacientes oncológicos tratados con quimioterapia; se usaba para amortiguar la neutropenia, que es el primer efecto adverso que causa la quimioterapia.⁴⁵⁻⁴⁷

El G-CSF (endógeno) es indispensable para mantener el balance cuantitativo normal de la producción de los neutrófilos, juega un papel importante en la granulopoyesis de emergencia durante infecciones. Ya que actúa de manera selectiva y específica en la estimulación y proliferación de neutrófilos precursores.⁴⁷

El G-CSF o Filgrastim (exógeno) puede ser administrado vía intravenosa o subcutánea, por bolo o en infusión; causando neutrofilia. Su mecanismo de acción es en las células de médula ósea, reduce el tiempo de maduración de los neutrófilos de 5 días a 1 día para que salgan a circulación, también aumenta el número de células progenitoras circulantes de una forma dosis dependiente.^{14, 46, 47} Es un inmunomodulador que induce la proliferación y diferenciación de las células progenitoras de granulocitos y aumenta el rango de producción de neutrófilos.^{15, 48} También estimula la producción de varios tipos de tejidos como

fibroblastos, células endoteliales, células T, macrófagos, células mesoteliales y epiteliales, así como las tumorales .¹⁵

El conteo celular aumenta entre 4 y 6 horas después de la administración, alcanzando el G-CSF su pico de concentración entre las 4 a 12 horas (dosis dependiente).^{14, 47} Puede llegar a presentarse una disminución del conteo de células rojas y plaquetas, sin tener un efecto consistente en la hemoglobina y hematocrito, esta dependerá de la dosis administrada.

Presenta una distribución principalmente a médula ósea, glándulas adrenales, riñones e hígado.¹⁴ Tiene un patrón bifásico de eliminación de la circulación después del bolo y la infusión a corto plazo. Tiene una vida media de 3 a 10 minutos inicialmente y de 1 a 2 horas durante la segunda fase.¹³

Una de las complicaciones al usarlo es la producción de anticuerpos y al desarrollar estos contra el G-CSF exógeno puede reaccionar también con el endógeno, pues el producto que se usa es recombinante de humanos.

El factor en medicina veterinaria es utilizado en la clínica de pequeñas especies (perros y gatos) como quimioterapéutico, para disminuir la duración de la neutropenia y la incidencia de infecciones de origen viral principalmente, así como para la movilización de células; siendo administrado vía intravenosa o subcutánea.^{1, 7, 17, 27}

Este factor en caballos se ha usado para el tratamiento y profilaxis de neutropenia causada por septicemia, endotoxemia e hipoplasia linfoide inducida por fármacos.¹⁷ Sin embargo aun está muy limitado el uso en la veterinaria, debido a que las publicaciones de su uso son mínimas.

Justificación

La necesidad de obtener células mesenquimales para su uso en la terapéutica veterinaria por medio de la generación de métodos menos invasivos, produce la necesidad de explorar el uso del factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos para la movilización de poblaciones celulares de médula ósea a sangre periférica; siendo este un modo más sencillo y con menos riesgos para el paciente ^{12, 13}. De modo que al estandarizar un método de obtención menos invasivo, representa una mejora significativa en la terapia celular reduciendo el riesgo y complicaciones de la punción directa de médula ósea. ¹²

Hipótesis

Dado que el G-CSF moviliza las poblaciones de células mesenquimales a partir de médula ósea a sangre periférica, su utilización en un modelo experimental equino movilizará de igual manera células mesenquimales a sangre periférica, se hará la caracterización de las poblaciones celulares obtenidas y posteriormente se conseguirá darles un uso terapéutico.

Objetivos

Objetivo General

- Analizar las poblaciones celulares obtenidas de sangre periférica movilizada con el factor de estimulación de colonias de granulocitos para determinar si fueron movilizadas las células troncales mesenquimales de médula ósea.

Objetivos Particulares

1. Observar mediante hemogramas, el efecto causado post administración del factor de estimulación de colonias de granulocitos.
2. Determinar el día en que probablemente se obtendrá un mayor número las células troncales mesenquimales.
3. Analizar la presencia de marcadores de células troncales mesenquimales al cultivo en el primero, segundo, tercer y cuarto pase.
4. Evaluar el fenotipo de las células obtenidas por medio de microscopía óptica de luz.
5. Lograr cultivar y expandir las CTM movilizadas de las muestras sanguíneas.

Material y Métodos

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en el Departamento de Medicina Cirugía y Zootecnia para Équidos (DMCZE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), donde se utilizaron 6 equinos tomados al azar, de raza mestiza, con un promedio de edad de 7 años (± 1.41), un peso promedio de 357.5 kg (± 19.94), con una dieta basada en forraje de heno de avena que se les ofrece tres veces al día y con agua a libre acceso. Se trabajó con 2 hembras, 3 caballos castrados y 1 caballo entero; los cuales fueron elegidos con las siguientes características: al azar y libres de estrés. Todos fueron evaluados con un examen físico general previo al inicio de la investigación, se vacunaron y desparasitaron a su arribo, determinando así que eran clínicamente sanos y se corroboró con un hemograma de control.

Administración del Factor de Estimulación de Colonias de Granulocitos.

De los seis caballos que forman parte del proyecto se dividieron en dos grupos el “*experimental*” y el “*control*” teniendo tres caballos en cada grupo. Se inició con el grupo experimental, a los que en el día 0 se les tomaron tres muestras sanguíneas en tubos al vacío (Vacutainer, Becton and Dickinson, Mex): uno con ácido etilén diamino tetracético (EDTA), otro con heparina y el último sin anticoagulante; haciendo antes el embrocado en tres tiempos con yodo povidona y alcohol etílico. Posteriormente se les administró en la tabla del cuello vía subcutánea (SC) el G-CSF (Imunef Filgrastim, TEVA) utilizando la dosis de 3 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. La administración del fármaco se hizo diario por tres días y a la misma hora.

Quedando los equinos en observación en el Hospital para Équidos, del DMCZE de FMVZ, con la finalidad de que sean vigilados todo el tiempo y saber si llegan a presentar algún tipo de reacción al fármaco, ya que el Filgrastim es fabricado como una proteína recombinante de uso humano.

Muestras de Sangre de la Vena Yugular

Como se mencionó anteriormente el primer día se tomaron tres muestras de sangre. Los tubos con EDTA se mandaron al laboratorio de patología clínica donde se hicieron los hemogramas, el tubo con heparina se procesó en el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) para la citometría flujo, el conteo y cultivo de CTM y por último el tubo sin anticoagulante se usó para obtener el suero y poder correr la prueba de ELISA para saber la concentración de G-CSF en sangre después de su administración.

El suero obtenido del tubo sin anticoagulante, se mantuvo congelado por el periodo experimental para tener todas las muestras y correrlas al mismo tiempo ya que se utilizaría un kit de ELISA.

Aspirado de Médula Ósea del grupo control

Se les realizó este procedimiento con la finalidad de comparar las CTM de médula ósea con las CTM movilizadas del grupo experimental, con la intención de ver si existe algún tipo de modificación en las células al ser estimulada la médula. Se colocó al caballo en una manga de contención o de manejo, se palpó el esternón hasta el hueso xifoides y se siguió hasta

llegar a la parte más plana del esternón que es aproximadamente entre la 3ª y 5ª esternebra, se rasuró un área de 10 cm aproximadamente, se embrocó con yodo povidona y alcohol etílico en tres tiempos, en el segundo lavado se realizó un bloqueo local con lidocaína al 2% (1 mL), y se continuó con el lavado; para la sedación se utilizó Xilazina al 10% que es de la familia α 2-adrenérgicos en dosis de 1.1mg/Kg IV. Utilizando guantes estériles se tomó una aguja de calibre 16G x 3.5 cm de largo (especial para el aspirado de médula ósea), se revisó que corra bien el estilete, con una hoja de bisturí número 11 se realizó una incisión exclusivamente de la piel (sólo con la mitad de la hoja), ya con la incisión hecha se introduce la aguja de manera perpendicular, cuando se siente el “Tope” se realiza un movimiento giratorio y al mismo tiempo se ejerce presión hasta sentir que se ha perforado el hueso; se retiró el estilete y después con una jeringa de 20 mL previamente heparinizada (con 1000 UI de heparina por mL de médula ósea), se conectó la jeringa y se jaló el embolo para crear vacío y así “aspirar”. Una vez obtenidos los 20 mL se homogenizan bien y se mantiene en refrigeración. Es importante que durante el aspirado se vea en la jeringa pequeños cúmulos de grasa, si no se observan, es probable que sea sangre completa, por lo que se puede pensar que se haya perforado un vaso o el corazón. Después se volvió a colocar el estilete, se retiró toda la aguja y se selló la incisión con aluminio micronizado en spray (aluspray). Terminado el procedimiento se quedaron en observación para ver si presentaban algún problema o complicación.

Aislamiento de las células

En el Instituto Nacional de Rehabilitación, las muestras sanguíneas obtenidas en los tubos vacutainer de heparina fueron procesadas dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA), cada muestra se colocó en tubos de polipropileno para centrífuga con capacidad de 50 mL, el volumen de muestra vertido en cada tubo fue de 10 mL, de tal forma que de cada una tendrá 5 tubos; esto para hacer una dilución 1:4 con solución salina fosfatada (PBS) [Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA], adicionada con antibióticos/antimicóticos al 1%, penicilina 10,000 UI, estreptomicina 10,000 µg y anfotericina B 25 µg. Al mismo tiempo se vertió 15 mL de Ficoll Paque^{MR} (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) en tubos nuevos de polipropileno de 50 ml y se vertieron 25 mL de la muestra diluida de sangre y PBS; quedando un volumen final de 40 mL, posteriormente se centrifugó a 400 xg por 30 minutos. Después de centrifugarlos, en el tubo de polipropileno de 50 mL se observaron 4 fracciones en el fondo del tubo: los eritrocitos, la siguiente fracción es el Ficoll Paque, sigue la capa de células linfoides y el sobrenadante que consiste en un poco de suero con PBS. Eliminando el sobrenadante, se tomaron las células que quedaron en la interface linfoide y se lavaron; este procedimiento consiste en diluir la interface tomada con PBS (alrededor de 10 ml, ya que al obtener la interface celular se arrastra suero y Ficoll Paque en un total de 5-8 ml aproximadamente) y se centrifugó a 200 xg por 10 minutos, posteriormente se eliminó el sobrenadante. Las células una vez lavadas, se contabilizaron, utilizando un colorante de viabilidad llamado azul tripano. Sabiendo el número total de células, se dividió en dos, una parte para su

análisis por citometría de flujo (marcadores de superficie) y la otra para iniciar su clonación *in vitro*.

Método Estadístico

Este es un estudio prospectivo, longitudinal, comparativo y experimental, con variables nominales; utilizando una estadística descriptiva.

Citometría de Flujo

Es una herramienta que se usa para el diagnóstico de diversas patologías, siendo el único con habilidad para la investigación de grandes poblaciones celulares heterogéneas y lograr llegar a una sola población y subpoblaciones. Se ha usado durante décadas por biólogos en estudios hematopoyéticos de células troncales; siendo reciente su adquisición y uso en México ya que apenas tiene 35 años que se introdujo y empezó a utilizarse.

Las células destinadas a los análisis de inmunotipificación por citometría de flujo, fueron suspendidas en PBS y puestas en contacto con los anticuerpos monoclonales para proteínas de superficie los cuales fueron marcados con un fluorocromo, gracias al cual el citómetro de flujo hace la lectura, evaluando las poblaciones celulares existentes en la muestra.

El procedimiento de marcaje se explica a continuación: una vez separadas las células del Ficoll y lavadas con PBS, una porción de aproximadamente 25×10^4 células son colocadas en tubos de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson) con 10 μ L de la suspensión de anticuerpos y se dejaron incubando 30 minutos a 4°C. Se utilizaron anticuerpos

monoclonales anti CD34, CD45, CD90, CD117, CD73, CD166 Y CD14 (BD, Pharmigen™).^{33, 35} Los datos son analizados por el software CellQuest PRO™ (BectonDickinson, Mex).

La técnica analítica permite evaluar con un método cuantitativo características celulares como tamaño, complejidad y fluorescencia emitidas mientras se les hace pasar a través de un rayo de luz y una suspensión celular. Identifica diferentes células con determinados marcadores que son fluorocromos conjugados con anticuerpos ya sea para superficies celulares o biomarcadores intracelulares. Actualmente ya hay más de 357 marcadores, cabe aclarar que ninguno es realmente único y específico de una sola célula. Los citómetros tienen una gama de colores que van de 4 hasta 12.³⁴

En el cuadro 4 se muestran los marcadores que se usan para los diferentes tipos de células.

Cultivo de CTM

Las células destinadas a cultivo de sangre periférica, se resuspendieron en un medio de cultivo base el cual es Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)/F12 enriquecido con 5% de suero fetal bovino (FBS: Trace Scientific Ltd., Melbourne, Australia, Uin:53141 Lot:B01249-500) y 1% de antibiótico/antimicótico a 37°C con 5% de CO₂, y se cultivó a una densidad de 8×10^3 por cm² en cajas T25 de cultivo de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson). Se dejaron dos semanas en expansión con cambio de medio de cultivo cada dos días utilizando DMEM/F12 enriquecido. Esta fase del cultivo es muy importante ya que da lugar a la proliferación celular y producción de precursores, para aumentar el tamaño de muestra y probar que el fenotipo de las células se mantiene a través del tiempo;

evaluando la morfología celular (fibroblastoide) y los marcadores de superficie al pase 3 y

4. Las condiciones de cultivo utilizadas en todos los experimentos son las mismas: 37°C al 5% de CO₂.

RESULTADOS

Los efectos del G-CSF en el hemograma

Los resultados observados en el hemograma se muestran a continuación por grupo y por individuo

Grupo Experimental:

En el día 2 se vió unaumentopromedioen el conteo celular del 572.46%; el aumento promedio de leucocitos fue de 223.88%, neutrófilos 380.70%, monocitos 1166.66% y eosinófilos 311.11%; y también se observó una disminución en los linfocitos del 25.88%.

1) Equino 1 (hembra): a las 24 horas se comenzó a ver un aumento, sin embargo no fue hasta las 48 horas que se obtuvo el mayor conteo celular (cuadro 5 y figura 4).

Día 1: el aumento general fue de 380.28% y el porcentaje de disminución de linfocitos fue del 44.07%.

Día 2: el aumento fue 1294.94%, el porcentaje de disminución de linfocitos del 52.55%.

Día3: el aumento fue 293.75%, el porcentaje de disminución de linfocitos del 50.85%.

2) Equinos 2 (macho): el monitoreo que se realizó a este equino fue en el día 0 y el día 2 exclusivamente (cuadro 6 y figura 5). El porcentaje que aumentó fue de 232.74% y el porcentaje de disminución en linfocitos fue de 4.66%.

- 3) Equino 3(castrado): de igual manera se realizó el monitoreo solo dos días el cero y el segundo día, en donde se observó lo siguiente: el aumento general fue de 189.70%, con un porcentaje de disminución de linfocitos del 20.45% (cuadro 7 y figura 6).

En los cuadros 5,6 y 7 están los hemogramas de los tres individuos donde se resalta con color rojo el aumento celular y en un solo equino se marca con azul la disminución de los linfocitos; en las gráficas 4, 5 y 6 se aprecian el comportamiento celular durante la investigación.

Grupo Control:

No se vió un aumento significativo ya que fue del 35.14%; ninguno de los equinos excedió el rango máximo en los valores manejados, pero si se observó un ligero aumento en los neutrófilos de un solo equino (castrado 9 años) que fue asociado al aspirado de médula que se le realizó.

- 1) Equino A (hembra): sus rangos estuvieron completamente normales.
- 2) Equino B (macho castrado): de igual modo no hubo variación significativa en sus hemogramas.
- 3) Equino C (macho castrado): sin cambios aparentes en el hemograma.

En los cuadros 8, 9 y 10 se observan los hemogramas que como se mencionó anteriormente no hay cambios significativos y en las figuras 7, 8 y 9 se hace la comparación de los días y de la médula ósea.

Cultivo Celular

Para realizar el cultivo se hizo un conteo inicial de las células mononucleadas de las muestras de sangre periférica, médula ósea y sangre periférica movilizada, en donde claramente se nota que la muestra de sangre movilizada contiene un mayor número de células (promedio de 26.37% mayor). A continuación se muestra el número de células contabilizadas en cada muestra:

Conteo celular promedio que se obtuvo.

- Sangre normal (día 0):
 - 7,680,000 mononucleares en 2mL

- Movilizada al día 2
 - 10,920,000 mononucleares en 2 mL

- Médula ósea
 - 8,400,000 mononucleares en 2 mL

Al realizar el cultivo el pase 0 y 1 estuvieron normales, pero del pase 2 al pase 3 las células ya no presentaban una correcta adhesión ni crecimiento, aun cuando los antígenos de superficie coincidían con las células troncales mesenquimales; por lo que ya no se pudo realizar los últimos dos pases.

Citometría de Flujo

Se buscó de la compatibilidad que existe de los anticuerpos humanos con los del equino, pues no existen marcadores para equinos y se mostró que (uniPro1k8):

- CD14 humano y equino 74%
- CD34 humano y equino 68%
- CD45 humano y equino 39%
- CD90 es anti-equino 75%
- CD73 humano y equino 99%
- CD105 humano y equino 99%

Al tener esta compatibilidad de los marcadores nos da una confiabilidad al realizar las citometrías.

Grupo Experimental:

Se realizaron lecturas con el citómetro de las muestras de sangre movilizada de los días 0 y 2. La evaluación del citómetro muestra histogramas donde hay dos ejes, en cada eje se nombra el anticuerpo con el que se marcaron, y cada imagen tiene cuatro cuadrantes, el cuadrante superior izquierdo son todas las células positivas al anticuerpo enlistado en el eje de las ordenadas; en el inferior izquierdo son las que no son positivas a ninguno de los dos

anticuerpos; en el superior derecho se muestran las que son positivas a ambos anticuerpos de los ejes, y el inferior derecho son las positivas al anticuerpo enlistado en el eje de las abscisas.

En los histogramas obtenidos se observa un marcado aumento en el lado positivo de los marcadores tanto de CTM (coeficiente variación de 72.55%), como en los de células hematopoyéticas (coeficiente de variación 70.44%).

En las figura 10 se muestran algunos resultados de las citometrías realizadas al Grupo Experimental en donde se observa en las primeras el bajo porcentaje pues fue de la muestra del día 0 y en los siguientes el aumento en el porcentaje es muy notorio y es del día 2.

En el cuadro 11 y la figura 11, así como en el cuadro 12 y la figura 12, se muestran los resultados de ambos grupos correspondientemente, observamos los porcentajes positivos de cada uno de los anticuerpos que se usaron. Viendo que en el grupo experimental en el día dos aumentó el número de células positivas a CD90, CD73 Y CD105 que son sugerentes a células troncales mesenquimales y el aumento en las células positivas a CD34, CD14 Y CD45 son características de células hematopoyéticas. En grupo control no hubo variación de importancia estadística.

En las figuras 13 y 14 podemos observar las comparaciones de los porcentajes obtenidos de cada equino en las citometrías de flujo del grupo Experimental y del Control respectivamente.

DISCUSIÓN

El factor de estimulación de colonias de granulocitos como ya se ha mencionado es usado en humanos (principalmente pacientes oncológicos), en animales de laboratorio, perros, cerdos y borregos a parte de los equinos.^{7, 17, 27, 49} Sin embargo en todos los artículos la dosis varía, en humanos en general va de 5-10 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ pero Demetri señala que es posible llegar a usar una dosis de 16 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$ sin encontrar efectos adversos.⁵⁰

En los resultados obtenidos en esta investigación mostraron una variación entre la hembra, el macho y el caballo castrado; pero no se encontró literatura que mencione que el género sea una variante en la respuesta al fármaco, por lo que será necesario seguir investigando. En un artículo de F.J. Garjon donde trabajo con pacientes oncológicos y a los cuales les administro el GCSF de día y de noche, menciona que en un solo día hubo diferencia estadística en la respuesta, obteniendo una respuesta más favorable si se administra de día que de noche; sin embargo concluye que no es algo contundente por lo que no varía la efectividad del factor si es administrado de día o de noche.⁵²

En los equinos del grupo experimental se observó que los granulocitos que más se estimularon fueron los neutrófilos, se podría inferir que al igual que en humanos, los neutrófilos presentan una mayor afinidad en sus receptores al Filgrastim.⁵⁰

Otro cambio visto fue durante el cultivo de las muestras de sangre periférica movilizada, donde las células disminuyeron su adherencia y el potencial de proliferación, en comparación con las células provenientes de la médula ósea. Las células obtenidas se tipificaron para saber que tipo de células se han obtenido, los anticuerpos que se utilizaron

fueron: CD14, CD34, CD45, CD73 CD90 y CD105 todas positivas. ⁵¹ mencionó que las células movilizadas difieren de las células de médula ósea en cuanto a la expresión de la molécula de adhesión, potencial de proliferación y a la respuesta a citocinas, pero menciona que estos cambios o modificaciones pudieran proporcionar alguna ventaja a las células CD34⁺ en términos de ser más eficientes como mensajeras en el microentorno y ser más sensibles a las señales producidas ahí. ⁵¹

Las investigaciones realizadas en el campo de la medicina regenerativa se han hecho en su mayoría en medicina humana, en medicina veterinaria ha sido en perros y animales de laboratorio principalmente, pero en caballos se ha hecho muy poco. Las células troncales mesenquimales en tratamientos veterinarios ya se ha visto que tienen un potencial de revolucionar el tratamiento de enfermedades ortopédicas equinas e inclusive humanas, pues como se ha mencionado tienen la habilidad de renovarse y diferenciarse a varios tipos de tejidos bajo condiciones específicas. ⁴ El uso de las CTM puede llegar a ser la clave de la regeneración natural celular, enfocado al potencial de nuevos cultivos de tejidos y órganos, reemplazando el daño o enfermedad del tejido. Por lo que si se puede obtener las CTM de una manera más sencilla y minimizando el riesgo de su obtención sería un gran avance que a su vez ayudaría para que las investigaciones en esta línea sigan evolucionando.

Sin embargo es necesario seguir investigando, pues aún hay muchas interrogantes pendientes, ya que la información existente es muy escasa.

CONCLUSIÓN

- 1) Se lograron movilizar las células troncales mesenquimales hacia sangre periférica con dosis de 3µg/Kg/día, obteniendo la mayor producción el día 2.
- 2) En las citometrías se obtuvieron lecturas positivas a los marcadores de células inmaduras (células troncales).
- 3) En los cultivos, los primero dos pases fueron normales, no obstante en el pase tres ya no hubo aumento en número de células (clonación) y disminuyó la adhesión.
- 4) Es necesario seguir investigando hasta llegar a un punto donde la dosis del factor de estimulación sea la adecuada para movilizar las células y que de manera *in vitro* puedan ser cultivadas hasta los pases 3 y 4 o bien trabajar con las células que se obtuvieron y de este modo el siguiente paso sería evaluar su uso terapéutico.
- 5) No presentaron reacciones secundarias los equinos utilizados con la administración del G-CSF
- 6) Considerando las ventajas y desventajas de la movilización de CTM con el uso del G-CSF, se considera que es una buena elección para la obtención de CTM.

CUADROS Y FIGURAS

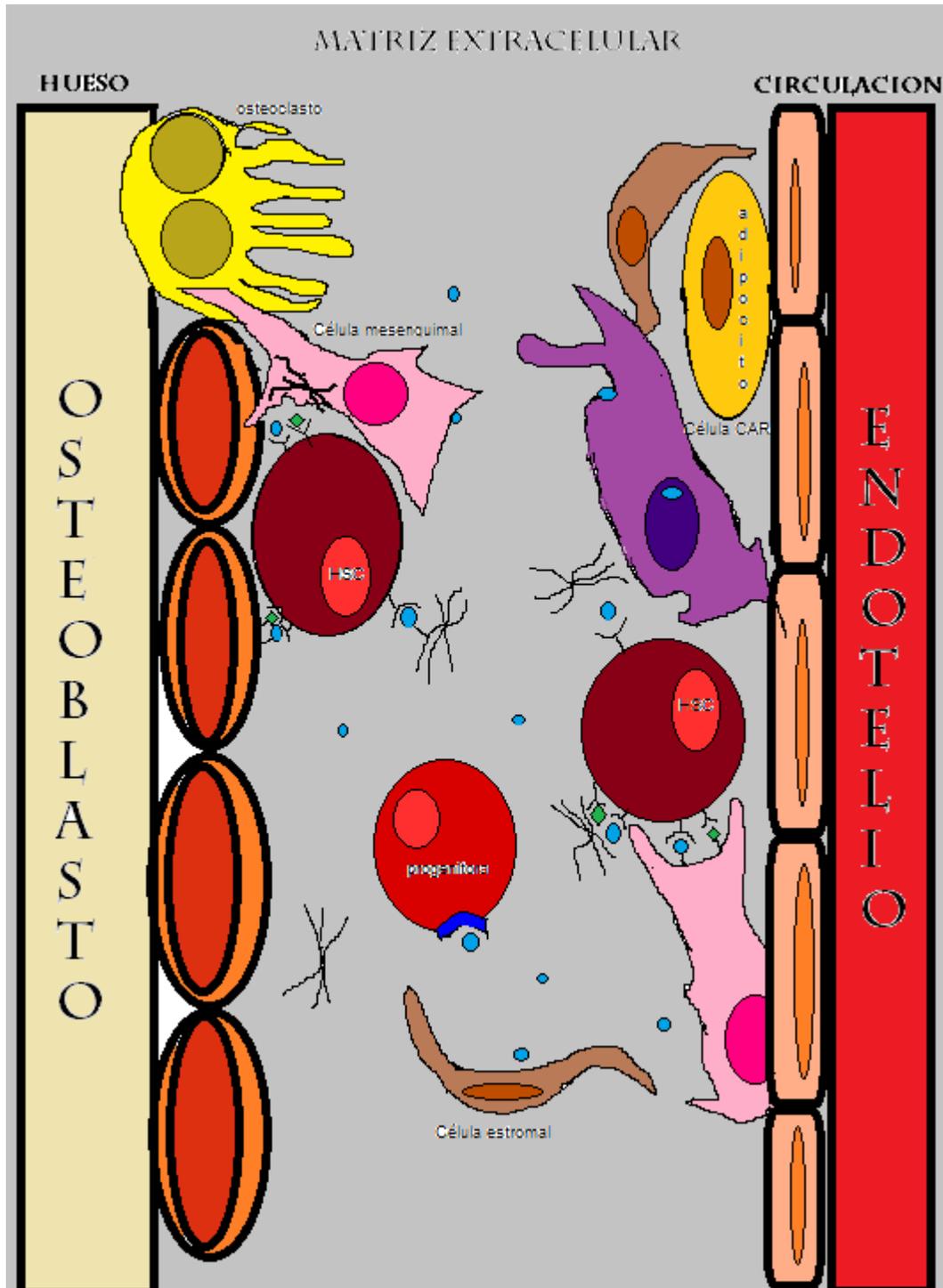


Figura 1 "Células troncales y medicina regenerativa"; Rosana Pelayo, JesusSantaolaya, Ivan Velasco

Cuadro 1: Diferentes Citocinas: Origen, Destino y Función.

| Citocina | Origen | Destino | Función |
|-------------------------------|--|---|---|
| GM-CSF | Linfocitos Th | Células Progenitoras | Proliferación y diferenciación de granulocitos, monocitos y DC |
| IL-1 α IL-1 β | Monocitos Macrófagos Linfocitos B DC | Linfocitos Th Linfocitos B Células NK Varios | Coestimulación Maduración y proliferación Activación Inflamación, respuesta de fase aguda, fiebre |
| IL-2 | Linfocitos Th1 | Linfocitos T y B activados, NK | Prolif., diferen. y activación |
| IL3 | Linfocitos Th NK | CT Células cebadas | Proliferación y diferenciación Prolif. y liberación de histamina |
| IL-4 | Linfocitos Th2 | Linfocitos B activados Macrófagos Linfocitos T | Prolif., y diferen. síntesis de IgG1 e IgE MHC clase II Proliferación |
| IL-5 | Linfocitos Th2 | Linfocitos B activados | Prolif. y diferen. síntesis IgA |
| IL-6 | Monocitos Macrófagos Linfocitos Th2 Células estroma | Linfocitos B activados Células plasmáticas CT Varias | Diferenciación a células plasmáticas Secreción de anticuerpos Diferenciación Respuesta de fase aguda, fiebre |
| IL-7 | Estroma de médula ósea Estroma Timo | CT | Diferenciación a células Progenitoras B y T |
| IL-8 | Macrófagos Endoteliales | Neutrófilos | Quimiotaxis |
| IL-10 | Linfocitos Th2 | Macrófagos Linfocitos B | Producción de citocinas Activación |
| IL-12 | Macrófagos | Linfocitos Tc | Diferenciación a CTL |

| | | | |
|----------------|---------------------------------------|--|---|
| | Linfocitos B | activados NK | (IL-2) Activación |
| IFN- α | Leucocitos | Varios | Replicación viral expresión MHC1 |
| IFN- β | Fibroblastos | Varios | Replicación viral expresión MHC1 |
| IFN- γ | Linfocitos Th1 Linfocitos Tc NK | Varios Macrófagos Linfocitos B activados Linfocitos Th2 Macrófagos | Replicación viral Expresión de MHC Cambio de clase a IgG _{2a} Proliferación Eliminación de patógenos |
| MIP-1 α | Macrófagos | Monocitos, linfocitos T | Quimiotaxis |
| MIP-1 β | Linfocitos | Monocitos, linfocitos T | Quimiotaxis |
| TGF- β | Linfocitos T, Monocitos | Monocitos, macrófagos Macrófagos activados Linfocitos B activados Varios | Quimiotaxis Síntesis de IL-1 Síntesis IgA Proliferación |
| TNF- α | Macrófagos, células cebadas, NK | Macrófagos Células tumorales | Expresión de moléculas de adhesión y citocinas Muerte celular |
| TNF- β | Linfocitos Th1 y Linfocitos Tc | Fagocitos Células tumorales | Fagocitosis Muerte celular |

“Inmunología veterinaria”, Jose Angel Gtz Pabello, edic 2010, México

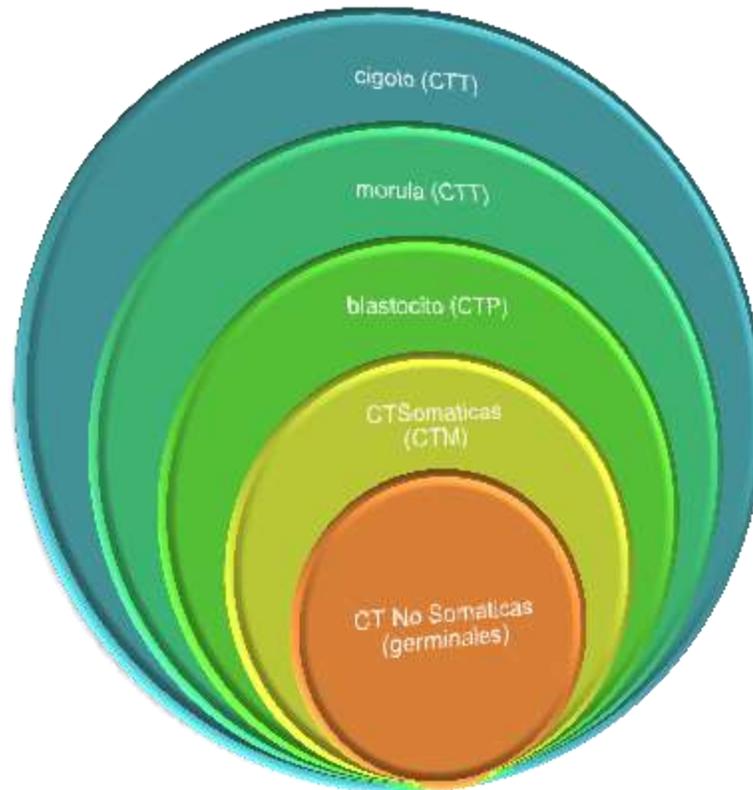


Fig. 2: Diagrama conceptual mostrando la reducción de la plasticidad celular a medida que las poblaciones celulares van adquiriendo capacidades funcionales específicas determinadas por el microambiente y la comunicación intercelular. Cigoto es la primer célula troncal, CTT (célula troncal Totipotencial), CTP (célula troncal pluripotencial), CTM (célula troncal multipotencial).

Cuadro 2: Células Troncales de donde se obtienen y cual es su potencial de difenciación.

| FUENTE | POTENCIAL DE DIFERENCIACION | REFERENCIAS |
|-----------------------------|---|----------------------------------|
| ADULTOS | | |
| MEDULA OSEA | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO | (Pittenger et al. 1999) |
| | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO | (Yoshimura et al. 2006) |
| MEDULA OSEA de EQUINO | OSTECITO, ADIPOCITO | (Vidal et al. 2006) |
| | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO | (Koerner et al. 2006) |
| HUESO TRABECULAR | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO | (Noth et al. 2002) |
| | | (Sottile et al. 2002) |
| | | (Tuli et al. 2003) |
| PERIOSTIO | CONDROCITO, OSTEOCITO | (De Bari et al. 2001) |
| | OSTEOCITO, CONDROCITO, MIOCITO | (De Bari et al. 2006) |
| | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO | (Yoshimura et al. 2006) |
| CARTÍLAGO | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO | (Barbero et al. 2003) |
| | OSTECITO, CONDROCITO TENDON, PERIMISIO | (Dowthwaite et al. 2004) |
| TENDON | OSTEOCITO, ADIPOCITO | (Salingcarnboriboon et al. 2003) |
| MEMBRANA SINOVIAL | OSTEOCITO, CONDROCITO, MIOCITO, ADIPOCITO | (De Bari et al. 2001) |
| | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO | (Yoshimura et al. 2006) |
| MUSCULO | ADIPOCITO, OSTECITO, MIOCITO | (Asakura et al. 2001) |
| | ADIPOCITO, OSTECITO, MIOCITO | (Wada et al. 2002) |
| | | (Williams et al. 1999) |
| GRASA | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO | (Im et al. 2005) |
| | OSTEOCITO, CONDROCITO, MIOCITO, ADIPOCITO | (Zuk et al. 2001) |
| SANGRE | OSTECITO, ADIPOCITO, FIBROBLASTOS | (Zvaifler et al. 2000) |
| SANGRE DE EQUINO | OSTECITO, ADIPOCITO | (Koerner et al. 2006) |
| DERMIS | OSTECITO, CONDROCITO, ADIPOCITO, MIOCITO | (Young et al. 2001) |
| NEONATAL | | |
| SANGRE DEL CORDON UMBILICAL | OSTECITO, ADIPOCITO, CONDROCITO | (Chang et al. 2006) |
| | | (Romanov et al. 2003) |
| | | |

| | | |
|---------------------|---------------------|---------------------------|
| GELATINA DE WHARTON | OSTECITOS | (Sarugaser et al. 2005) |
| PLACENTA | OSTECITO, ADIPOCITO | (In 't Anker et al. 2004) |

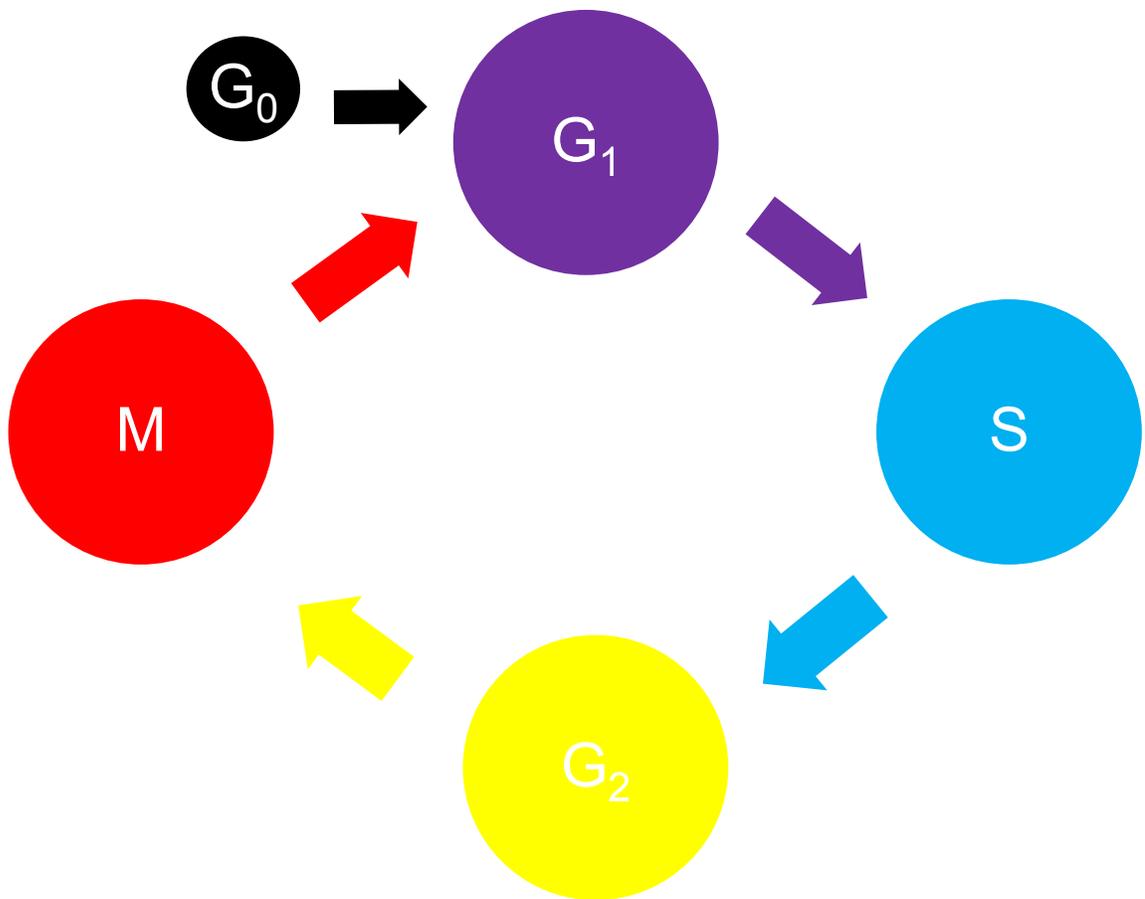


Fig. 2: Ciclo celular. El ciclo de la mayoría de las células incluye las 4 fases (G₁, S, G₂ y M); pero las células troncales se encuentran en el estado G₀, que es un estado de quiescencia.

Cuadro 3: Estimuladores de las colonias hematopoyéticas.

| NOMBRE | LOCALIZACION Y CEL. PRODUCTORAS | PRINCIPAL ACTIVIDAD BIOLOGICA |
|-------------------------------|---|---|
| GRANULOCITO G-CSF | CROMOSOMA 17 Macrófago Endotelio Fibroblasto | Estimula la formación de granulocitos (in vivo e in vitro). Estimula el metabolismo de los granulocitos. Estimula las células leucémicas. |
| Granulocito + monocito GM-CSF | CROMOSOMA 5 Linfocito T Endotelio Fibroblasto | Estimula la formación de los granulocitos y macrófagos in vivo e in vitro |
| MACROFAGO M-CSF | CROMOSOMA 5 Macrófagos Endotelio Fibroblasto | Estimula la formación de los macrófagos in vitro. Aumenta la actividad de los macrófagos contra las células cancerosas (in vitro) |
| INTERLEUCINA 3 (IL3) | CROMOSOMA 5 Linfocito T | Estimula la producción de células mieloides in vivo e in vitro |
| ERITROPOYETINA (EPO) | CROMOSOMA 7 Células intersticiales de la corteza renal externa | Estimula la producción de los hematíes |

“Histología básica, texto y atlas”; Luiz C. Junqueira, Jose Carneiro; 6ª edición, 2005; Barcelona, España.

Cuadro 4: Diferentes tipos de Células y sus Antígenos de superficie

| TIPO DE CELULA | MARCADORES HUMANOS |
|-------------------------------|--|
| Célula Troncal Pluripotente | Positivo: Fosfatasa alcalina, SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-60. Negativo: SSEA-1 |
| Célula Troncal Hematopoyética | Positivo: CD34, CD49f, CD 90 Negativo: CD38, CD45RA, CD2, 3, 4, 7, 8, 10, 11b, 14, 19, 20, 56, 235 ^a . |
| Célula Troncal Mesenquimal | Positivo: CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD271. Negativo: CD11b, CD19, CD31, CD34, CD45, HLA-DR |
| Célula Troncal Neuronal | Positivo: CD105 ^{low} , CD24, CD184 Negativo: CD44, CD271. |
| Neuronas | Positivo: CD15, CD24 Negativo: CD44, CD184 |

Cuadro 5: Hemograma del equino1 del grupo experimental

| HEMOGRAMA | | | | | | | |
|-----------------------|---------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Equino 1 | Unidad | Referencia | día 0 | día 1 | día 2 | día 3 | día 4 |
| HEMATOCRITO | L/L | 0.32-0.52 | 0.39 | 0.41 | 0.38 | 0.35 | 0.35 |
| HEMOGLOBINA | g/L | 111-190 | 140 | 150 | 140 | 120 | 125 |
| ERITROCITOS | X10 /L | 6.5-12.5 | 9.3 | 9.9 | 9.3 | 8.4 | 8.5 |
| VGM | fl | 34-58 | 42 | 41 | 41 | 42 | 41 |
| CGMH | g/l | 310-370 | 359 | 366 | 368 | 343 | 357 |
| PROTEINAS | g/L | 60-80 | 66 | 66 | 70 | 64 | 60 |
| FIBRINOGENO | g/L | <5 | 4 | 4 | 2 | 2 | 2 |
| LEUCOCITOS | X10 /L | 5.5-12.5 | 10.6 | 23.5 | 28.3 | 24.4 | 12.3 |
| PLAQUETAS | X10 /L | 100-600 | 270 | 261 | 251 | 231 | 222 |
| NEUTROFILOS | X10 /L | 2.7-6.7 | 4.7 | 19.7 | 24.1 | 21.2 | 7.1 |
| NEUTROFILOS EN BANDA | X10 /L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| METAMIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LINFOCITOS | X10 /L | 1.5-7.5 | 5.9 | 3.3 | 2.8 | 2.9 | 4.9 |
| MONOCITOS | X10 /L | 0-0.8 | 0 | 0.5 | 3.4 | 0.2 | 0.1 |
| EOSINÓFILOS | X10 /L | 0.0.9 | 0 | 0 | 0.8 | 0 | 0.2 |
| BASÓFILOS | X10 /L | 0-0.2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ERITROCITOS NUCLEADOS | /100 leuc. | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| NEUTROFILOS TOXICOS | | Neg | neg | neg | neg | neg | neg |
| LINFOCITOS ATÍPICOS | | Neg | neg | neg | neg | neg | neg |

Lo marcado con color rojo es el aumento que se hubo en el conteo y lo marcado con azules la disminución.

Cuadro 6: Hemograma del Grupo Experimental

| HEMOGRAMA Equino 2 | unidades | referencia | DÍA 0 | DÍA 2 |
|---------------------------|-----------------|-------------------|--------------|--------------|
| HEMATOCRITO | L/L | 0.32-0.52 | 0.36 | 0.39 |
| HEMOGLOBINA | g/L | 111-190 | 114 | 131 |
| ERITROCITOS | X10 /L | 6.5-12.5 | 8.1 | 8.8 |
| VGM | fl | 34-58 | 44 | 44 |
| CGMH | g/l | 310-370 | 317 | 336 |
| PROTEINAS | g/L | 60-80 | 56 | 60 |
| FIBRINOGENO | g/L | <5 | 2 | 1 |
| LEUCOCITOS | X10 /L | 5.5-12.5 | 8.7 | 18.8 |
| PLAQUETAS | X10 /L | 100-600 | 372 | 152 |
| NEUTROFILOS | X10 /L | 2.7-6.7 | 4.1 | 14.3 |
| NEUTROFILOS EN BANDA | X10 /L | 0 | 0 | 0 |
| METAMIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | 0 |
| MIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | 0 |
| LINFOCITOS | X10 /L | 1.5-7.5 | 4.3 | 4.1 |
| MONOCITOS | X10 /L | 0-0.8 | 0 | 0 |
| EOSINÓFILOS | X10 /L | 0.0.9 | 0.3 | 0.4 |
| BASÓFILOS | X10 /L | 0-0.2 | 0 | 0 |
| ERITROCITOS NUCLEADOS | /100 leuc. | 0 | 0 | 0 |
| NEUTROFILOS TOXICOS | | neg | neg | Neg |
| LINFOCITOS ATIPICOS | | neg | neg | Neg |

Cuadro7: Hemograma equino 3 del Grupo Experimental

| HEMOGRAMA equino 3 | unidades | referencia | DÍA 0 | DÍA 2 |
|-----------------------|------------|------------|-------|-------------|
| HEMATOCRITO | L/L | 0.32-0.52 | 0.36 | 0.39 |
| HEMOGLOBINA | g/L | 111-190 | 113 | 115 |
| ERITROCITOS | X10 /L | 6.5-12.5 | 7.8 | 7.4 |
| VGM | fl | 34-58 | 46 | 46 |
| CGMH | g/l | 310-370 | 319 | 332 |
| PROTEINAS | g/L | 60-80 | 62 | 61 |
| FIBRINOGENO | g/L | <5 | 2 | 3 |
| LEUCOCITOS | X10 /L | 5.5-12.5 | 7 | 13.2 |
| PLAQUETAS | X10 /L | 100-600 | 276 | 258 |
| NEUTROFILOS | X10 /L | 2.7-6.7 | 3.6 | 10.1 |
| NEUTROFILOS EN BANDA | X10 /L | 0 | 0 | 0 |
| METAMIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | 0 |
| MIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | 0 |
| LINFOCITOS | X10 /L | 1.5-7.5 | 3.6 | 2.9 |
| MONOCITOS | X10 /L | 0-0.8 | 0.1 | 0.1 |
| EOSINÓFILOS | X10 /L | 0.0-0.9 | 0 | 0.1 |
| BASÓFILOS | X10 /L | 0-0.2 | 0 | 0 |
| ERITROCITOS NUCLEADOS | /100 leuc. | 0 | 0 | 0 |
| NEUTROFILOS TOXICOS | | neg | neg | Neg |
| LINFOCITOS ATIPICOS | | neg | neg | Neg |

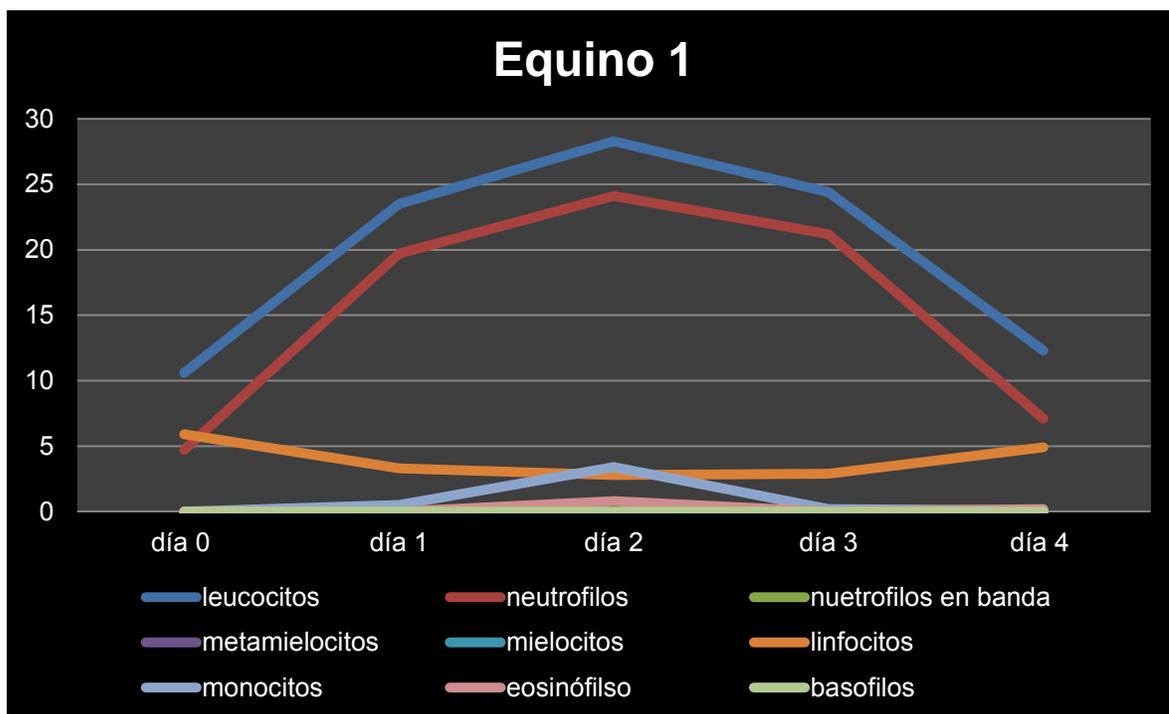


Fig. 4: Equino 1 del grup experimental. En este grafica podemos observar las modificaciones en el conteo celular durante de la investigación, viendo el mayor punto de producción el día dos.

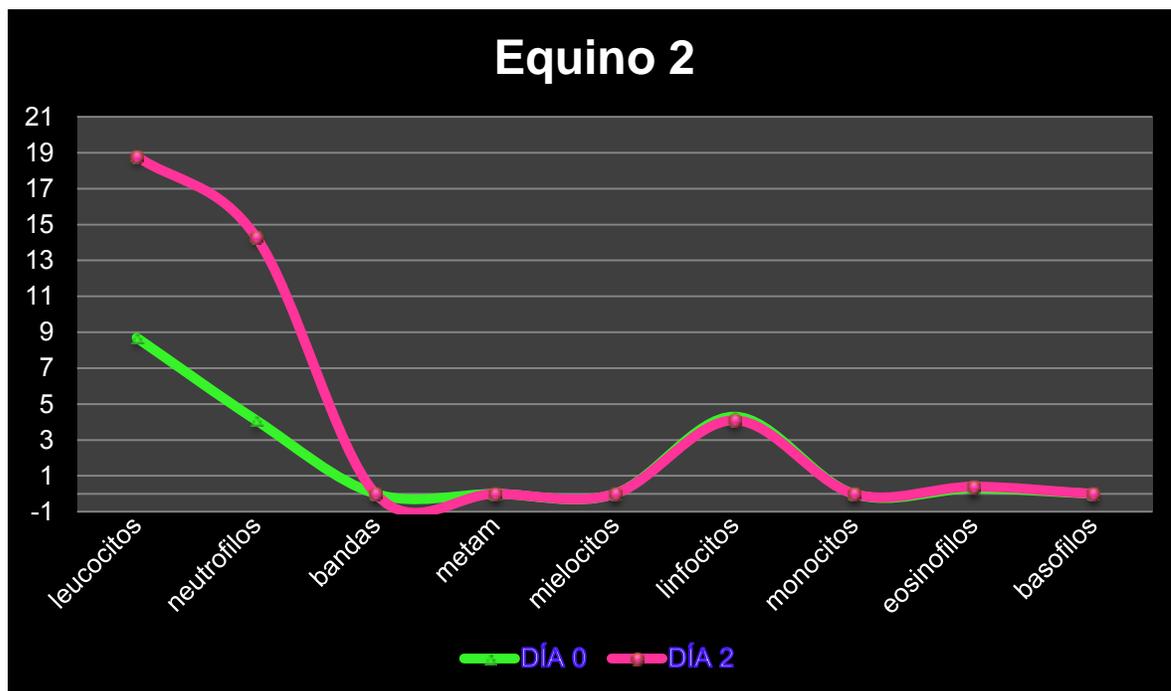


Fig 5: Grafica del Equino 2 del grupo experimental. En esta grafica se plasmó el comportamiento de los granulocitos, monocitos y linfocitos.

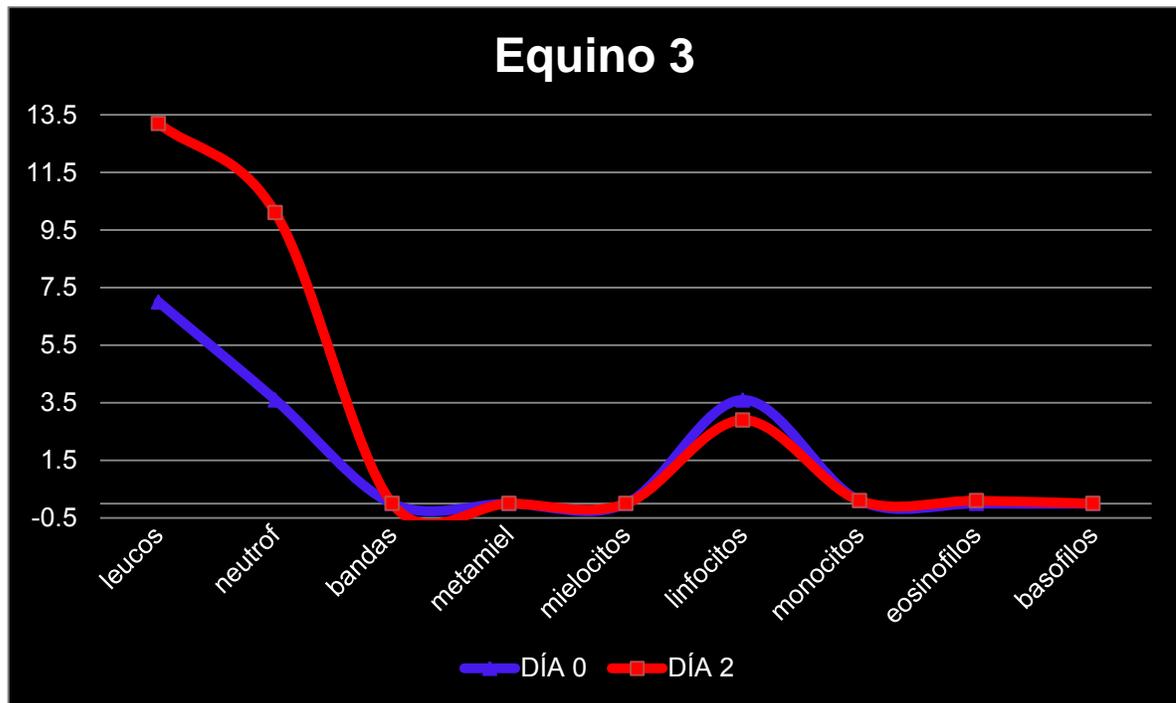


Fig 6: Equino 3 del grupo experimental. Esta es la comparación de los resultados obtenidos en los hemogramas

Cuadro 9: Hemograma del equino B del grupo control

| HEMOGRAMA equino B | unidades | referencia | DÍA 0 | MÉDULA | DÍA 2 |
|---------------------------|-----------------|-------------------|--------------|---------------|--------------|
| HEMATOCRITO | L/L | 0.32-0.52 | 0.32 | 0.29 | 0.31 |
| HEMOGLOBINA | g/L | 111-190 | 115 | 93 | 97 |
| ERITROCITOS | X10 /L | 6.5-12.5 | 7.3 | 5.7 | 6.5 |
| VGM | fI | 34-58 | 44 | 51 | 47 |
| CGMH | g/l | 310-370 | 359 | 321 | 316 |
| PROTEINAS | g/L | 60-80 | 62 | 52 | 60 |
| FIBRINOGENO | g/L | <5 | 2 | 2 | 2 |
| LEUCOCITOS | X10 /L | 5.5-12.5 | 6.3 | 12.6 | 6.2 |
| PLAQUETAS | X10 /L | 100-600 | 147 | 90 | 120 |
| NEUTROFILOS | X10 /L | 2.7-6.7 | 3.5 | 7.4 | 3.8 |
| NEUTROFILOS EN BANDA | X10 /L | 0 | 0 | 0.2 | 0 |
| METAMIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | 0 | 0 |
| MIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LINFOCITOS | X10 /L | 1.5-7.5 | 2.5 | 4.8 | 2.3 |
| MONOCITOS | X10 /L | 0-0.8 | 0.1 | 0.1 | 0 |
| EOSINÓFILOS | X10 /L | 0-0.9 | 0.2 | 0.1 | 0.1 |
| BASÓFILOS | X10 /L | 0-0.2 | 0 | 0 | 0 |
| ERITROCITOS NUCLEADOS | /100 leuc. | 0 | 0 | 5 | 0 |
| NEUTROFILOS TOXICOS | | neg | neg | neg | neg |
| LINFOCITOS ATÍPICOS | | neg | neg | neg | neg |

Cuadro 8: Hemograma del equino C del grupo control.

| HEMOGRAMA equino C | unidades | referencia | DÍA 0 | MÉDULA | DÍA 2 |
|---------------------------|-----------------|-------------------|--------------|---------------|--------------|
| HEMATOCRITO | L/L | 0.32-0.52 | 0.3 | # | 0.32 |
| HEMOGLOBINA | g/L | 111-190 | 107 | # | 115 |
| ERITROCITOS | X10 /L | 6.5-12.5 | 7.4 | # | 8.3 |
| VGM | fI | 34-58 | 41 | # | 39 |
| CGMH | g/l | 310-370 | 357 | # | 359 |
| PROTEINAS | g/L | 60-80 | 58 | # | 66 |
| FIBRINOGENO | g/L | <5 | 2 | # | 4 |
| LEUCOCITOS | X10 /L | 5.5-12.5 | 9.8 | # | 10.9 |
| PLAQUETAS | X10 /L | 100-600 | 304 | # | 371 |
| NEUTROFILOS | X10 /L | 2.7-6.7 | 5 | # | 5.1 |
| NEUTROFILOS EN BANDA | X10 /L | 0 | 0 | # | 0 |
| METAMIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | # | 0 |
| MIELOCITOS | X10 /L | 0 | 0 | # | 0 |
| LINFOCITOS | X10 /L | 1.5-7.5 | 4.4 | # | 5.2 |
| MONOCITOS | X10 /L | 0-0.8 | 0.1 | # | 0.2 |
| EOSINÓFILOS | X10 /L | 0-0.9 | 0.1 | # | 0.3 |
| BASÓFILOS | X10 /L | 0-0.2 | 0.2 | # | 0 |
| ERITROCITOS NUCLEADOS | /100 leuc. | 0 | 0 | # | 0 |
| NEUTROFILOS TOXICOS | | neg | neg | # | neg |
| LINFOCITOS ATIPICOS | | neg | neg | # | neg |

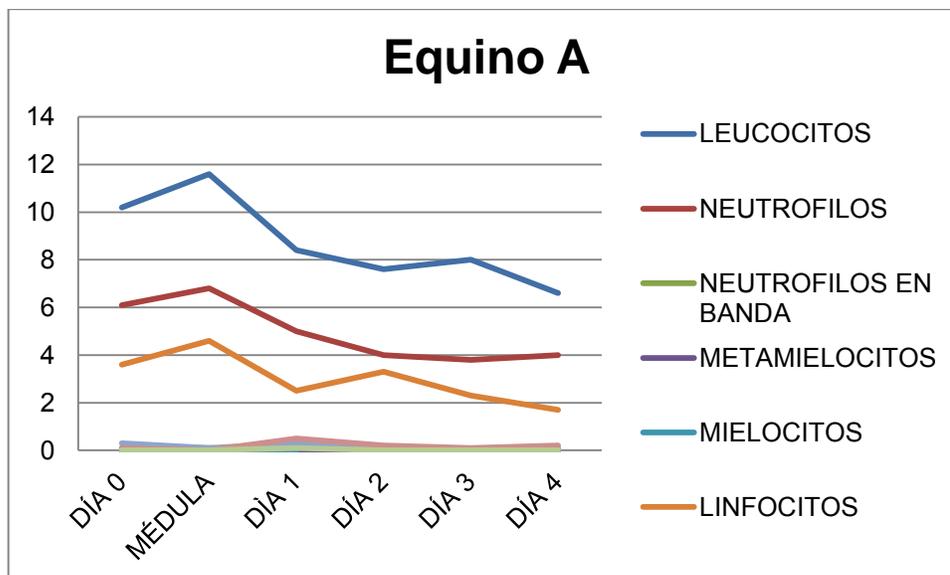


Fig. 7: Comportamiento del del equino A durante la investigación.

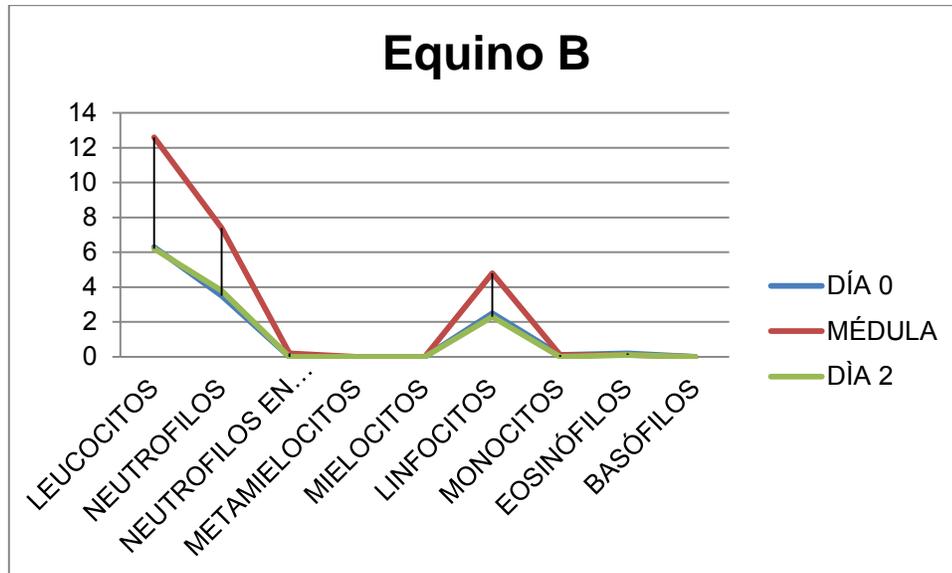


Fig. 8: Equino B del grupo control, comparación entre el día 0, día 2 y médula ósea.

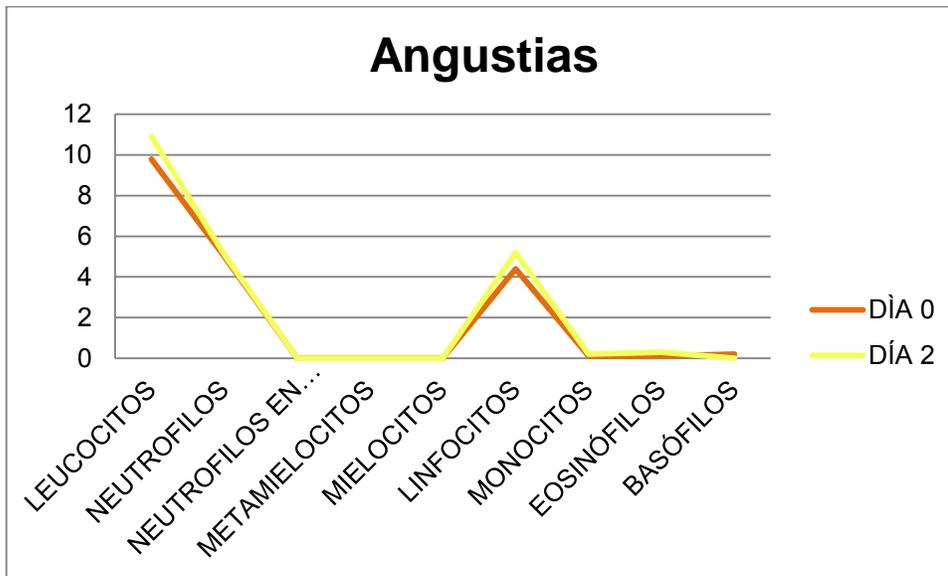
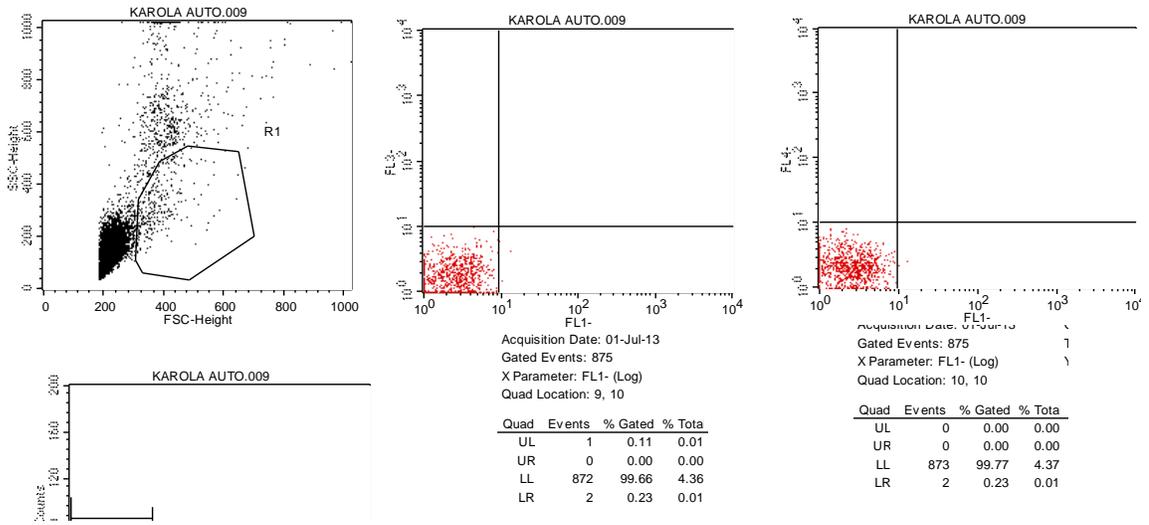
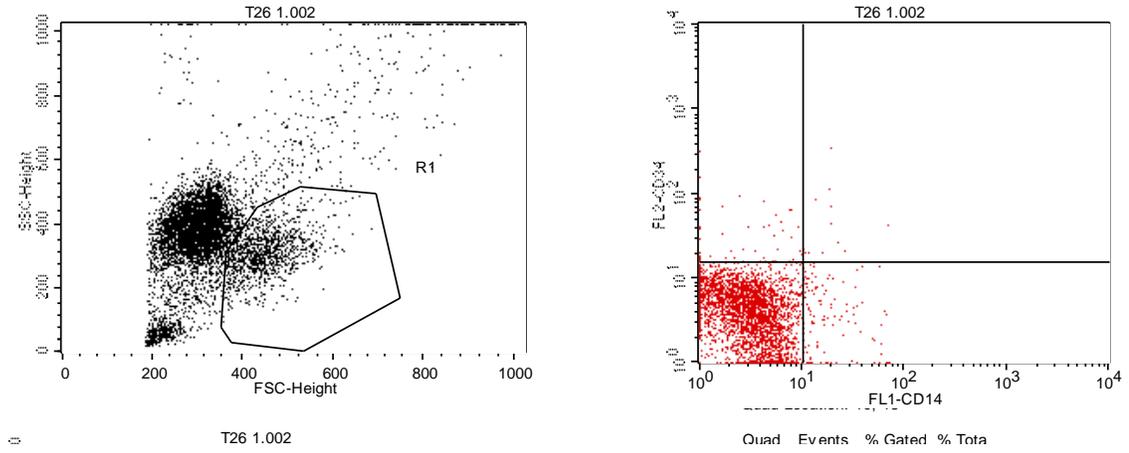
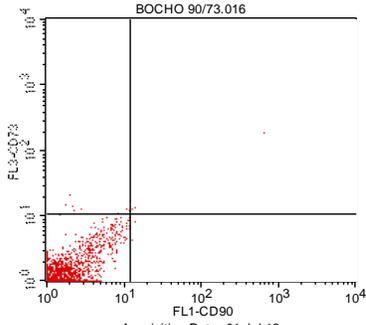
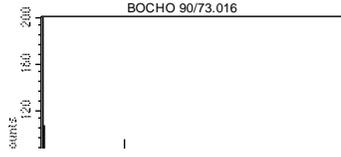
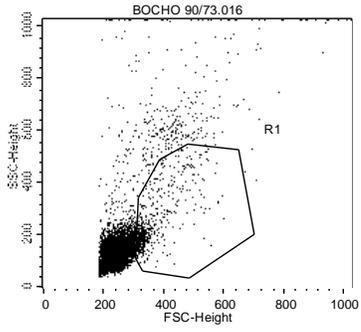


Fig. 9: Equino C del grupo control, comparación del los días 0, 2 y médula ósea.

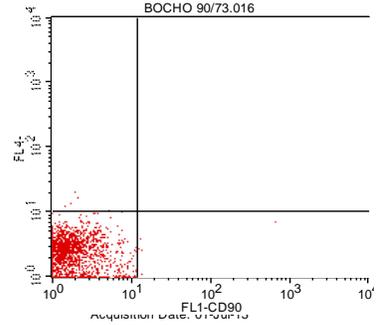


Citometría del Día cero



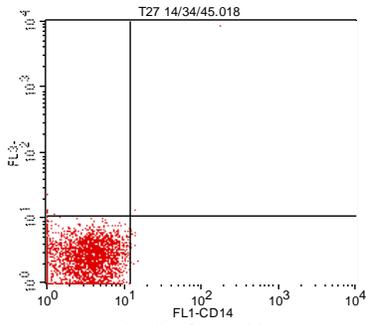
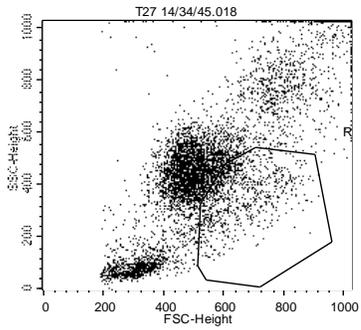
Acquisition Date: 01-Jul-13
 Gated Events: 1682
 X Parameter: FL1-CD90 (Log)
 Quad Location: 12, 10

| Quad | Events | % Gated | % Total |
|------|--------|---------|---------|
| UL | 9 | 0.54 | 0.04 |
| UR | 3 | 0.18 | 0.01 |
| LL | 1668 | 99.17 | 8.34 |
| LR | 2 | 0.12 | 0.01 |

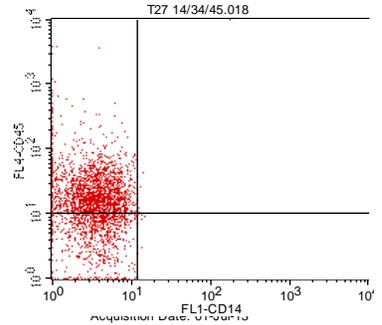


Acquisition Date: 01-Jul-13
 Gated Events: 1682
 X Parameter: FL1-CD90 (Log)
 Quad Location: 12, 10

| Quad | Events | % Gated | % Total |
|------|--------|---------|---------|
| UL | 5 | 0.30 | 0.03 |
| UR | 0 | 0.00 | 0.00 |
| LL | 1672 | 99.41 | 8.36 |
| LR | 5 | 0.30 | 0.03 |



Acquisition Date: 01-Jul-13
 Gated Events: 2595



Acquisition Date: 01-Jul-13
 Gated Events: 2595
 X Parameter: FL1-CD14 (Log)

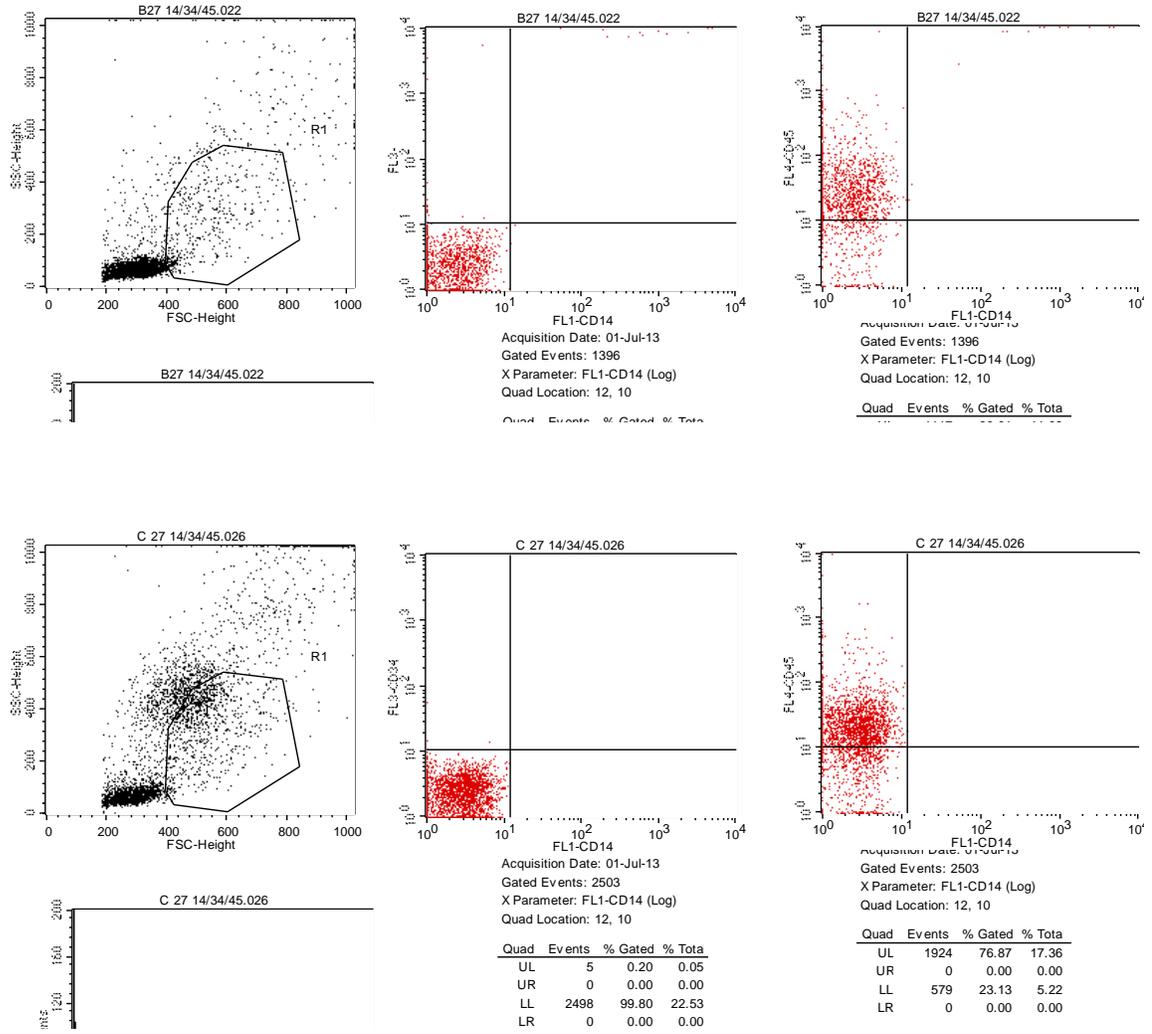
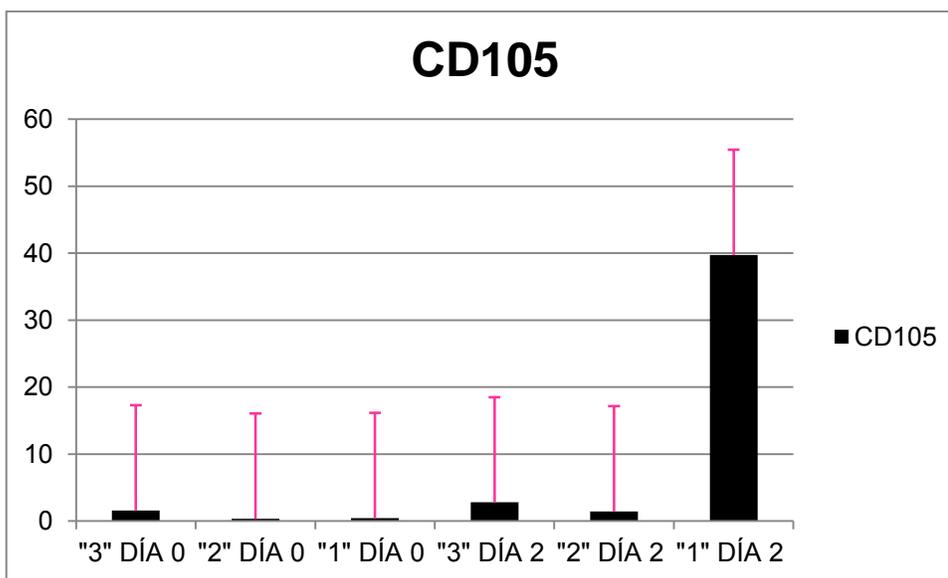
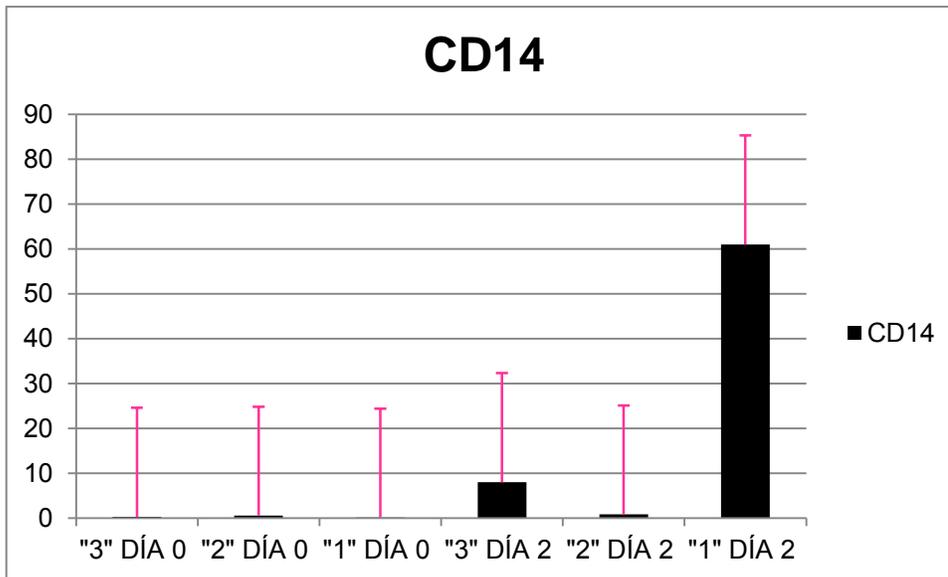
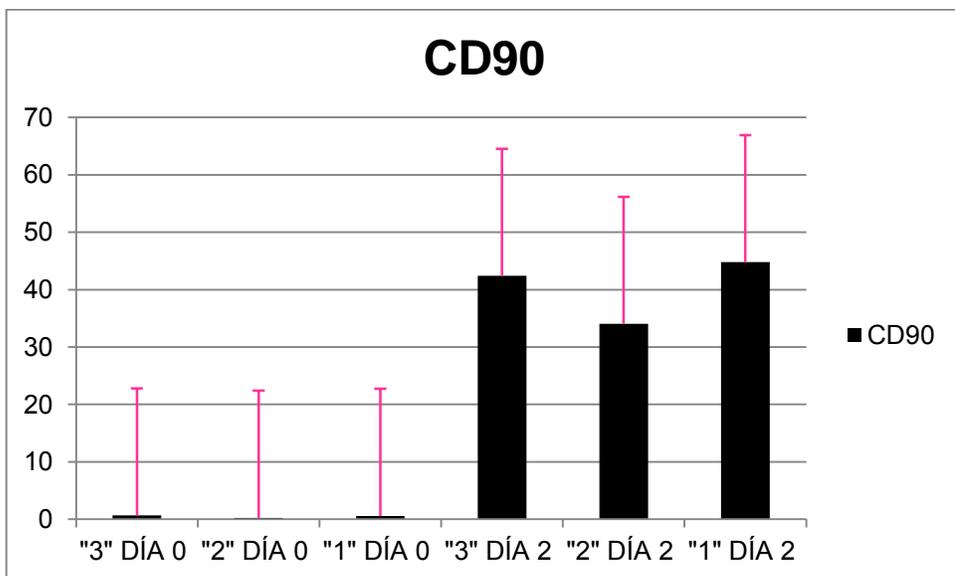
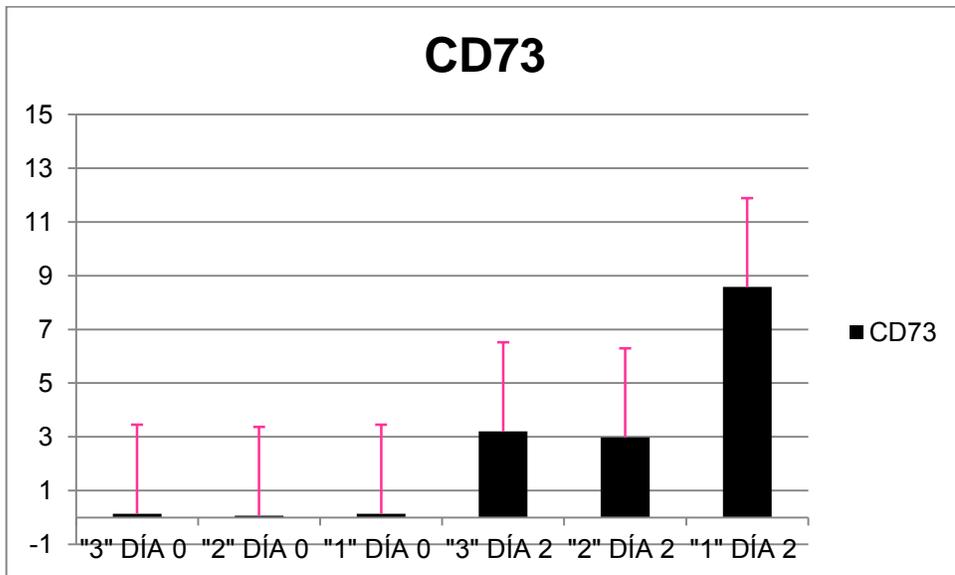


Fig 10: Citometrías de Flujo del grupo experimental. Las graficas del lado derecho son positivas, las de en medio son las negativas.

Cuadro 11: Porcentajes de positividad en la citometría de flujos en el Grupo Experimental

| GRUPO E | CD14 | CD105 | CD90 | CD73 | CD34 | CD45 |
|---------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Equino 2 DÍA 0 | 0.55 | 0.36 | 0.24 | 0.06 | 0.99 | 0.16 |
| Equino 2 DÍA 2 | 0.86 | 1.45 | 54.03 | 2.98 | 17.19 | 10.99 |
| | | | | | | |
| Equino 3 DÍA 0 | 0.31 | 1.6 | 0.66 | 0.14 | 2.04 | 0.31 |
| Equino 3 DÍA 2 | 8.05 | 2.8 | 42.4 | 3.21 | 7.86 | 8.94 |
| | | | | | | |
| Equino 1 DÍA 0 | 0.13 | 0.47 | 0.57 | 0.14 | 0.37 | 0.16 |
| Equino 1 DÍA 1 | 2.77 | 0.84 | 35.12 | 3.62 | 7.75 | 10.63 |
| Equino 1 DÍA 2 | 61.02 | 39.73 | 44.77 | 8.58 | 12.12 | 17.02 |
| Equino 1 DÍA 3 | 47.7 | 27.7 | 36.67 | 2.43 | 1.04 | 2.52 |
| Equino 1 DÍA 4 | 0 | - | - | - | 0.05 | 1.78 |





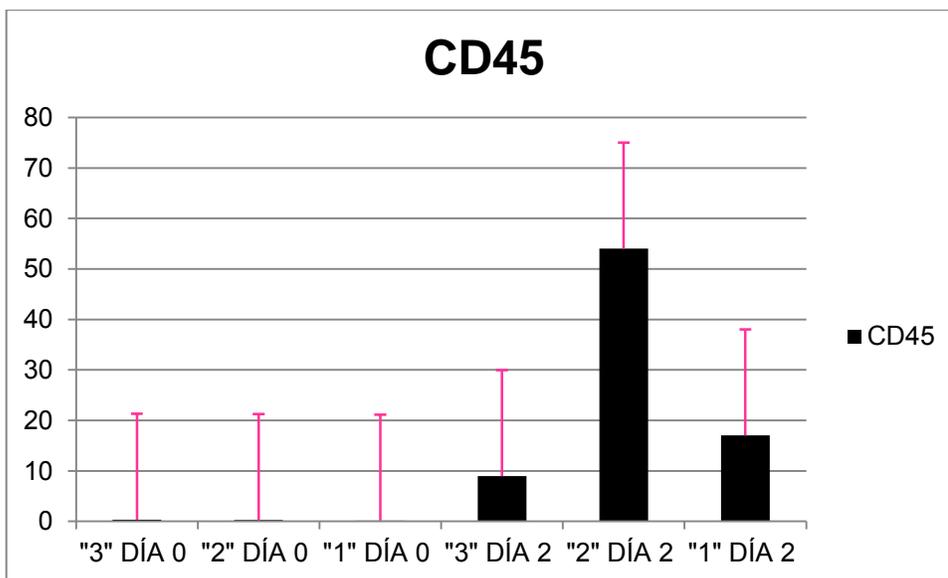
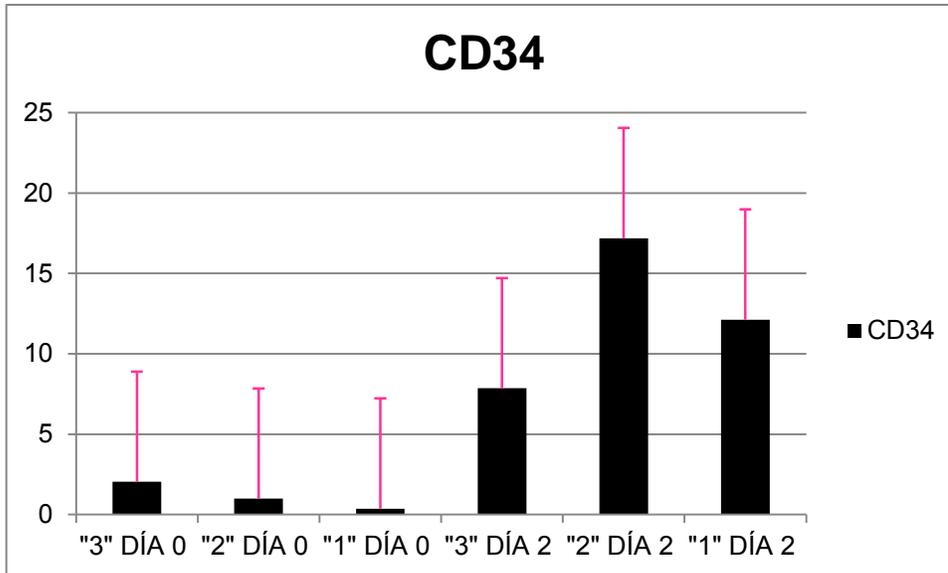


Figura 11: graficas de los resultados de los marcadores de superficie del día 0 y el día 2 en el grupo experimental.

Cuadro 12: porcentajes de positividad en las citometrías de flujo del grupo control.

| Equino/día | CD14 | CD105 | CD90 | CD73 | CD34 | CD45 |
|------------|------|-------|------|------|------|------|
| “A” día 0 | 1.97 | 1.1 | 0.66 | 0.13 | 0.38 | 0.02 |
| “A” día 1 | 0.23 | 0.41 | 0.55 | 0.48 | 1.8 | 0.1 |
| “A” día 2 | 0.83 | 1.61 | 0.31 | 0.07 | 0.93 | 0.16 |
| “A” día 3 | 0.31 | 0.84 | 0.29 | 0.2 | 0.73 | 0.32 |
| “A” M.O. | 0.23 | - | - | - | 0.37 | 0.33 |
| “B” día 0 | 1.13 | 0.14 | 0.73 | 2.81 | 0.51 | 0.05 |
| “B” día 2 | 0.76 | 0.62 | 0.57 | 1.46 | 1.56 | 0.23 |
| “B” M.O. | 0.5 | - | - | - | 0.36 | 0.16 |
| “C” día 0 | 0.54 | 0.77 | 0.41 | 1.37 | 0.63 | 0.08 |
| “C” día 2 | 1.21 | 0.55 | 0.26 | 2.85 | 1.78 | 0.5 |
| “C” M.O. | 0.21 | - | - | - | 0.3 | 0.25 |

*M.O.= médula ósea

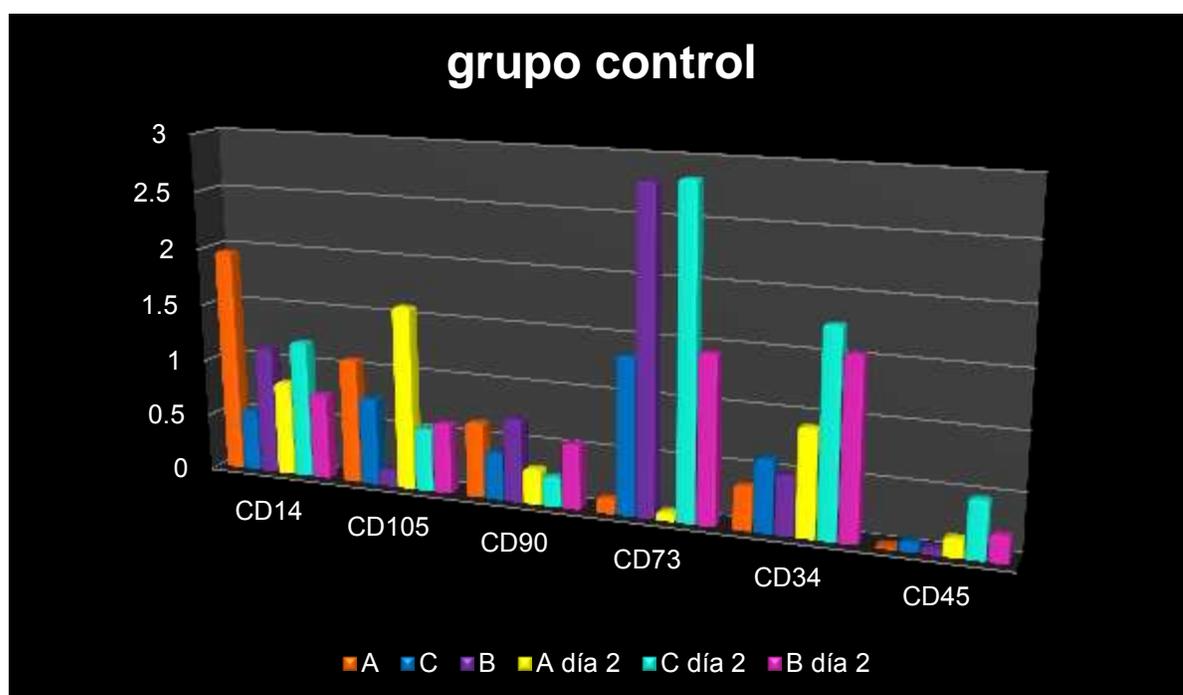


Fig. 12: grafica de los marcadores del grupo control.

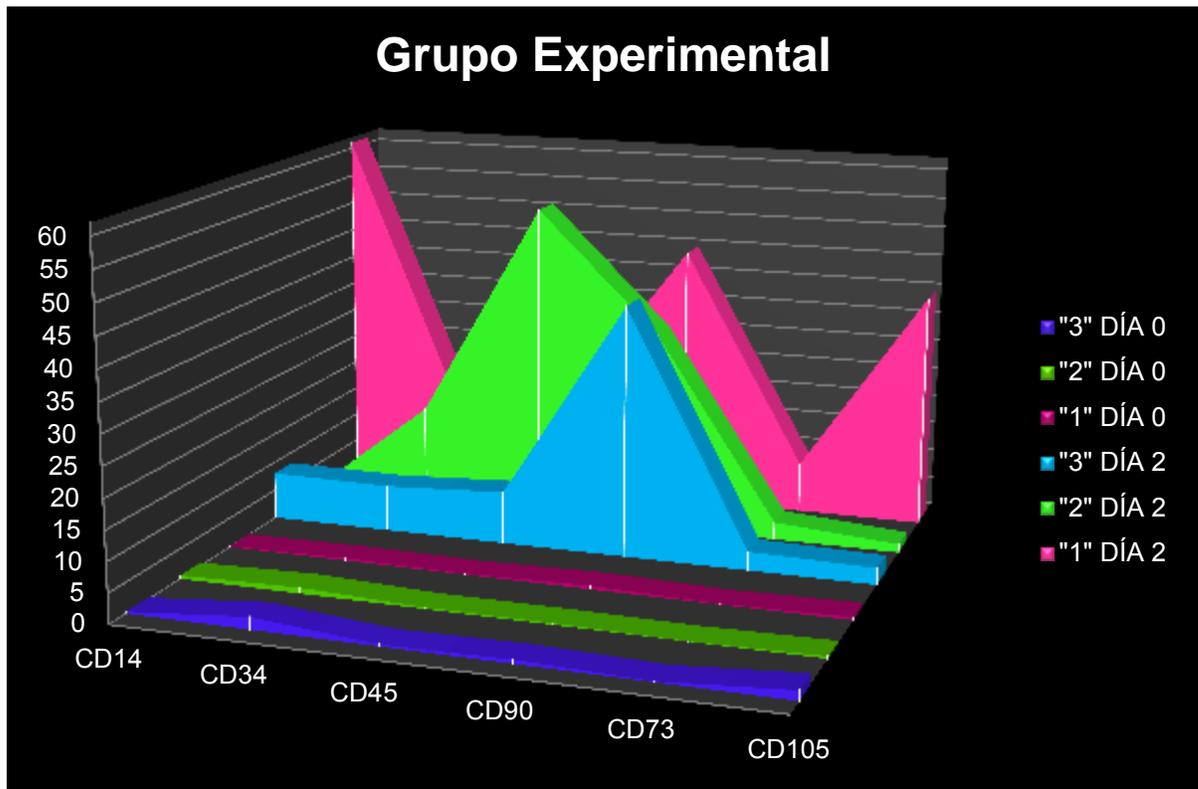


Fig. 13: Comparación del porcentaje obtenido en las citometrías de flujo en el Grupo Experimental

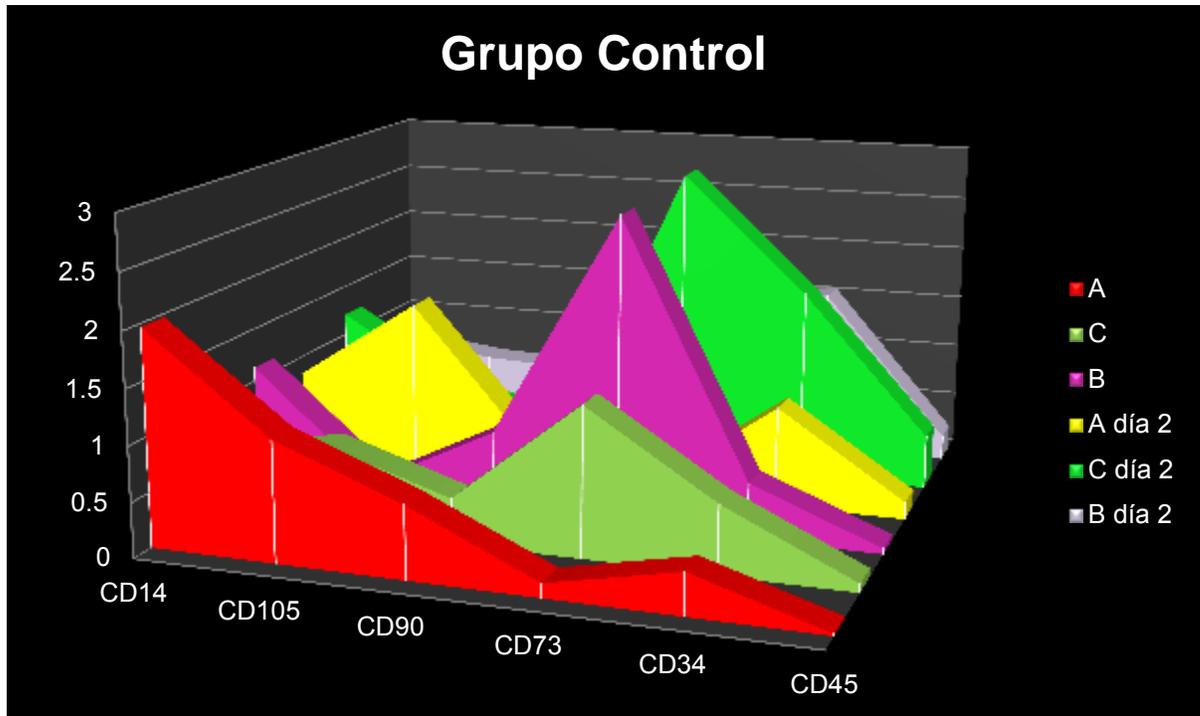


Fig. 14: Comparacion de los porcentajes obtenidos en las citometrías de flujo del Grupo Control

REFERENCIAS

1. Roger K. W. Smith; “Results of treatment of bone marrow derived mesenchymal stem cell therapy”; 15th Annual European ESVOT Congress – Bologna, Italy - 2010.
2. Rosana Pelayo, Jesus Santa-olalla e IvanVelazcos; “Células troncales y medicina regenerativa”; 1ª edición; editorial UNAM PUIS, CPO de INVEST en CEL. TRON; Cd. de Mexico 2011
3. Vazquez F.J, Romero A, Rodellar C; “Medicina regenerativa: aplicación en la clínica equina”; 1er Congreso Solidario de Clínica Equina 2012; Revista Complutense de Ciencias Veterinarias.
4. S. E. Tylor, R.K.W. Smith, P. D. Clegg; “Review Article Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal diseases: scientific fact or clinical fiction?”; Equine Veterinary Journal (2007) 39 (2) 172-180.
5. Mandi J López, Patrick R. Daigle; “Adult multipotentstromall cell technology for bone: A Review”; Veterinary Surgery 42 (2013): 1-11.
6. StefaniaViolini, Paola Ramelli, Laura F. Pisani, Chiara Gorni, Paola Mariani; “Horse bone marrow mesenchymal stem cells embryo stem cell markers and show the ability for tenogenicdiferentiation by in-vitro exposure to BMP-12”; BMC Cell Biollogy 2009, 10:29.
7. Lisa Fortier, Alexander j. Trans; “Stem cells in veterinary medicine”, Stem Cell Research and Therapy 2011, 2:9.
8. Janina Burk, Stephen F. Badilak, Jeremy Kelly, Walter Brehm; “Equine celular therapy- from stall to bench to bedside?”Cytometry Part A. 83A:103-113, 2013.
9. P. D. Clegg; “Review Article: HBLB’s advances in equine veterinary science and pratice musculoskeletal disease and injury now and in the future. Part 2 tendon and ligament injuries”; EquineVeterinaryJournal 44 (2012) 371-75.

10. Verma S, Younus J, Stys-Norman D, et al; "Dose intensive chemotherapy with growth factor autologous bone marrow/ stem cell transplant support in first-line treatment of advanced or metastatic adult soft tissue sarcoma; a systematic review"; *Cancer* 2008; 112: 1197-1205.
11. Hal E. Broxmeyer; "Biomolecule-cell interactions and regulation of myelopoiesis"; *International Journal of Cell Cloning* 4:3778-405 (1986)
12. Jens Koerner, DobrilaNesic, et al; "Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells"; *Stem Cells* 2006; 24: 1613-1619.
13. Erick Platzer; "Human hematopoietic growth factors"; *Eur. Journal Hematology* 1989; 42:1-15.
14. VADEMECUM
15. B. R. Rush; "Clinical use of immunomodulatory agents"; *Equine Veterinary Education* (2001) 13 (1) 45-53.
16. Antonio Crovace, Luca Lacitignola, Giacomo Rossi, EddaFrancioso; "Histological and immunohistochemical evaluation of autologous cultered bone marrow mesenchymal stem cells and bone marrow mononucleated cells in collagenase-induced tendinitis of equine superficial digital flexor tendón"; *Veterinary Medicine International* Vol. 2010, 10 pages.
17. Jennifer M. Rewerts, Carolyn J. Henry; "Veterinary uses of recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor. Part 2 Infectiousdiseases" *TheCompendium* vol. 20, No. 7 july 1998.
18. Ricardo Paez Moreno; "Normas bioéticas para lograr una investigación internacional más equitativa"; *Revista Brasileira de Bioética* 2012; 8(1-4):6-19.
19. Comisión Nacional de Bioética, Consejo de Salubridad General; "Declaración Mexicana y principios básicos de la experimentacion en animales"; 1993.
20. Alicia L. Bertone; "Cell therapy for equine musculoskeletal regeneration"; *Proceedings of the Annual Meeting of the Italian Association of Equine Veterinarians, Montesilvano, Italy* 2011.

21. E.E. Godwin, N.J. Young, J. Dudhia, I.C. Beamish, R.K.W Smith; "Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendón"; Equine Veterinary Journal 44 (2012) 25-32.
22. Reed S.A, Leahy E. R; "Stem cell therapy in equine tendón injury"; Journal Animal Science 16, October 2012.
23. Mayani Hector, Flores-Figueroa Eugenia, et al; "Hematopoyesis"; Cancelorogía (2007): 95-107.
24. Peter J. Quesenberry, Gary S. Stem, Bernard G. Forget, Sherman M. Weissman; "Stem cell biology and gene therapy"; 1998 Wiley-Liss, Inc.
25. Deborah Philp, et al; "Complex extracellular matrices promote tissue-specific stem cell differentiation"; Stem Cells 2005, 23: 288-296.
26. Hinchdiff K.W, Kaneps A.J, Geor Raymond J; "Medicina y cirugía en los equinos de deporte: ciencias básicas by clínicas de los equinos de deporte"; 2ª edición 2007, Editorial Intermedico, Vol 2, Buenos Aires.
27. L. R. Goodrich; "Use of stem cells in tendón and ligament injuries-science and clinical reports"; 12th WEVA Congress Hyderabad, India- November 2011.
28. Reed Stephen A, et al; "Equine internal Medicine", 3ª edición, editorial Sanders Elsevier, 2010.
29. Tobias Neff, Peter Ahor, Victor E Valli, et al; "Pharmacologically Regulated in vivo selection in large animal"; Blood Journal Vol. 100 (6), September 2002.
30. Daniela S. Krause, David T. Scandden, Frederic I. Preffer; "The hematopoietic stem cell niche-home for friend and foe?"; International Clinical Cytometry Society part B 84B: 7-20 (2013).
31. Nuñez O.L, Bouda J, et al; "Patología clínica veterinaria"; FMVZ-UNAM 2007.
32. GutierrezPabello J.A; "Inmunología Veterinaria"; 1ª edición 2010, Editorial Manual Moderno, México.
33. Anzaldúa S, Juárez M, Villaseñor H, Ríos M, Cornejo M; "¿Qué son las células troncales o "células madre"?"; VetMex 2007; 38: 81-104

34. Rodriguez Pardo V; "Células madre: conceptos generales y perspectivas de investigación"; *Universitas Scientarum* 2005; 10:5-14.
35. Eugenia Flores-Figueroa, Juan J. Montesinos, Hector Mayani; "Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica"; *Revista de Investigación Clínica* Vol. 58 (5) Septiembre-Octubre 2006, pp 498-511.
36. Frank P Barry, J Mary Murphy; "Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization"; *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* Vol 36 (4); 568-584 April 2004.
37. Robert J Daens, Annemarie B Moseley; "Mesenchymal stem cells biology and potential clinical uses"; *Experimental Hematology* Vol. 28: 874-884, August 2000.
38. A.P. Croft, S.A. Przyborskii; "Mesenchymal stem cells, from the bone marrow stroma: basic biology and potencial for cell therapy"; *Current Anesthesia y Crital Care* Vol. 15 (2004): 410-417.
39. Mayani Hector, Peter M. Lansdorp; "Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells"; *Stem Cells* 1998, 16:153-165.
40. Breton Short, Nathalie Bronard, et al; "Mesenchymal stem cells"; *Archives of Medical Reserch* Vol. 34 (2003):565-571.
41. MR Alison, S Islam; "Attributes of adult stem cells"; *Journal of Pathology* 2009, 217: 144-160.
42. Alfred P Sloan, Jr. Prize; "The colony stimulating factors"; *Cancer*, May 15, 1990.
43. Wolfgang Oster, Roland Mertelsmann, Friedhelm Herrmann; "Role of colony-stimulating Factor in the biology of acutemyelogenous leukemia"; *International Journal of Cell Cloning* 7:13-29 (1989).
44. Clarck Steven C; "Biological activities of human. Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor"; *International Journal of Cell Cloning* 6:365-377 (1998).
45. L. Castagna, S. Bromanti, A. Levis, et al; "Pelfilgrastim versus Filgrastim after high-dose chemotherapy and autologous peripheral blood stem cell support"; *Annals Oncology* 21: 1482-1485, 2010.

46. Ozer H, Armitage J.O, Bennett C.L, et al; “Update of recomendations for the use of hematopoietic colony-stimulating factors: evidence-based clinical practice guidelines”; Journal Clinic Oncology 2000; 18: 3558-3585.
47. Welte K, Gabrilove J, et al; “Filgrastim (r-met hug-csf) the first 10 years”; Blood Journal (1996) 88:1907-1929.
48. Jan Düring, Christoph Rosenthal, et al; “Intracellular comunication between bone marrow stromal cells and CD34⁺hematopoietic progenitor cells is mediated by connexin 43-type gap junctions”; British Journal og Hematology 2000, 111: 416-425.
49. Francis Sutier, et al; “Decellularized heart valve as a Scaffold for in vivo recellularization: Deleterious effects of granulocyte colony stimulating factor”; The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Vol 131:843-852 2006.
50. G.D. Demetri, J.D. Griffin; “Granulocyte Colony-Stimulating Factor and it’s receptor”; Blood Journal Vol. 78 (11): 2791-2808, 1991.
51. William Besinger, Reginald A. Clift, Claudio Anasetti, et al; “Transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells movilized by recombinant human Granulocyte Colony-Stimulating Factor”; Stem Cells 1996, 14: 90-105.
52. F.J. Garjon Parra, C. MartinezMartinez, et al; “Influencia del horario de administración en la efectividad del Filgrstim en pacientes oncológicos”; Farm. Hosp. 1997, 21 (3) :133-136.