



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN ARTROSCÓPICA DE LA RESPUESTA DE LESIONES
EXPERIMENTALES EN CARTÍLAGO ARTICULAR, AL TRATAMIENTO CON
CÉLULAS MESENQUIMALES DIFERENCIADAS Y SEMBRADAS EN UN
POLÍMERO DE PGA EN EL EQUINO**

TESIS QUE
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
ERIK EDUARDO PÉREZ JIMÉNEZ

TUTOR PRINCIPAL:
DRA. MARÍA MASRI DABA, FMVZ, UNAM

COMITÉ TUTORAL:
DR. JOSÉ CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN, INR
DRA. LISA A. FORTIER, CORNELL, COLLEGE OF VET. MED.

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX MARZO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DECLARACIÓN

El autor da consentimiento a la División de estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

ERIK EDUARDO PÉREZ JIMÉNEZ

DEDICATORIAS

A mi papá y mamá por su incanzable ayuda, ejemplo y consejos, a mis hermanos Lilia y Pablo por todo su apoyo y a Fer por ser parte primordial de este proceso.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia FMVZ

Por el proyecto PAPIIT IT201712

Al Instituto Nacional de Rehabilitación INR de la Secretaría de Salud

Y a los que a continuación menciono:

Dra. Maria Masri Daba – Tutor principal y Directora de Tesis

Dra. José Clemente Ibarra Poncé de León – Comité Tutorial INR

Dra. Lisa A. Fortier – Comité Tutorial Cornell College of Veterinary Medicine

MVZ Mariano Hernández Gil – Director del Departamento de Equinos de la FMVZ

MVZ Elena García Seco – Jefa de Hospital de Equinos FMVZ

Biol. Julieta García, MVZ. Ricardo Gómez y Biol. Valentín Martínez López -
Laboratorio de ingeniería de Tejidos INR

Dr. Aldo Izaguirre – Servicio de Artroscopía INR

Dr. Enrique Villalobos Cordova - Servicio de Artroscopía INR

MVZ Hugo Lecona – Bioterio INR

Biol. David García-Diego - Laboratorio de ingeniería de Tejidos INR

Clínicos, residentes y demás personal – Depto. Equinos FMVZ

A mis compañeros de Diteq: Germán, Roberto, Abraham, Simón y Jenny

A mis compañeros del Laboratorio de ingeniería de tejidos: Vladimir y Angélica.

A mi profesor - MVZ Enrique Núñez Hernández

A Dios, A mis Padres, Eduardo y Lupita, a mis hermanos Lilia y Pablo, a Fer y a
mis amigos.

Gracias a todos por su apoyo y enseñanzas durante este proyecto!

RESUMEN

Los animales han sido extensamente utilizados en múltiples ocasiones para desarrollar modelos de enfermedad articular y para representar condiciones patológicas en humanos. En trabajos de investigación, el conjunto de protocolos de tratamientos en grupos experimentales y modelos *in vitro* e *in vivo* ha facilitado a los investigadores realizar estudios en relativamente corto tiempo y con resultados significativos.

El propósito de este proyecto fue utilizar la combinación de un estudio *in vitro* en el cual se obtuvieron células mesenquimales derivadas de médula ósea de esternón, se cultivaron, expandieron y diferenciaron a condrocitos *in vitro*; y un estudio *in vivo* en el cual mediante artroscopía se implanto un polímero de ácido poliglicólico (PGA) sembrado con células mesenquimales diferenciadas, en una lesión condral creada experimentalmente en la tróclea lateral del fémur de 5 equinos jóvenes de entre 3 y 6 años de edad sin historia de padecimientos o claudicación en miembros posteriores. Los polímeros con las células fueron fijados al hueso subcondral de las lesiones previamente creadas en el miembro posterior izquierdo con anclas y suturas biodegradables. El cartílago articular constituido por condrocitos, está sujeto a enfermedades como artritis reumatoide (AR) y osteoartritis (OA) en donde se presenta una degradación del cartílago. La medicina regenerativa es una rama encaminada, como su nombre lo dice, a la regeneración de los tejidos/órganos mediante el uso de células precursoras llamadas mesenquimales que pasan por un proceso de diferenciación. La ingeniería de tejidos brinda mejores expectativas para la reparación de lesiones condrales. La artroscopía como método diagnóstico y terapéutico ofrece ventajas tales como una mejorada visibilidad, poco invasivo, más estético, menor tiempo de retorno a la actividad y menores complicaciones. La artroscopía de la babilla (articulación femoropatelar y femorotibial lateral y medial) permite evidenciar patologías y estructuras anatómicas tales como osteocondrosis (OCD), fracturas en patela, eminencia intercondilea de la tibia, trócleas, cóndilos femorales y tuberosidad tibial, quistes subcondrales, lesiones en ligamentos cruzados, daños al cartílago, osteoartritis (OA), entre otras.

Los resultados artroscópicos, histológicos e inmunohistoquímicos observados fueron variados e indican que aunque se llevó a cabo un mejor proceso de reparación en el grupo experimental control, lo cual fue estadísticamente significativo. Ambos grupos presentaron características de tejido de reparación fibrocartilaginoso y con evidencia histológica de presencia de contenido de colágena II. En ninguno de los recientes estudios en los que se han probado distintas técnicas de reparación se ha podido demostrar un proceso de regeneración artificial de cartilago. El sembrado de células mesenquimales autólogas diferenciadas en el polímero de PGA demostró ser una opción de tratamiento favorable para promover un proceso de reparación condral, aunque las características del tejido de reparación no son completamente similares a las del cartilago articular.

PALABRAS CLAVE: CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES (CTM), CARTÍLAGO, ARTROSCOPIA DE BABILLA, EQUINO, MEDICINA REGENERATIVA.

SUMMARY

Animals have been extensively used over the years as models of articular disease to represent pathologic conditions in humans. In research projects the combination of treatment protocols in experimental groups *in vitro* and *in vivo* have facilitated investigators to realize studies in a relatively short time period with significant results.

The purpose of this project was to use the combination of an *in vitro* study in which bone marrow derived mesenchymal stem cells were cultivated, expanded and differentiated into chondrocytes; the *in vivo* part of the study consisted in creating experimentally induced lesions in the articular cartilage of the lateral trochlear ridge of the femur in 5 young horses between 3 and 6 years old with no history of hind lameness, and PGA polymer seeded with differentiated MSCs was placed in the left hind limb.

The polymers were placed into the subchondral lesions in the left hind limb of all five horses and such grafts were anchored and sutures in place using biodegradable anchors, with biodegradable sutures.

The articular cartilage composed by chondrocytes, is target of different pathologies such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis in which a chronic degradation of the cartilage is present. Regenerative medicine has as a primary goal, the regeneration of tissue and organs by using precursor cells or MSCs that go through a differentiation process, by these means regenerative medicine provides the best expectations in the repair of chondral lesions.

Arthroscopy as a diagnostic and therapeutic tool provides us advantages such as better visibility, less invasive, more esthetic, less return to the activity time and fewer complications. The stifle arthroscopy allows us to assess pathologies and anatomical structures such as osteochondrosis (OCD), patellar fractures, trochlear and condyle lesions, subchondral cysts, articular damage, osteoarthritis and soft tissue lesions affecting ligaments and/or meniscus, among others.

The arthroscopic, histologic and immunohistochemical results were variable, and even though the experimental group turned out to be better in a statistically

significant manner, both groups showed fibrocartilaginous repair tissue and collagen II presence on different quantity. None of the recent studies in which different cartilage repair techniques have been used has proven to be effective to achieve full cartilage regeneration. Differentiated mesenchymal stem cells seeded in a PGA polymer turned out to be a favorable treatment to promote a cartilage repair process, more efforts should be made towards finding the appropriate methods to achieve a neoformation tissue with higher similarities to those of normal articular cartilage.

KEY WORDS: MESENCHYMAL STEM CELLS MSCs, CARTILAGE, STIFLE ARTHROSCOPY, EQUINE, REGENERATIVE MEDICINE.

TABLA DE CONTENIDO

- I. INTRODUCCIÓN
- II. HIPÓTESIS
- III. OBJETIVO GENERAL
- IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS
- V. JUSTIFICACIÓN
- VI. REVISIÓN DE LA LITERATURA
 - 6.1 Cartílago
 - 6.1.1 Fisiología
 - 6.1.2 Histología
 - 6.2 Matriz extracelular
 - 6.2.1 Condrocitos y su metabolismo
 - 6.2.2 Colágena
 - 6.2.3 Proteoglicanos
 - 6.2.3.1 Agrecano
 - 6.3 Articulación femoropatelar
 - 6.4 Células mesenquimales
 - 6.5 Obtención y procesamiento de médula ósea
 - 6.5.1 Aislamiento y cultivo *in vitro*
 - 6.6 Diferenciación a condrocitos
 - 6.7 Lesiones en Cartílago articular y su reparación natural
 - 6.7.1 Osteoartritis
 - 6.8 Creación de lesiones experimentales
 - 6.9 Modelos de reconstrucción de superficie articular
 - 6.10 Medicina Regenerativa

6.10.1 Polímeros sintéticos

6.11 Evaluación del cartílago articular y tejido de reparación

6.12 Técnicas histológicas e inmunohistoquímicas para cuantificar matriz extracelular

6.12.1 Tinciones

6.12.2 Inmunohistoquímica

VII. MATERIALES Y MÉTODO

VIII. RESULTADOS

8.1 Evaluación y pruebas *in vitro* realizadas con las CTM

8.2 Evaluación artroscópica del tejido de reparación

8.3 Resumen de resultados obtenidos en la evaluación del tejido de reparación

8.4 Evaluación histológica del tejido de reparación

8.5 Tinciones realizadas a tejido de reparación

8.5.1 Interpretación de resultados de tinciones

8.5.2 Resumen de resultados por tinciones

8.6 Inmunohistoquímica realizada a tejido de reparación

8.7 Resumen de resultados obtenido por inmunohistoquímica

8.8 Análisis Estadístico

IX. DISCUSIÓN

X. CONCLUSIONES

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

EVALUACIÓN ARTROSCÓPICA DE LA RESPUESTA DE LESIONES EXPERIMENTALES EN CARTÍLAGO ARTICULAR AL TRATAMIENTO CON CÉLULAS MESENQUIMALES DIFERENCIADAS SEMBRADAS EN UN POLÍMERO DE PGA EN EL EQUINO

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad articular es la causa más importante de desecho del caballo de uso deportivo y una de las pérdidas económicas de mas impacto en la industria equina (42). Las lesiones articulares focales comúnmente ocurren durante eventos deportivos, y pueden terminar en la pérdida de función de una articulación. La respuesta inflamatoria consecuencia de daño articular agudo lleva a la proliferación de liquido sinovial, dolor y perdida de función articular. La capacidad intrínseca de reparación articular es limitada, principalmente en adultos y un tratamiento efectivo para daño a cartílago articular continua siendo un reto a pesar de los avances en medicina regenerativa (11).

Los trabajos realizados a la fecha destacan la necesidad de modelos apropiados para el estudio de la eficacia de las células mesenquimales en regeneración de tejidos. Comparado con medicina humana, la medicina veterinaria tiene una gran ventaja ya que la investigación puede ser traspolada directamente a pacientes clínicos. Los modelos animales también son necesarios para demostrar los beneficios asociados con nuevas terapias o productos y las pruebas preclínicas de los nuevos tratamientos o equipos deben ser probadas para garantizar su seguridad y eficacia. Los equinos constituyen un modelo apropiado para la investigación de terapias regenerativas de cartílago ya que las características físicas y morfológicas son similares a las del humano lo que permite representar adecuadamente los procesos de reparación y la respuesta a múltiples tratamientos experimentales (46,7).

La babilla de los equinos es una compleja articulación compuesta de 4 huesos, 2 meniscos y 14 ligamentos, es una articulación con alto grado de movilidad y

planos de flexión, extensión y rotación. Existen 3 distintos compartimentos los cuales pueden estar comunicados entre sí en algunos casos, debido a esto es importante considerar esto al momento de diagnosticar y tratar enfermedades en esta región. El diagnóstico de claudicaciones relacionadas a padecimientos en la babilla es un reto y generalmente son patologías menos frecuentemente diagnosticadas que otras involucrando el miembro posterior de los equinos. Algunos de los problemas más comúnmente encontrados son, osteocondrosis, quistes subcondrales, fijación de la patela, lesiones de menisco, desmitis de ligamentos colaterales, patelares o cruzados, lesiones de cartílago articular y osteoartritis (29). La osteoartritis es una de las enfermedades más económicamente importantes a las que se enfrenta el médico veterinario especialista en equinos. Las lesiones al cartílago articular están presentes en más del 60% de los procedimientos de artroscopía de articulación femoropatelar y está demostrado que pueden afectar la calidad de vida y son una de las causas principales de claudicación en el equino. Por estas razones, la investigación de las lesiones articulares en caballos continua siendo uno de los principales ámbitos de investigación en la medicina equina. La relación con las enfermedades en humanos permite al investigador utilizar las bases de conocimiento en relación a la patofisiología de la enfermedad (3,12).

La osteoartritis es una de las enfermedades más importantes económicamente a las que se enfrentan los médicos veterinarios de equinos. La pérdida de la función asociada a daño en las articulaciones es uno de los principales problemas en la industria equina, el 60% de las claudicaciones se relaciona con problemas de osteoartritis (3). En casos de osteoartritis la estructura normal y la función del cartílago articular se ven afectados, llevando a anormalidades bioquímicas, estructurales y biomecánicas en todos los tejidos que componen la articulación. Se considera la causa principal de problemas de claudicación en el equino (1).

El tratamiento de la osteoartritis, ya sea basado en terapias celulares o tratamientos más convencionales, es mucho más complicado que la reparación de

defectos condrales focales. En articulaciones con osteoartritis, la enfermedad se presenta de manera difusa e involucra ambas superficies articulares, así como otras estructuras dentro de la articulación como son la membrana sinovial, Cápsula articular, ligamentos, meniscos y el hueso subcondral, todas estas comprendidas dentro del proceso patológico de la enfermedad (3).

Raramente el cartílago articular regenera una superficie funcional hialina posterior a una lesión, incluso este tipo de laceraciones en el cartílago entran en una fase benigna de no-reparación, la cual permanece por un largo periodo de tiempo. Lesiones condrales más profundas y las cuales sobrepasan el límite entre cartílago y hueso subcondral son las que resultan en una mejorada respuesta de cicatrización, esto se debe principalmente a la proliferación de células mesenquimales indiferenciadas provenientes de tejidos que se encuentran más profundos en este caso el hueso subcondral. En el caballo este proceso de granulación a tejido fibroso y de tejido fibroso a fibrocartílago es más lento que en roedores (15).

La pérdida en función de tejido musculoesquelético puede terminar con la carrera y en algunos casos con la vida de un caballo. No es ninguna sorpresa el hecho de que tejidos como el cartílago, tendones y ligamentos, láminas del casco, meniscos, piel y córnea, entre otros, se encuentren dentro de los objetivos de la medicina regenerativa (2). Las terapias basadas en el uso de células para el tratamiento de enfermedades articulares en el caballo han sido reportadas desde hace tres décadas, motivadas por el impacto significativo que tienen las enfermedades articulares en caballos de alto rendimiento, la poca capacidad de autoreparación del cartílago articular y las actuales limitaciones médicas y quirúrgicas para tratar la artritis (4).

Se han desarrollado varias estrategias enfocadas en el objetivo de regenerar el cartílago articular funcional, con resultados variados. Además de la relevancia directa de la reparación de cartílago articular en atletas equinos, los caballos han

servido como un excelente modelo experimental para modelos de investigación enfocados en la reparación articular. Algunos de los métodos anteriormente utilizados con resultados prometedores son los injertos autólogos, en los cuales los injertos osteocondrales han demostrado ser los más factibles para su uso en caballos, la mosaicoplastia ha sido utilizada exitosamente en varios casos de lesiones quísticas en los cóndilos femorales, metacarpos y Talus, con algunas limitaciones (4). Otro método utilizado con mayor frecuencia son las microfracturas en hueso subcondral perforando hasta 2-3 mm para promover la liberación de células troncales y factores de crecimiento, en conjunto con concentrados de médula ósea o proteína antagonista de receptores de interleucina (IRAP) (4,15).

Otros métodos que se han utilizado con el objetivo de reparar el cartílago articular son, desbridación del cartílago articular, condroplastia por abrasión, reanclaje de fragmentos condrales, trasplante de condrocitos, trasplante de células mesenquimales y reparación de cartílago por factores de crecimiento mejorados (15). El trasplante o la implantación de condrocitos es un método que se ha estudiado y utilizado con efectividad en los últimos tiempos, la utilización de materiales sintéticos y biocompatibles ha facilitado el posicionamiento y la permanencia de los condrocitos en los sitios de lesión articular mejorando considerablemente el pronóstico de los pacientes y la reparación de lesiones articulares. Dichos procedimientos de implantación de condrocitos son posibles gracias a una obtención previa de dichas células del paciente lo que contempla un procedimiento quirúrgico previo y un gasto mayor, así como múltiples métodos invasivos y traumáticos para los pacientes. En un estudio en el que se utilizaron condrocitos autólogos expandidos *in vitro* y sembrados sobre un disco de ácido poliglicólico/poliláctico (PGA/PLLA) el cual se implantó mediante artroscopía en un defecto condral, se evaluó el tejido de reparación mediante artroscopía y se concluyó que las características eran mejores en el tejido de reparación de los grupos experimentales que en los controles, condición que coincide con lo que otros investigadores han observado con experimentos similares. En estos estudios

es indispensable contar con la certeza de que la células son viables al momento de ser implantadas (12,43,44).

En un estudio realizado en 2009, se evaluó la respuesta a mediano plazo de la reparación de lesiones a cartílago articular de borrego, comparando el uso de polímeros de ácido poliglicólico (PGA) y ácido hialurónico sin células y microfracturas contra lesiones tratadas con microfracturas solamente. En dicho estudio se concluyó que las lesiones en las que se colocó el polímero de PGA sin células en adición a las microfracturas, indujeron una reparación de tipo cartilaginosa y con presencia de colágena tipo II. Las lesiones que se trataron solo con microfractura, desarrollaron una combinación de tejido cartilaginoso y fibrocartílago hacia los márgenes de la lesión. Se sugiere que cubrir con un polímero de PGA las lesiones que se han microfracturado, puede ser una opción prometedora de tratamiento contra defectos condrales y mejoran la regeneración del cartílago articular (51).

Hace aproximadamente 5 décadas, Friedstein, y colaboradores Describió una población de células no hematopoyéticas aisladas de la médula ósea del humano con la habilidad *in vitro* de adherirse, proliferar y diferenciarse a condrocitos, osteoblastos y adipocitos. Debido a sus propiedades de diferenciación y la relativa facilidad para aislarlas y expandirlas *in vitro*, estas células mesenquimales eran naturalmente consideradas como una atractiva fuente de células progenitoras para ingeniería de tejidos y aplicaciones en medicina regenerativa. La gran capacidad de proliferación y diferenciación de las células mesenquimales es controlada por una extensa lista de factores de crecimiento, citocinas, hormonas, moléculas de señalización tanto solubles como insolubles y factores de transcripción. Los tejidos musculoesqueléticos demandan una específica forma y fuerza mecánica, y el éxito de la ingeniería de tejidos es dependiente de las interacciones dinámicas de las células, polímeros o andamios y diversos tipos de señalización tanto físicas como químicas (19).

Las células mesenquimales son una fuente inmediata de células autólogas para injertos y existen diversas regiones de donde pueden ser obtenidas y cosechadas para su proliferación *in vitro* y diferenciación previa a su implantación en defectos condrales. En caballos, el esternón provee una mejor fuente de células mesenquimales que la tuberosidad coxal y se puede obtener con el paciente de pie. El comportamiento de las células mesenquimales en cultivos tridimensionales es de gran importancia ya que imitan el medio ambiente del cartílago de manera más adecuada (15).

Los dos tipos más comunes de células mesenquimales utilizados en medicina veterinaria, son las obtenidas a partir de médula ósea y las obtenidas a partir de grasa; cualquiera de estas dos fuentes de células mesenquimales puede ser viable tras un periodo de cultivo y expansión. Adicionalmente a estas células derivadas de pacientes adultos, actualmente se encuentran en desarrollo diversos estudios para determinar si es factible el uso de células de pacientes neonatales como fuente de células mesenquimales, las cuales se obtendrían a partir de fibroblastos fetales, sangre de cordón umbilical, tejido de cordón umbilical, tejido placentario y líquido amniótico. De estas fuentes solo las células obtenidas a partir de tejido de cordón umbilical se utilizan clínicamente y de manera alogénica. Los esfuerzos de investigación deben estar dirigidos a determinar el número específico de células que son necesarias para tratar cada caso y patología, así como las vías de administración y formulación y frecuencia de las dosis (9).

La manera exacta en cómo es que las células mesenquimales ayudan a la reparación de tejidos continua siendo controversial, no es claro si contribuyen mediante integración y diferenciación hacia el tejido lesionado o mediante secreción de factores tróficos. Es probable que contribuyan principalmente a la reparación de lesiones isquémicas, inmunomediadas e inflamaciones agudas, vía secreción de factores antiinflamatorios, vasoactivos e inmunomoduladores. Sin embargo las células mesenquimales también han demostrado eficacia en reparación de tejidos de fracturas y defectos profundos de cartílago, en los que se

han aplicado en conjunto con materiales biocompatibles y actúan mas como un injerto (46).

Un estudio preliminar en el 2014 comparo la respuesta de lesiones articulares degenerativas a 4 distintos tratamientos, Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Células Mesenquimales (CTM), CTM +PRP y CTM + PRP inducidos condrogenicamente; todos los tratamientos fueron aplicados mediante inyección articular. Los dos protocolos en los que se combino PRP + CTM ya fuera con inducción condrogénica o no, mejoraron significativamente la evolución clínica inmediata y tardía en comparación a la aplicación de PRP solo, en el caso de la aplicación de CTM solas, la mejoría también fue considerable, aunque es prudente mencionar que ninguno de los caballos se encontraba en un estadio tardío de osteoartritis lo cual puede modificar significativamente el pronóstico de cada paciente (47).

Al seleccionar un material apropiado como andamio, un microambiente debe ser creado con la finalidad de imitar la situación *in vivo* y un ambiente que promueva la condrogénesis de las células troncales mesenquimales. Los andamios proveen un microambiente tridimensional (3D) que permite a las células anclarse, permite el intercambio de gas y nutrientes y promueve la síntesis de matriz extracelular (MEC). Una gran variedad de polímeros naturales y sintéticos se han utilizado para crear andamios para el estudio de condrogénesis, tales como, estructuras fibrosas, esponjas porosas, mallas tejidas y no tejidas, e hidrogeles (5).

Anteriormente se ha utilizado el trasplante de condrocitos autólogos como alternativa en medicina humana y modelos animales con resultados satisfactorios, sin embargo este método requiere de un procedimiento quirúrgico para colección de muestras y su procesamiento. Los resultados experimentales a la fecha utilizando condrocitos autólogos muestran que el tejido de reparación no es cartílago normal. (44)

En el presente estudio, se propone desarrollar una técnica de reparación de lesiones osteocondrales mediante el uso de artroscopía e ingeniería de tejidos utilizando células mesenquimales derivadas de médula ósea, sometidas a diferenciación condrocítica y sembradas en un polímero de ácido poliglicólico (PGA).

II. HIPÓTESIS

Las características artroscópicas, histológicas y bioquímicas del tejido de reparación obtenido a partir de la implantación de un polímero de ácido poliglicólico (PGA) sembrado con células mesenquimales autólogas diferenciadas a condrocitos en un defecto condral de espesor total, serán muy similares a las del cartílago articular normal.

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar mediante artroscopía, histología e inmunohistoquímica al tejido de reparación de una lesión condral de espesor total, obtenido como respuesta al implante de un polímero de ácido poliglicólico (PGA) sembrado con células mesenquimales autólogas diferenciadas a condrocitos.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener células mesenquimales a partir de médula ósea, diferenciarlas a condrocitos y sembrarlas *in vitro*, en un polímero de ácido poliglicólico (PGA).
2. Implantar el polímero de PGA sembrado con células mesenquimales diferenciadas en una lesión condral experimental de espesor total.
3. Evaluar artroscópica, histológica e inmunohistoquímicamente al tejido de reparación en las lesiones condrales.

V. JUSTIFICACIÓN

La osteoartritis como factor principal en el bajo desempeño y retiro de caballos de la actividad deportiva es un problema que conlleva largos tratamientos paliativos y con un gran impacto económico en los propietarios de equinos, muchas veces sin lograr que los caballos retomen su nivel de actividad normal y con pronósticos de reservados a malos.

La necesidad de contar con diferentes opciones de tratamientos que contemplen la salud e integridad de las articulaciones mejorando los pronósticos a largo plazo y prolongado la vida activa de los equinos, nos lleva a continuar generando conocimiento en cuanto a la utilización de métodos de ingeniería de tejidos en conjunto con bioingeniería.

Los métodos de implantación de condrocitos autólogos han demostrado ser una opción viable para el tratamiento de defectos significativos del cartílago articular y se han establecido parámetros adecuados para las técnicas artroscópicas de implantación y la utilización de polímeros sintéticos o biológicos que proporcionan un medio adecuado para el crecimiento celular y la reparación de tejido condral.

La obtención y procesamiento de médula ósea como fuente de células mesenquimales para su uso en el tratamiento de lesiones articulares en conjunto con la utilización de materiales sintéticos biocompatibles y biodegradables, proponen una alternativa eficaz y menos invasiva para tratar estos padecimientos. La ingeniería de tejidos en conjunto con otras áreas de investigación como son la biología, bioingeniería y medicina regenerativa, constituyen un campo multidisciplinario que podría mejorar en gran medida la calidad de vida de pacientes ortopédicos con mejoría significativa y pronósticos positivos a largo plazo.

VI. REVISIÓN DE LA LITERATURA

6.1 Cartílago articular

Es el principal tejido funcional de una articulación y permite simultáneamente la locomoción y el soporte de cargas. El cartílago cubre la base subcondral de los huesos que componen una articulación. Está compuesto de agua, colágena y proteoglicanos. Los condrocitos constituyen menos del 2% del volumen total del cartílago en la mayoría de las especies. Es un tejido avascular, aneural y alinfático el cual es nutrido mediante el líquido sinovial. Estructuralmente presenta diferentes arreglos a nivel microscópico, en tres zonas no mineralizadas y una mineralizada. La zona superficial donde hay una capa acelular y con gran contenido de proteoglicanos por debajo de ésta hay otra capa con una alta densidad de condrocitos que son relativamente pequeños y alargados casi no hay proteoglicanos y las fibras de colágena se encuentran posicionadas de manera paralela lo que impide el paso de grandes moléculas y células inflamatorias hacia los condrocitos. La zona de transición se caracteriza por presentar células alargadas y redondas las fibras no presentan un arreglo especial y el contenido de glicosaminoglicanos es alto. La zona profunda las células son más largas y las fibras de colágena se arreglan de manera perpendicular y el contenido de agua es bajo. La zona calcificada es la más profunda y separa al cartílago hialino del hueso subcondral (22, 25, 27, 31, 36).

La mayoría de nuestros huesos se forman a partir de osificación endocondral, la cual está estrictamente regulada por la actividad de la placa de crecimiento condral. La maduración condrocítica a través de las varias etapas de la fisiología de la placa de crecimiento, al final resulta en hipertrofia, y esta hipertrofia es esencial para contribuir al crecimiento longitudinal de los huesos (69).

Este tejido es responsable de la distribución de las cargas y en una articulación sana las superficies cartilaginosas se deslizan estrechamente una sobre otra

prácticamente sin generar fricción incluso en situaciones donde hay aplicación de peso (1).

El cartílago articular es notoriamente incapaz de llevar a cabo una reparación adecuada de los daños a su superficie, en parte como consecuencia de la relativa hipocelularidad y la naturaleza avascular del tejido. A esta limitación se le suma el hecho de que las superficies articulares son expuestas a una gran carga y estrés durante las competencias de alto nivel (4).

6.1.1 Fisiología

Los proteoglicanos y el colágeno, son los principales responsables en proveer la capacidad al cartílago articular de funcionar adecuadamente. Los proteoglicanos otorgan una capacidad de hidratación alta mientras las fibras de colágena están sometidas a una tensión máxima. Por esta razón, el cartílago articular es un material bifásico compuesto de una fase sólida reforzada por fibras y permeable-porosa, y una fase fluida que elimina líquido libremente. Es esta naturaleza bifásica la que le confiere al cartílago articular las propiedades biomecánicas necesarias para contrarrestar el estrés asociado con la función articular.

Los proteoglicanos son hidrofílicos por naturaleza lo que facilita que el agua estructural quede retenida en su matriz. El grado de infiltración es como máximo del 20% ya que los proteoglicanos están embebidos en una matriz de fibras de colágena, esta estrecha relación entre ambos componentes es la base funcional responsable de la salud y el mantenimiento del cartílago articular.

Durante las cargas, las fuerzas de compresión causan una deformación del cartílago, la cual continúa hasta que se equilibren las fuerzas de compresión y la fuerza hidráulica, la cual ocurre proporcionalmente.

Una vez que las fuerzas de compresión cesan, los nutrientes y agua que salieron de la matriz vuelven a entrar dilatando así los proteoglicanos y a su vez retornando al cartílago a su forma original.

Con la edad existe un descenso de la hidratación del colágeno, de la concentración de glicosaminoglicanos especialmente del condroitín sulfato, y del tamaño de los proteoglicanos, los cuales sufren modificaciones como consecuencia de las divisiones proteolíticas que aparecen en todas las edades. El resultado de estos cambios en el cartílago articular relacionados con la edad, dará lugar a una matriz con capacidad reducida para hacer frente a las cargas soportadas durante el funcionamiento habitual de la articulación (28).

Mediante el uso de ácido hialurónico, glicosaminoglicanos polisulfatados y/o tiludronato, es posible modificar la fisiología de las articulaciones influenciando las células del sistema musculoesquelético. El ácido hialurónico ha sido utilizado en caballos desde los 70s, y se ha demostrado que posee la capacidad de interactuar con los receptores de CD44 para modular la proliferación, migración y expresión de genes; así como ayudar a disminuir los mediadores inflamatorios y neuropéptidos causantes de dolor en enfermedades articulares. Los glicosaminoglicanos polisulfatados estimulan la producción de proteoglicanos, síntesis de colágeno y glicosaminoglicanos de producción natural, y la disminución en la liberación de PGE2. Los bifosfonatos como el tiludronato están diseñados para inhibir la función osteoclástica y proveer un efecto antiinflamatorio moderado. En general los modificadores fisiológicos son clínicamente útiles para casos de enfermedad articular (56).

6.1.2 Histología

Para identificar histológicamente al cartílago articular es necesario evaluar la apariencia de sus células y de su MEC. Comúnmente se observa a los condrocitos bien desarrollados, con núcleos redondos u ovoides y se encuentran dentro de su citoplasma. El cartílago articular está dividido histológicamente en 4 zonas, superficial, media, profunda y el cartílago calcificado, mismas que se pueden diferenciar por las características morfológicas de la matriz y su bioquímica. Las 3

primeras zonas tienen como diferencia la manera en que las células están distribuidas y su disposición (1,23).

Cada zona del cartílago articular cuenta con las capacidades necesarias para hacer al tejido en conjunto lo suficientemente resistente y durable. Cada una de las zonas del cartílago, a su vez se divide en 3 distintas zonas, pericelular, territorial e interterritorial. La zona pericelular y territorial proveen los medios de unión entre los condrocitos y la matriz extra celular y la protección durante la carga articular, individualmente la zona pericelular está compuesta casi en su totalidad de proteínas de unión, mientras que la territorial está compuesta por fibras de colágena que a su vez se unen a la zona pericelular. La zona interterritorial es responsable de las propiedades mecánicas del tejido y está formado por fibras de colágena con un diámetro mayor y en una orientación mas paralela (23,24,26,30,33).

6.2 Matriz extracelular

El cartílago está compuesto de una matriz extracelular (MEC) tanto sólida como líquida. La MEC sólida esta compuesta por una densa red de moléculas especializadas que le proveen al tejido sus propiedades mecánicas particulares. El peso húmedo de esta estructura esta dado por la cantidad de colágena, predominantemente el tipo II, por los proteoglicanos y proteínas de unión. La MEC altamente cargada y particularmente los proteoglicanos, atrapan una gran cantidad de agua dentro de la matriz lo que comprende el componente líquido de la matriz del cartílago. Juntos, estos elementos forman la red fibrosa llena de líquido con largas fibras de colágena intercaladas con una gran cantidad de agregados de proteoglicanos, tales como el agregano con queratina y condroitín sulfato unidos covalentemente, estas a su vez unidas a largas cadenas de ácido hialurónico (19).

Molecularmente la matriz extra celular cuenta con una porción fibrilar formada por una red de fibras de colágena tipo II, VI, IX, X y XI. La matriz extra celular también

posee una porción no fibrilar la cual está formada por monómeros sulfatados de agregano, unidos al ácido hialurónico por una proteína de unión, formando así los agregados proteoglicanos, por lo que la agregación de los últimos evita que se salgan de la matriz extracelular cuando se ejerce una carga articular (24,26,30,33,39).

La principal función del cartílago articular depende del estado de hidratación y del arreglo estructural de su matriz extracelular. Aunque gran parte del peso del cartílago está compuesto por su alta cantidad de agua (70%), el peso en base seca está dividido en 50% colágena, 35% proteoglicanos, 10% glicoproteínas, 3% aceite mineral, 1% lípidos y 1-12% de condrocitos. Microscópicamente el cartílago articular es heterogéneo con variación en microestructura entre diferentes articulaciones, áreas de carga y de no carga, y entre animales jóvenes y adultos (24,26,33).

6.2.1 Condrocitos y su metabolismo

Los condrocitos comprenden menos del 10% del volumen del tejido condral. La amplia distribución de condrocitos es muestra de su amplia importancia en mantener el balance entre la síntesis anabólica de los compuestos de la MEC y el continuo proceso de remodelación y degradación a través del tiempo. Los condrocitos demuestran un perfil altamente transcripcional *in situ*, lo que refleja su fenotipo cartilaginoso, el cual se pierde una vez que estas células se de-diferencian en cultivo de monocapa *in vitro*, sin embargo este proceso es reversible, y los condrocitos pueden regresar a su forma madura si son sembrados en cultivo tridimensional como en el caso de polímeros. Cabe mencionar que una vez que estos condrocitos han sido expuestos a un cultivo bidimensional y un proceso de de-diferenciación, algunos cambios fenotípicos irreversibles ocurren, tales como la expresión de colágena tipo I la cual lleva al tejido a un proceso de fibrosis reduciendo así las propiedades mecánicas de la matriz y comprometiendo

la apropiada reparación del tejido o el cartílago desarrollado con ingeniería de tejidos (19).

El proceso de condrogénesis esta caracterizado por la expresión del factor de transcripción Sox9 del cartílago, y la inducción de genes específicos de colágena II y agrecano. Una vez formados los condrocitos elevan su tasa de proliferación y bajo un estricto control de factores endógenos y exógenos, estas células se retiran de este ciclo celular y se diferencian en otros linajes. Esta diferenciación es acompañada por un aumento de volumen celular o hipertrofia.

Las diferentes fases de la diferenciación condrocítica ocurren en una estructura muy bien organizada conocida como placa de crecimiento, la cual tiene diferentes zonas de descanso, proliferación y de condrocitos hipertróficos (69).

6.2.2 Colágena

Está compuesto por una triple hélice de cadenas polipeptídicas. Existen diferentes tipos de colágeno que se distinguen por la composición de las cadenas. Aproximadamente el 90-95% de la colágena articular es del tipo II, sin embargo también se encuentran colágena tipo V, VI, IX y XI en menor cantidad.

La colágena tipo II es un homotrímero y la molécula está formada por 3 cadenas $\alpha-1$ unidas covalentemente, este tipo de colágena tiene un alta cantidad de grupos de carbohidratos unidos, lo que le permite una mayor interacción con el agua a diferencia de otras colágenas. La colágena tipo IX y XI, junto con la del tipo II, forman fibras que se enredan entre sí para formar una malla organizada que provee la fuerza tensil al cartílago articular, además de que físicamente atrapa a las otras macromoléculas como son los proteoglicanos (18).

6.2.3 Proteoglicanos

Están compuestos por numerosas cadenas de glicosaminoglicanos (GAGs) unidas a una proteína central. Los GAG son unidades de disacáridos que llevan un

azúcar aminosulfatado. Existen cuatro GAGs que pueden asociarse con proteoglicanos: Hyaluronán, condroitín sulfato y dermatán sulfato, heparán sulfato y keratán sulfato. El hyaluronán es el único glucosamino no sulfatado.

Los Glicosaminoglicanos son polisacáridos aniónicos no ramificados hechos de disacáridos que se repiten (26,33,39).

El condroitín sulfato y el keratán sulfato también aparecen en el fibrocartílago pero en menor cantidad. El condroitín 6-sulfato es el principal de todos los GAGs ya que es el que se encuentra en mayor cantidad en el cartílago articular inmaduro.

Los proteoglicanos cuentan con sitios de fijación para ciertas moléculas de señalamiento, como lo es el factor de crecimiento transformante beta TGF- β (17).

La concentración de proteoglicanos incrementa a medida que aumenta la profundidad del cartílago desde la superficie articular, esto probablemente debido a que se requieren para resistir las fuerzas de compresión, y las fibras de colágena están más concentradas en la superficie, donde son requeridas para resistir la tensión cuando es aplicada una carga (24,26,33,37,39).

6.2.3.1 Agrecano

Es el más común de los proteoglicanos del cartílago articular. Está compuesto de una proteína central que tiene más de 100 cadenas de GAG unidas. El condroitín sulfato y el keratán sulfato son los GAGs presentes en agrecano, el cual se encuentra como un agregado de moléculas unidas a una molécula simple de hyaluronán, y esta unión es estabilizada por una glucoproteína.

Las moléculas de agrecano rellenan la mayoría de los espacios interfibrilares de la matriz extracelular y se cree que junto con el líquido tisular que atraen, son las principales responsables de la distribución de las fuerzas de compresión al cartílago, ya que le confieren su elasticidad y capacidad de recuperar su forma normal después de ser deformado (18,33).

6.3 Articulación femoropatelar

La babilla es una compleja articulación compuesta de 4 huesos, 2 meniscos y 14 ligamentos. Es una articulación con alto grado de movimiento con diferentes grados de flexión, extensión y rotación. Existen 3 compartimentos articulares los cuales pueden o no estar comunicados entre sí, cranealmente la articulación femoropatelar en la que se encuentran las trócleas femorales lateral y medial, proximal a esta articulación existe un cojinete suprapatellar y distal a la articulación un colchón grande de grasa la cual puede interferir con inyecciones articulares y examinación artroscópica. Los ligamentos patelares, medial, medio y lateral proveen el anclaje distal mientras que otros 2 ligamentos estabilizan la patela proximalmente y la mantienen sobre el surco intertroclear.

La localización topográfica de las lesiones experimentales es de gran importancia ya que de esto puede depender la apropiada reparación de lesiones y de su evaluación posterior (29).

En un estudio realizado en 2013 en borregos, se estableció la hipótesis de que las lesiones en cóndilo femoral medial sufrían un proceso de reparación mejor al de la tróclea del fémur. En dicho estudio se realizaron lesiones simultáneamente en cóndilo medial y tróclea lateral del fémur en áreas de apoyo, dichas lesiones fueron perforadas hasta llegar a hueso subcondral, después de 6 meses *in vivo* la reparación de cartílago y el desarrollo de osteoartritis fue evaluada macroscópica, histológica, inmunohistoquímica y bioquímicamente. La apariencia macroscópica y el contenido de colágena tipo II fue mejor en la tróclea y con mayor contenido de DNA de proteoglicanos en el cóndilo femoral. En este estudio se concluyó que la tróclea de los borregos exhibe patrones de reparación articular similares a los del cóndilo femoral de los humanos (16).

6.4 Células troncales mesenquimales (CTM)

Desde su descripción en los 60s, las CTM han demostrado poseer capacidad de diferenciación a diferentes linajes de tejidos mesenquimales como son, cartílago, hueso, grasa, musculo, tendón y con características hematopoyéticas. Además de estos linajes de tejidos, también se pueden diferenciar en hepatocitos y tejidos neurológicos. Experimentalmente las CTM son identificadas, primero por su habilidad para adherirse al plástico, la capacidad proliferativa y de diferenciación es determinada por la expresión de una combinación de marcadores de superficie, los cuales se especifican más adelante (19).

La ventaja de las células mesenquimales de adultos, las cuales tienen el potencial de eventualmente sustituir a los condrocitos autólogos y su métodos de obtención, es que pueden ser obtenidas fácilmente mediante un aspirado de médula ósea u otros tejidos derivados del mesodermo y poseen una alta capacidad de expansión y son capaces de diferenciarse en diferentes linajes mesenquimales, en particular linaje condral de manera *in vitro e in vivo*. Para el propósito de regeneración articular se han estudiado y hecho análisis en varios microambientes apropiados para promover condrogénesis en células mesenquimales *in vitro* (20).

La expresión de marcadores de superficie tales como CD73, CD90, CD105, CD44, entre otros, y la ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD19, CD34, CD45, aunque no son suficientes para identificar CTM, ha sido avalada por la Sociedad Internacional de Terapia Celular como el mínimo requerimiento positivo necesario para considerar que se trata de células mesenquimales. Usualmente una combinación de anticuerpos es utilizada para caracterizar retrospectivamente el fenotipo de las células mesenquimales; lo único indiscutible acerca de dichas células es su habilidad de proliferación que consiste en la auto renovación y la capacidad de mantenerse en un estado de indiferenciación hasta el momento en

que la señal adecuada de diferenciación es aplicada y la capacidad de diferenciación a linajes mesenquimales específicos (19).

A pesar del gran uso de células troncales para tratar problemas musculoesqueléticos en caballos, existen pocos reportes de información clínica a largo plazo. Los dos tipos de células mesenquimales más comúnmente utilizadas en medicina veterinaria son, las derivadas de médula ósea y derivadas de tejido adiposo. El aspirado de médula ósea puede ser aislado, expandido y cultivado en el laboratorio por 2-3 semanas para obtener un mayor número de células mesenquimales o se puede utilizar inmediatamente in situ como concentrado de médula ósea posterior a una centrifugación. El concentrado de médula ósea contiene células troncales y plaquetas pero la cantidad de células troncales será menor a la encontrada en médula ósea cultivada y expandida (9).

6.5 Obtención de médula ósea

Las CTM son raras en la médula ósea, si consideramos que del total de células nucleadas contenidas en una muestra, solo el .001-.01% son mesenquimales (9). Mientras la médula ósea continua siendo la mejor fuente de tejido para obtención de células mesenquimales, células con características similares han sido identificadas en otros tejidos. La función endógena y la localización exacta de dichas células troncales en los diferentes tejidos aun no ha quedado clara, sin embargo se piensa que participan en procesos locales de reparación y regeneración de tejido. Las CTM de médula ósea pueden dar origen a células estromales que promueven hematopoyesis *in vitro* e *in vivo*, y posiblemente proveyendo los componentes extracelulares necesarios así como factores de crecimiento y citocinas (19).

En un estudio realizado en 2012, se comparó la concentración y rangos de crecimiento de CTM obtenidas a partir del ala del ílion y el esternón. De ambos sitios, los primeros 5 mililitros de aspirado de médula ósea son los que contaron

con un conteo de células nucleadas significativamente más elevado que el resto de la muestra. En este estudio se demostró que la médula ósea de ambos sitios comparten una cantidad de células nucleadas similares al igual que tasas de crecimiento *in vitro*, se encontraron diferencias muy sutiles y subjetivas en cuanto a morfología y organización de las colonias celulares, sin embargo la relevancia de este hallazgo es incierta. La decisión entre el sitio de obtención de la médula ósea recae directamente sobre el clínico o investigador, siempre y cuando los caballos se encuentren en un rango de edad entre 3 y 5 años (48).

El efecto terapéutico de las técnicas de estimulación con médula ósea, se atribuye principalmente al rol de las CTM dentro de la médula ósea. En un estudio realizado en 2012, se realizaron diferentes defectos condrales y microfracturas en conejos y se midió el número de CTM obtenidas a partir de la médula ósea proveniente de dichos defectos, la cantidad de CTM varía dependiendo el método de estimulación, es decir el tamaño y profundidad de las lesiones, a mayor profundidad de la lesión sobre el hueso subcondral, mayor número de CTM drenadas (49). Dicho hallazgo resalta la importancia de crear lesiones experimentales eliminando el cartílago calcificado y dejando al descubierto el hueso subcondral e incluso complementar con microfracturas, obteniendo así la mayor liberación de CTM.

6.5.1 Aislamiento y cultivo *in vitro*

Las CTM derivadas de médula ósea en humanos pueden ser sembradas en una caja de cultivo directamente, una vez que se aislaron del tejido nativo, y frecuentemente se realiza después de haber pasado por un proceso de centrifugación con Ficoll para obtener las células mononucleares. Con el tiempo de cultivo y el cambio de medios, las células hematopoyéticas restantes son lavadas poco a poco y las CTM comienzan a ser visibles como células pequeñas, adherentes y alargadas con forma de fibroblastos.

Los cocteles de crecimiento diseñados para mantener la capacidad proliferativa y multipotencial de las CTM es muy variada, típicamente incluye cultivos suplementados con suero DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium) en la mayoría de los casos. Después de la expansión inicial, los cultivos se mantienen a una densidad de 50 - 100,000 células/cm². La capacidad de expansión depende del sitio de colección de las CTM, condiciones apropiadas de los medios de cultivo y la salud del donador así como la edad (19).

En un estudio realizado por Wilke y colaboradores, se obtuvo médula ósea del esternón de 6 caballos clínicamente sanos en un rango de edad entre 3-4 años. Una vez obtenido un volumen de 60ml de médula ósea, las células mesenquimales fueron separadas de las células rojas mediante centrifugación por gradiente de densidad con Ficoll. Posteriormente se obtuvo el pellet de células mononucleares y resuspendido en PBS para volver a centrifugar y eliminar el sobrenadante dejando así las células residuales limpias. El pellet de células fue resuspendido en suero F12 (GIBCO BRL), ácido ascórbico, ácido ketoglutarico, L-glutamina, penicilina sódica, sulfato de estreptomina y solución HEPES bufferada. Una vez resuspendidas, las células se colocaron en frascos de cultivo T75 y se incubaron a 37° c por 4 días, mismos a los que se les cambió el medio de cultivo. Este método probó ser satisfactorio para expansión y proliferación de células mesenquimales (11).

6.6 Diferenciación a condrocitos

El control de la condrogénesis en las CTM es un área compleja y en constante desarrollo. El sistema *in vitro* estándar para la condrogénesis de CTM involucra modelos tridimensionales de cultivo bajo el estímulo adecuado que lleve a dichas células a seguir un linaje condral (19).

La diferenciación condrocítica de las células troncales mesenquimales depende de crear un medio ambiente propicio para la condrogénesis. Como una alternativa

primaria para el uso de condrocitos, varios estudios se han centrado en el uso de células mesenquimales derivadas de médula ósea, la capacidad células multipotenciales capaces de diferenciarse en diversos tipos celulares, como una fuente de células condrogénicas para la reparación de cartílago y su suplementación. La diferenciación hacia un linaje condral se logra gracias al uso de agentes promotores de diferenciación y factores de crecimiento (FGF, TGF- β 1 y IGF -I). Las condiciones de los medio de cultivo también son factores primordiales para lograr la diferenciación, tales como, elevada densidad celular, contacto célula-célula, cultivo libres de suero, baja tensión de oxígeno, etc (8).

En estudios previos las CTM derivadas de médula ósea tienen potencial condrogénico. Experimentos *in vitro* han demostrado marcadores de condrogénesis tales como Agrecano y colágena II, los cuales han sido expresados en cultivos de CTM Además, experimentos *in vivo* muestran células troncales implantadas quirúrgicamente en defectos osteocondrales en conejos, que se han diferenciado a condrocitos y mejorado la calidad de la reparación de cartílago articular.

Una variedad de factores de crecimiento, incluyendo FGF (fibroblast growth factor), TGF- β 1(Transforming growth factor), y IGF-I (insulin-like growth factor), han sido evaluados por su habilidad para promover condrogénesis de CTM. Se ha demostrado que TGF- β 1 estimula la expresión de colágena tipo II y proteoglicanos, e *in vitro* las CTM responden a este factor de una manera dosis dependiente con una concentración que va de 0.1-5 ng/ml resultando en un diferenciación condrogénica efectiva (21).

En un estudio se evaluó la condrogénesis de CTM cultivadas sobre una monocapa y expuesta a TGF- β 1, y posteriormente a cultivos tridimensionales con IGF-I. Trece días después, los cultivos se analizaron mediante tinción e inmunohistoquímica, evidenciando presencia de colágena tipo 2, proteoglicanos y un apropiado crecimiento y expansión celular. En conclusión las CTM que son sometidas a pre-

tratamientos con TGF- β 1 y posteriormente a IGF-I aumentan considerablemente los marcadores de función condrocítica incluyendo producción de proteoglicanos (56).

En otro estudio se utilizaron CTM derivadas de médula ósea y se encapsularon en un hidrogel a base de colágena, posteriormente se colocaron en cámaras de difusión e implantadas en el dorso de conejos subcutáneamente. Ocho semanas después se cosecharon los especímenes para su análisis y los resultados demostraron que células con características de condrocitos se encontraban distribuidas equitativamente y se encontró evidencia de síntesis de matriz extracelular, indicando diferenciación condrocítica. Por esta razón se sugiere que el uso de hidrogeles de colágena provee un medio ambiente adecuado para señalización de condrogénesis (5).

6.7 Lesiones en cartílago articular y su reparación natural

El cartílago articular raramente desarrolla una superficie hialina funcional posterior a una lesión. Las lesiones condrales más profundas que sobrepasan el límite entre cartílago y hueso subcondral y consecuentemente dañan este último, tienden a tener una mejor reparación; esto se debe principalmente al hecho de que hay liberación de células mesenquimales indiferenciadas del hueso subcondral que se encuentra más profundo. Hurting y colaboradores determinaron que lesiones con una superficie articular mayor a 15mm tienden a reparar razonablemente bien a los 5 meses pero muestran degeneración a largo plazo(15).

Otro factor determinante en la reparación de estas lesiones y la formación de nuevas superficies articulares es el tamaño de las mismas y su localización en zonas de no-carga y de carga respectivamente, así como la edad de los pacientes. El tejido de reparación generalmente contiene una menor cantidad de proteoglicanos y de colágena II que el cartílago normal y también es biomecánicamente inferior (15).

Existen una gran cantidad de condiciones que pueden ocasionar claudicación a partir de patologías en la babilla. Las más comúnmente encontradas son: Osteocondrosis y lesiones quísticas, fijación de la patela, lesiones meniscales, desmitis de los ligamentos colaterales y patelares, lesiones de ligamentos cruzados, lesiones de cartílago articular y osteoartritis (29).

6.7.1 Osteoartritis (OA)

Es una de las económicamente más importantes enfermedades a las que se enfrentan los médicos veterinarios de equinos. La pérdida de la función asociada a daño en las articulaciones es uno de los principales problemas en la industria equina, el 60% de las claudicaciones se relaciona con problemas de osteoartritis (3).

Los mecanismos que regulan la patogénesis y progresión de la osteoartritis aun se encuentra en estudio, es importante destacar que algunas características de esta enfermedad articular se asemejan a los procesos de diferenciación condrocítica que ocurren durante el desarrollo del sistema esquelético mediante osificación endocondral. En el cartílago sano, los condrocitos se resisten naturalmente a la proliferación progresiva y comienzan a hipertrofiarse, de la misma forma un proceso de vascularización y calcificación focal toman lugar (68).

En casos de osteoartritis la estructura normal y la función del cartílago articular se ven afectados, llevando a anomalías bioquímicas, estructurales y biomecánicas en todos los tejidos que componen la articulación, como son el cartílago mismo, hueso subcondral, membranas sinoviales, etc. Es considerada la causa principal de problemas de claudicación en el equino (1).

La inflamación leve o moderada de origen desconocido de las articulaciones que componen la babilla es bastante común, la sinovitis y capsulitis se puede

ocasionar por arrancamientos o sobreestiramientos de la capsula articular. Debido al potencial de las condiciones de la babilla a convertirse en problemas crónicos y evolucionar en osteoartritis, se debe hacer un esfuerzo para determinar el origen del proceso inflamatorio. La anestesia intraarticular puede llegar a confirmar que el origen de la claudicación proviene de la articulación y las radiografías demostrando cambios significativos pueden confirmar la presencia de osteoartritis. El pronóstico para dicha articulación no es bueno a largo plazo y el tratamiento asintomático puede considerarse como la mejor opción de tratamiento, sin embargo nuevas técnicas de artroscopía y medicina regenerativa pueden llegar a ofrecer mejores alternativas para estas articulaciones severamente afectadas (29).

Estudios más recientes realizados en la universidad de Colorado, indican que el uso de biomarcadores protéicos específicos, los cuales son liberados como pequeños fragmentos protéicos, CPII (carboxypeptido) durante la síntesis de colágena II articular y que a su vez pueden ser detectados mediante el uso de anticuerpos específicos, podrían ser la guía para intentar simular el proceso de síntesis de colágena. También existen biomarcadores inespecíficos tales como la IL-1, que son moléculas clave en la cascada de degeneración y daño articular pero que no son componentes estructurales del cartílago en si, como lo son la colágena II y el agregano. Así como los biomarcadores protéicos, también existen los biomarcadores moleculares, refiriéndose a las porciones de RNA y DNA encontrados y medidos en los condrocitos cuando los eventos de destrucción o síntesis de los tejidos están ocurriendo. Este proceso puede ser llevado a cabo más rápido que el de la detección de biomarcadores protéicos y provee una capacidad muy elevada de análisis, sin embargo aun se están realizando estudios para determinar qué genes están relacionados a cada proceso y como el uso de chips en dichos genes llegaran a definir de manera más precisa los procesos patofisiológicos de la enfermedad articular (3).

Se tiene bastante claro que los 2 principales mediadores que se encuentran en la punta de la cascada de la patofisiología del daño articular son la IL-1 y el factor de

necrosis tumoral (TNF), de igual manera o más importante esta la identificación de los antagonistas naturales o sintéticos con la capacidad para bloquear dichos mediadores de degeneración. El uso de estos productos comerciales basados en proteínas como, IRAP (Interleukin-1 Receptor Antagonist Protein), IRAP II y más recientemente ACP (Autologus condition plasma), el cual combina el uso de proteínas antagonistas con promotores de factores de crecimiento, ha probado ser una alternativa positiva para caballos con problemas de degeneración articular, entre otros (3).

6.7.2 Opciones terapéuticas contra osteoartritis

El tratamiento de la osteoartritis (OA), ya sea por terapias celulares o mediante otro método más convencional, es mucho más complicado que la reparación de lesiones focales en cartílago. En articulaciones afectadas por OA, los cambios o lesiones encontradas en el cartílago usualmente son difusas e involucran ambas superficies articulares y otros tejidos articulares adyacentes (membrana sinovial, capsula sinovial, ligamentos, meniscos y hueso subcondral) también se ven afectados (4).

Se ha demostrado que el uso de glicosaminoglicanos polisulfatados (PSGAG) y hialuronato de sodio sistémico ha sido efectivo para reducir la inflamación de las articulaciones y puede beneficiar las articulaciones en casos de sinovitis aguda. Considerando que la babilla es una articulación de alto grado de movimiento, la metilprednisolona no debe ser considerada como el corticosteroide de elección y el uso de triamcinolona y betametasona pueden contribuir de manera positiva a conservar la salud de la articulación. Otra alternativa al uso combinado de corticoesteroides y ácido hialurónico, es el ACP (Autologus Conditioned Plasma), este procesado comercial emplea el rol de la proteína receptora antagonista de la interleucina-I (IL-1) (IRAP) y otra citoquinas producidas por las células blancas para mitigar la inflamación en los estadios tempranos y a su vez es posible que

provea factores de crecimiento que contribuyen a un apropiado proceso de reparación (29).

Las terapias regenerativas están basadas en biológicos que capturan la habilidad natural del cuerpo para sanar o reparar las lesiones. Algunos de los métodos más comúnmente utilizado con resultados satisfactorios son, Plasma Rico en Plaquetas (PRP), ACP + IRAP y Concentrado de Médula Ósea (BMC) (50).

Cuando se habla del proceso patológico de la osteoartritis es importante tomar en cuenta la relevancia de la interfaz y sinergia entre el hueso y el cartílago. Una elevada vascularización y formación de microfisuras asociadas a remodelación ósea durante el proceso de osteoartritis, facilita el transporte molecular del cartílago al hueso y viceversa (54).

Elmorsy y colaboradores analizaron el efecto lubricante y condroprotector del ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular en articulaciones femoropatelares de conejos. Se analizaron los cambios histopatológicos y los coeficientes de fricción en rodillas con osteoartritis. Se crearon 3 grupos, al primero se les corto el ligamento cruzado anterior de la rodilla derecha y se les aplicó HA de altos o bajo peso molecular por 3 semanas, al segundo grupo se les corto el ligamento cruzado anterior de la rodilla izquierda y se les aplicó solución salina por 3 semanas y por último al tercer grupo de 5 rodillas se les realizó una cirugía menor para descartar presencia de OA. Los hallazgos macroscópicos indicaron que hubo un daño severo en el 30% del grupo con solución salina, del 20% en el grupo tratado con ácido hialurónico y cartílago 100% intacto en el grupo que no presentaba OA. De esto fue posible concluir que el ácido hialurónico provee efecto condroprotector y produce coeficientes de fricción superiores, de esta manera retrasando la progresión de la OA de manera efectiva y mejorando la lubricación de las articulaciones (55).

McIlwraith y colaboradores realizaron un estudio en el cual inyectaron CTM derivadas de medula ósea para aumentar el proceso de curación de lesiones osteocondrales con microfractura y lo compararon con lesiones tratadas solo con microfractura. En dicho estudio se evaluó el tejido de reparación de ambos grupos a los 12 meses de aplicado el tratamiento. No existió una diferencia clínica ni histológica significativa entre los dos grupos, sin embargo en el grupo en el que fueron administradas las CTM, se evidencio una notable mejoría en la firmeza del tejido de reparación y se identificó inmunohistoquímicamente, niveles superiores de agregano que en las lesiones tratadas solo con microfractura. El uso de células mesenquimales aplicadas intraarticularmente mejora la firmeza y calidad del tejido de reparación (57).

6.8 Creación de lesiones experimentales

Se realiza la inducción IV a la anestesia, se coloca al caballo sobre la mesa quirúrgica en decúbito dorsal y se conecta a la máquina de anestesia inhalada, se rasura con navaja del #40 y se embroca ampliamente la región de la babilla y se colocan los campos quirúrgicos de manera estéril. Se debe considerar el grosor del cartílago articular en el equino que va de 2.5 a 3 mm. En especímenes comúnmente se realiza una incisión para artrotomía de 10-12 cm centrada entre los ligamentos patelares atravesando las tres capas histológicas visibles que son la piel, fascia y capsula articular hasta que el "fat pad" o capa de grasa y la tróclea sea visible (6).

En estudios in vivo se realiza un abordaje por medio de artroscopía, se realizan incisiones de 1 cm a través de la piel y fascia superficial y profunda con una navaja de bisturí del #15 y posteriormente se utiliza una navaja de bisturí del #11 para incidir la capsula articular. Los limites anatómicos para los portales dependen de las estructuras articulares que se quieran evidenciar o en este caso de la tróclea lateral en la que se realizó la lesión experimental, las incisiones se realizan entre los ligamentos patelares medio y lateral y aproximadamente medio cm lateral

al ligamento patelar lateral. De esta manera la tróclea lateral y el surco intertroclear se pueden examinar apropiadamente (8).

Para crear el defecto en la tróclea lateral se utiliza un instrumento Kinsey-Nash para la creación de defecto condrales y un set de curetas y cucharillas para afinar detalles y bordes del defecto así como eliminar el cartílago calcificado restante llegando al hueso subcondral. El instrumento Kinsey-Nash permite la precisa elaboración de un defecto de 10 mm de diámetro por 2-5 mm de profundidad, esto se logra martillando hasta que se logre la profundidad deseada, se retira el obturador, se inserta la broca y se usa el taladro para crear el defecto. Una vez creado el defecto con el uso de curetas se elimina el cartílago calcificado restante hasta llegar a hueso subcondral y se definen los bordes de la lesión (7).

En lesiones de 15 mm de diámetro creadas experimentalmente en la articulación femoropatelar de 6 caballos jóvenes, se inyectó una solución autóloga de fibrina que se polimeriza al contacto y conteniendo CTM y la fibrina sin células en los grupos control. Los sitios de lesión fueron biopsias a los 30 días y a los 8 meses, realizando pruebas de inmunohistoquímica para colágena 1 y 2, y análisis de matriz extracelular. Los resultados a largo plazo no mostraron evidencia significativa entre las lesiones tratadas con fibrina + CTM y los grupos control (11).

En un estudio se comparó la capacidad de auto-reparación de lesiones osteocondrales en 2 sitios de apoyo diferentes de la babilla de ovinos. Se realizaron lesiones osteocondrales simultáneamente en el cóndilo medial y la tróclea lateral, a los 6 meses se evaluó macroscópica, histológica, inmunohistoquímica y bioquímicamente los sitios de reparación. Macroscópica e histológicamente, la reparación articular y la inmunoreactividad de colágena II fue mejor en la tróclea femoral. Las lesiones en cóndilo presentaban una mayor cantidad de DNA y proteoglicanos, reflejando así diferencias topográficas y fisiológicas. El sitio donde ocurren las lesiones es determinante para el pronóstico

clínico de los pacientes y para lograr un proceso de regeneración adecuado de manera experimental (16).

6.9 Modelos de reconstrucción de superficie articular

La biología de las células mesenquimales es lo que las hace relevantes para su uso en ingeniería de tejidos en el sistema musculoesquelético. Una fuente celular para uso en ingeniería de tejidos debe contar con las siguientes características: fácil acceso, un gran disponibilidad de células, extensa capacidad de auto renovación o expansión para generar suficiente cantidad, la capacidad de una rápida diferenciación en diferentes linajes celulares bajo protocolos apropiados de inducción, habilidad para modular el ambiente nativo para promover la integración y la reparación tisular adecuada y una mínima actividad inmunogénica o neoplásica/tumoral (19).

En un estudio publicado en abril del 2007, en donde se obtuvo médula ósea y se proceso para separar y expandir CTM, se operaron 6 babillas de 6 caballos respectivamente y se realizó una lesión de 15 mm de diámetro sobre la tróclea lateral sin superar 1 mm de hueso subcondral. Posteriormente se utilizó una mezcla de fibrinógeno con CTM el cual fue polimerizado in situ con trombina activada por calcio. Una lesión con las mismas características fue realizada en el miembro opuesto y se le agrego el fibrinógeno con trombina pero sin CTM. Un mes posterior a la cirugía se realizó otra artroscopía en la cual se examinaron las lesiones y se clasificaron y se tomo una biopsia de 1.5 x 3 mm de grosor con una navaja de bisturí del #11 y se realizaron análisis histológicos. 8 meses posterior a la cirugía inicial se eutanasiaron los caballos y se hizo un análisis macroscópico y se tomaron muestras para histología, histoquímica, inmunohistoquímica e hibridación in situ. En el estudio se concluyo que los defectos articulares tuvieron una mejoría considerable en etapa inicial, sin embargo en el seguimiento a los 8 meses, las diferencias morfológicas y bioquímicas entre ambos tratamientos fueron sutiles (11).

Un estudio preliminar en el 2014 comparo la respuesta de lesiones articulares degenerativas a 4 distintos tratamientos, Plasma Rico en Plaquetas (PRP), Células Mesenquimales (CTM), CTM +PRP y CTM + PRP inducidos condrogenicamente; todos los tratamientos fueron aplicados mediante inyección articular. Los dos protocolos en los que se combino PRP + CTM ya fuera con inducción condrogénica o no, mejoraron significativamente la evolución clínica inmediata y tardía en comparación a la aplicación de PRP solo, en el caso de la aplicación de CTM solas, la mejoría también fue considerable, aunque es prudente mencionar que ninguno de los caballos se encontraba en un estadio tardío de osteoartritis lo cual puede modificar significativamente el pronóstico de cada paciente (47).

El BioCartílagoTM es un producto que contiene cartílago alogénico deshidratado y micronizado, y es implantado junto con plasma rico en plaquetas (PRP) sobre un defecto condral con microfractura. Dicho producto contiene las propiedades bioquímicas necesarias para estimular la producción de colágena tipo 2 y elementos de la matriz extracelular. El uso de dicho producto puede favorecer la creación de un tejido más hialino en los sitios de lesión si se usa en conjunto con microfracturas (53).

Filardo y colaboradores evaluaron la estabilidad e integridad de polímeros osteocondrales de colágena-hidroxiapatita en la rodilla de un cadáver de humano y la sometieron a un movimiento pasivo y constante con y sin carga y agregando fibrina como pegamento para los implantes. Se realizaron un total de 48 pruebas dividiendo en grupos de 24 controles de implantes sin fibrina y 24 con pegamento de fibrina. Dicho estudio demostró la importancia y relevancia del uso de fibrina como método de fijación de implantes y polímeros ya que mejora considerablemente la estabilidad e integridad de los mismos en las articulaciones durante el proceso de reparación (58).

En otro estudio realizado por Masri y colaboradores se evaluó la eficiencia en la obtención de un gran número de células contenidas en un andamio o polímero, sin desprendimiento de dichas células debido al flujo de fluido durante la implantación artroscópica. Se utilizó un polímero de ácido poliglicólico/poliláctico impregnado con condrocitos autólogos, mismo que fue implantado sobre lesiones condrales a 6 caballos y biopsiado y analizado a las 8 semanas post implantación. A las 8 semanas posteriores al tratamiento el tejido de reparación se apreciaba muy celular con tejido de reparación con buena adherencia a hueso subcondral e integración a cartílago adyacente. El uso de polímeros como método de encapsulamiento celular o andamio, permite mantener un número suficiente de células viables a pesar de ser sometidas al flujo y presión de fluido durante el procedimiento artroscópico, además de proveer un ambiente adecuado para la proliferación de dichas células (45).

Lam y colaboradores, evaluaron la habilidad de células mesenquimales condrogénica y osteogénicamente pre-diferenciadas y encapsuladas en hidrogeles, de tener un efecto de reparación sobre lesiones osteocondrales en el cóndilo femoral de conejos. Se aleatorizaron 4 grupos en los que se utilizaron hidrogeles con CTM, CTM/Dif. Osteogénica (OS), OS /Dif, Condrogénica a los 7 días y OS/Dif. Condrogénica a los 14 días. Los defectos se reevaluaron a las 12 semanas. Todos los grupos exhibieron un tejido de reparación similar en cantidad y características. Tras un análisis del tejido de reparación de las muestras, se concluyó que la regeneración de cartílago en defectos osteocondrales puede ser estimulada por CTM pre-diferenciadas a condrocitos u osteoblastos, previo a la implantación en los hidrogeles (63).

6.10 Medicina regenerativa

La pérdida de función del tejido musculoesquelético puede terminar con la carrera y en algunos casos con la vida de un caballo. No es ninguna sorpresa el hecho de que tejidos como el cartílago, tendones y ligamentos, laminas del casco,

meniscos, piel y cornea, entre otros, se encuentren dentro de los objetivos de la medicina regenerativa (2).

Las terapias basadas en el uso de células para el tratamiento de enfermedades articulares en el caballo han sido reportadas desde hace tres décadas, motivadas por el impacto significativo que tienen las enfermedades articulares en caballos de alto rendimiento, la poca capacidad de autoreparación del cartílago articular y las actuales limitaciones médicas y quirúrgicas para tratar la artritis (4).

La ingeniería de tejidos o medicina regenerativa es un ámbito de investigación interdisciplinario con la meta de reemplazar tejidos lesionados o degenerados en humanos y regresarlos a su forma, estructura y función combinando los métodos y principios de la ingeniería, biología celular y molecular y la medicina clínica (20). El objetivo principal de la medicina regenerativa es restaurar la estructura y función de tejidos y órganos que han sufrido daño, enfermedad o degeneración. Comúnmente se utilizan células, moléculas bioactivas o materiales biocompatibles, individualmente o en combinación para guiar a la formación de tejido con células nativas del hospedador o para crear estructuras aptas para albergar células y permitir su crecimiento y proliferación en el laboratorio (2).

La médula ósea tiene una buena suplementación de células troncales y factores de crecimiento que son parte integral de la salud del cartílago y su reparación, la comunicación directa de las lesiones articulares a estos elementos encontrados debajo del hueso subcondral ha sido clave para estimular la reparación del cartílago articular (3).

La eficacia de las células troncales en el tratamiento contra OA y lesiones en cartílago articular de equinos ha sido evaluada en forma experimental y en estudios clínicos y con mejores resultados favorables en células mesenquimales derivadas de médula ósea que las obtenidas a partir de tejido adiposo (9).

6.10.1 Polímeros naturales y sintéticos

Al seleccionar un material apropiado como andamio, un microambiente debe ser creado con la finalidad de imitar la situación *in vivo* y un ambiente que promueva la condrogénesis de las células troncales mesenquimales. Los andamios proveen un microambiente tridimensional (3D) que permite a las células anclarse, permite el intercambio de gas y nutrientes y promueve la síntesis de matriz extracelular (MEC). Una gran variedad de polímeros naturales y sintéticos se han utilizado para crear andamios para el estudio de la condrogénesis como, estructuras fibrosas, esponjas porosas, mallas tejidas y no tejidas, e hidrogeles (5).

En diversos estudios, los bio-polímeros acelulares han sido tan efectivos como polímeros previamente sembrados con células, para promover regeneración de cartílago articular. Los bio-polímeros podrían ser capaces de reclutar células progenitoras apropiadas, proveyendo así los requisitos físicos y señalizaciones necesarias para estimular la óptima reparación y/o regeneración de cartílago articular (4).

Un estudio evaluó el potencial de utilizar CTM derivadas de médula ósea humana sembradas en un polímero nanofibroso biodegradable de ácido poliláctico PLLA, para generar un cartílago con dimensiones y forma similar a los implantes subcutáneos utilizados para cirugía plástica reconstructiva. Los polímeros de nanofibras fueron fabricados por un método de electrospinning hasta formar un "tapete" de 1 cm² con un grosor de 1.5 mm y esterilizados con luz UV. Posteriormente se sembraron las CTM diferenciadas con TGF-β1 solo o en combinación con IGF-I. Los polímeros exhibieron histológicamente un cartílago hialino con grosor y forma deseados al igual que una integración al tejido favorable, lo que sugiere la presencia de tejido con características elásticas. Más análisis fueron realizados para evaluar las características morfológicas y estructurales del tejido. En dicho estudio se concluyó que el desarrollo satisfactorio de "constructos" cartilaginosos con definición geométrica, sugiere el potencial

favorable del uso de polímeros sintéticos con CTM para su uso en medicina reconstructiva (62).

Anteriormente e un estudio realizado por Lam y colaboradores, se evaluó la habilidad de células mesenquimales condrogénica y osteogénicamente pre-diferenciadas y encapsuladas en los hidrogeles, y observaron el efecto de reparación sobre lesiones osteocondrales en el cóndilo femoral de conejos. La creación y el uso de hidrogeles probó ser satisfactorio como medio de implantación de CTM diferenciadas en lesiones articulares (63).

En un estudio realizado por Jiashen Li y colaboradores se creó un polímero de PLLA para su uso en medicina regenerativa de cartílago. Se utilizó hidroxiapatita y colágena como medios microporosos para transferir materiales bioactivos dentro de los polímeros. Tras varios análisis realizados, en este estudio se concluyó que el uso de hidroxiapatita y colágena en conjunto con el polímero de PLLA, mejora las interacciones entre las células osteolásticas y los polímeros (64).

Masri y colaboradores utilizaron con éxito un polímero de ácido poliglicólico PGA/poliláctico PLLA en el cual se sembraron condrocitos autólogos y se confirmó mediante fluorescencia de calceína y microscopía electrónica, la viabilidad y anclaje de las células. En este estudio el tejido de reparación fue evaluado posterior a 8 semanas de implantado, y mostró un tejido con alto contenido celular y con buena unión a hueso subcondral y cartílago adyacente (45).

6.11 Evaluación del cartílago articular y tejido de reparación

La eficacia de las células mesenquimales derivadas de médula ósea (CMs-MO) y el concentrado de médula ósea (CMO), ha sido evaluada como tratamiento en lesiones condrales experimentalmente creadas en la tróclea lateral del fémur en caballos (11).

Es deseable contar con un sistema de calificación concreto y confiable para la evaluación de la reparación de cartílago articular. Existen diferentes métodos de evaluación, ya sea estructurales o clínicos, biopsias o evaluación de superficie, etc. La evaluación estructural de la reparación del cartílago articular se puede realizar mediante resonancia magnética, histología y evaluación macroscópica mediante artroscopía. Existen diversos métodos de evaluación histológica disponibles, entre ellos el comprensivo de O'Driscoll y la escala de evaluación histológica visual ICRS (International Cartilage Repair Society), estos dos sistemas de calificación fueron específicamente diseñados para la evaluación macroscópica de reparación de cartílago como un método para simplificar y enfocar el sistema de calificación en base a necesidades clínicas (14).

Gratz y colaboradores desarrollaron un método biomecánico cuantitativo de análisis de la fuerza tensil del tejido de reparación, su integración *in vivo* y el efecto de la implantación de condrocitos con IGF-I sobre las propiedades mecánicas. El tejido de reparación relleno satisfactoriamente las lesiones, la interfase entre el cartílago nativo y el tejido de reparación era visible macroscópicamente, sin embargo el grosor era relativamente uniforme sobre toda el área de las lesiones. Las pruebas mecánicas realizadas al tejido de reparación indicaron que el tejido de reparación era más suave y se deformaba con mayor facilidad que el tejido nativo, la fuerza tensil era 50% menor a la del cartílago normal. Este tipo de pruebas son recomendable al utilizar diferentes métodos de reparación y/o polímeros biodegradables para determinar la mejor opción para un proceso de regeneración o reparación de lesiones articulares (52).

6.12 Técnicas histológicas e inmunohistoquímicas para cuantificar matriz extracelular

Los métodos histológicos e histoquímicos son herramientas importantes en la evaluación de tejidos articulares para evaluar enfermedades degenerativas, tanto humanos como en animales. Schmitz y colaboradores describieron los métodos

de 5 tinciones básicas apropiadas para la evaluación macroscópica e histológica, visualización de proteoglicanos y contenido de colágena. Las tinciones recomendadas fueron Hematoxilina y eosina, azul de toluidina, safranina-o y Rojo Pricosirius (Herovici) (34).

Un estudio en conejos en el que se uso un hidrogel de colágena y una cámara de difusión de condrocitos para reconstruir cartílago, se demostró que a las 8 semanas de la implantación era suficiente para que se llevara a cabo la degradación de los materiales usados para el andamio y el tejido de reparación apareciera.

Los conejos fueron eutanasiados a las 8 semanas y las muestras de tejido fueron fijadas inmediatamente después en PBS formalina al 10% y deshidratadas en etanol en varios pases, sumergidas en parafina y finalmente seccionadas en 5 μ m de espesor. Las tinciones utilizadas fueron hematoxilina-eosina, safranina-o y azul toluidina (5).

6.12.1 Tinciones

Safranina-O

La safranina o es un colorante catiónico que tiñe proteoglicanos al igual que glicosaminoglicanos. A pesar de que esta tinción tiñe proteoglicanos, se ha reportado con anterioridad que no es un indicativo sensible de la cantidad de proteoglicanos en el cartílago, en el cual los glicosaminoglicanos se han visto disminuidos por algún proceso patológico (34).

La intensidad de la Safranina O es directamente proporcional al contenido de proteoglicanos en el cartílago normal. Esta tinción se ha utilizado para demostrar cualquier cambio que ocurre como consecuencia de enfermedad articular. En diferentes estadios de la enfermedad, la degradación del cartílago es acompañada por cambios en la distribución de glicosaminoglicanos en el tejido. Bajo estas

circunstancias, tinciones como la safranina O y el azul de toluidina se han utilizado para evidenciar la cantidad de proteoglicanos presentes en tejido dañado (36).

La tinción resultante es relativa e idealmente debe ser comparada con un control normal ya que la intensidad con la que se tiñe el cartílago articular puede variar de individuo a individuo. Con técnicas de fijación rutinarias un 15 a 20% de proteoglicanos se pierden en el proceso. Un protocolo apropiado de fijación química debe ser empleado cuando se utiliza un colorante catiónico para preservar los proteoglicanos incluso al momento de utilizar un descalcificador (34).

Herovici

En 1963, Herovici describió una variante de una tinción policrómica que contenía 3 componentes que selectivamente tiñen el núcleo, citoplasma y tejido conectivo, este último se teñía tanto de rojo como de azul. Más tarde Levame y Meyer (1968) confirmaron mediante inmunohistoquímica que el color azul proveniente de dichas tinciones, correspondía a fibras de colágena tipo 3 y las fibras rojas correspondían a colágena tipo 1 (67,68).

Al ser una tinción Tricrómica es posible evaluar el tipo y cantidad de material extracelular. La colágena tipo 1 o madura, una de las proteínas más abundantes en la matriz extracelular, se tiñe de color rojo por la fuscina ácida y da como resultado una combinación del azul de metilo, ácido pícrico y fuscina ácida que proporcionan el color de acuerdo con la densidad de la colágena presente. En una proporción adecuada, tiñe de rojo al colágena 1 o maduro y denso y de azul al colágena 3 o recién formado (41,66).

Azul de Toluidina

La tinción azul de toluidina así como la Safranina-O son catiónicos y tiñen proteoglicanos así como glicosaminoglicanos. Se ha reportado que el azul de

toluidina provee una intensidad de tñido mayor, debido a su afinidad por el azufre contenido en el cartílago (34).

6.12.2 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica (IHQ) consiste en la aplicación de anticuerpos monoclonales y policlonales para determinar la distribución del tejido mediante la detección de un antígeno específico de interés en problemas de salud o enfermedad.

La IHQ requiere de la disponibilidad de biopsias las cuales son procesadas y cortadas con un micrótopo, colocadas en laminillas y posteriormente se les aplica el anticuerpo apropiado. El sitio de unión del anticuerpo será visualizado en el sitio del tejido donde se localice, si es que se encuentra presente o si el anticuerpo utilizado es el adecuado (40).

Debido a que la IHQ involucra reacciones antígeno-anticuerpo específicas, tiene una ventaja aparente sobre técnicas de tinción enzimática que identifican un limitado número de proteínas, enzimas y estructuras histológicas. Por consiguiente la IHQ se ha convertido en una técnica crucial y es ampliamente utilizada en un gran número de laboratorios de investigación médica así como en diagnóstico clínico (40).

Recientemente se han desarrollado técnicas inmunohistoquímicas usando anticuerpos monoclonales, lo cual ha hecho posible obtener estimados más precisos de la distribución de un gran número de componentes de los tejidos en especímenes histológicos (34).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en las instalaciones del Departamento de Medicina y cirugía en Equinos (DMCZE) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el laboratorio de la unidad de ingeniería de tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) en la ciudad de México.

Se utilizaron 8 caballos criollos de 3 a 5 años de edad, los cuales se encontraban clínicamente sanos y con un peso entre 250 y 350 kg de peso. Inicialmente se recibieron en las instalaciones del DMCZE y se les realizó un examen físico completo así como un hematocrito y proteínas para evaluar estado de salud, todos los caballos se encontraban clínicamente sanos y con las constantes fisiológicas en rangos normales.

Obtención de médula ósea:

Material:

- ▶ Aguja Rosenthal
- ▶ Xilacina y butorfanol
- ▶ Heparina (1000 IU/ml)
- ▶ 1 Jeringa de 20 ml
- ▶ 1 Jeringa de 5 ml
- ▶ 1 jeringa de 1 ml
- ▶ Lidocaína
- ▶ Navaja de bisturí del #15

- ▶ Gasas estériles
- ▶ Guantes estériles
- ▶ Material para embrocar
- ▶ Rasuradora

Métodos:

1. Se sedó a los caballo utilizando xilacina y butorfanol
2. Palpación del esternón y se rasura el área
3. Bloqueo subcutáneo con 1ml de lidocaína
4. Embrocado del área con yodo espuma y alcohol
5. Incisión en una sola intención de .5 cm aproximadamente atravesando piel y subcutáneo
6. Se preparo la jeringa de 20ml con heparina en una concentración de
7. Se introduce la Aguja rosenthal atravesando el esternón hasta llegar a la médula
8. Se jala el embolo de la jeringa hasta obtener el máximo de médula ósea posible
9. La muestra se mantuvo en refrigeración para su transporte.

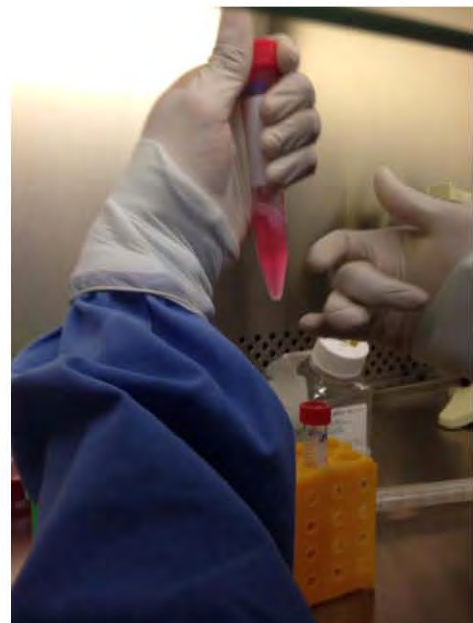
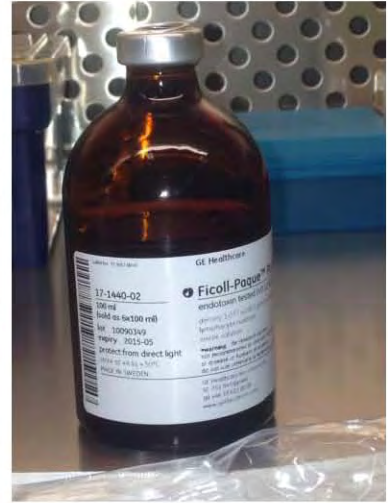
PROCESAMIENTO DE MÉDULA ÓSEA Y AISLAMIENTO DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES

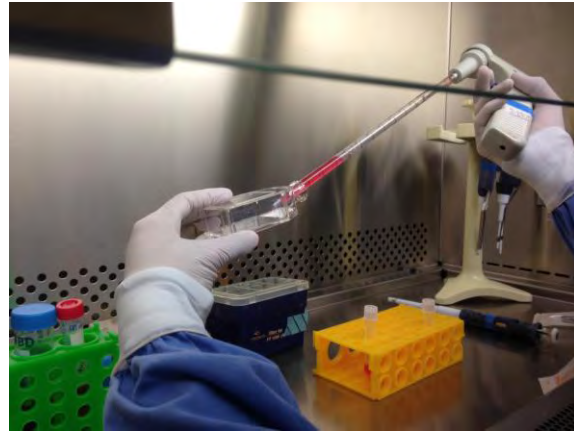
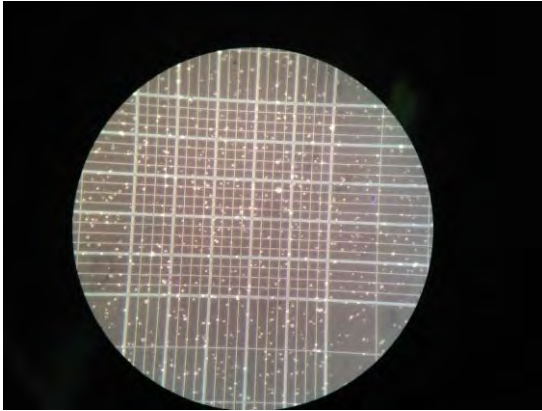
1. Se colectó alrededor de 120ml de médula ósea mediante la técnica antes mencionada.
2. Balancear suavemente las jeringas de muestra obtenidas para mezclar la muestra.
3. Combinar todas las muestras de médula ósea en un frasco estéril con tapa con cuidado de no derramar muestra.
4. Diluir la muestra en proporción 2.1 en PBS estéril.
5. Homogeneizar el frasco de Ficoll-Paque antes de utilizarlo.
6. Agregar 25 ml de Ficoll en tubos cónicos de 50ml.
7. Con una pipeta agregar lentamente 25 ml de médula ósea a cada uno de los tubos con Ficoll, teniendo cuidado de no romper la tensión superficial y se aprecie la separación entre al Ficoll y la médula.
8. Centrifugar por 30 minutos a 400xG configurando para desaceleración lenta.
9. Con una pipeta pasteur estéril, retirar cuidadosamente la capa blanca de células mononucleares entre el plasma y el pellet de eritrocitos, combinar en un tubo cónico de 5 ml nuevo.
10. Resuspender las células mononucleares en PBS en proporción 2:1 para lavar.
11. Centrifugar a 500xG por 5 minutos con mínima desaceleración.
12. Aspirar PBS y repetir el lavado de ser necesario.
13. Aspirar PBS sin tocar el pellet de células.

14. Re suspender en medio de cultivo para CTM en frascos T75 (se recomienda contar el número de células para determinar la cantidad de frascos a utilizar).
15. Incubar los frascos por 72 horas a 37°C antes de cambiar el medio de cultivo.
16. Cambiar el medio de cultivo cada 3 días y comprobar expansión celular.

IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES CTM

El aspirado fue llevado al laboratorio de la unidad de ingeniería de tejidos y medicina regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación en condiciones de refrigeración. En el laboratorio las muestras fueron procesadas en una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA), primero se hizo una dilución de la muestra de médula ósea con solución salina fosfatada buferada (PBS) [Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA] posteriormente se colocaron en Ficoll Paque™ (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) y se centrifugaron a 1500 RPM por 30 minutos, se separaron y se lavaron las células con PBS. Una porción de la muestra se resuspendió en medio de cultivo DMEM F12 (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA) con 10% de Suero Bovino Fetal y 1% de antibióticos y antimicóticos y fueron sembrados en cajas de cultivo T75 (Falcon, Becton Dickinson) por un lapso de 15 días a 37°C, 5% de CO₂, el medio de cultivo se cambio cada dos días.





Análisis por Citometría de Flujo:

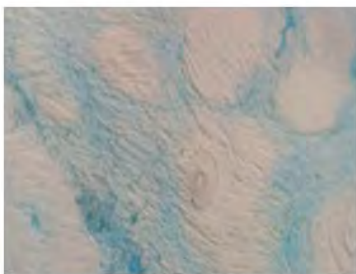
Una vez separadas las células del Ficoll y lavadas con PBS una porción de aproximadamente 250 000 células de médula ósea fueron colocadas en tubos de poliestireno (Falcon, Becton Dickinson) con 10 μ l de la suspensión de anticuerpos y se dejaron incubando 30 minutos a 4°C, se utilizaron anticuerpos monoclonales anti CD34, CD45, CD90, CD105, CD73, CD14 (BD, Pharmigen TM), anticuerpos contra caballo. Los datos fueron analizados por el software Cell Quest PRO TM (Becton Dickinson) con una media de 75 000 eventos.

PROLIFERACION CELULAR:

Para determinar que las células tienen la capacidad de proliferar se realizaron conteos celulares con azul tripano el cual es un compuesto hidrofílico que se utiliza para medir la viabilidad celular ya que por sus capacidades fisicoquímicas, penetra en las células muertas dando una tonalidad de morado distinta al blanco que reflejan las células vivas por no dejar entrar el colorante. Este conteo se realizó al momento del muestreo y en cada uno de los pases (resembrado de las células) así como al momento del sembrado en los polímeros.

DIFERENCIACIÓN A DIFERENTES LINAJES

Una vez que se realizó la expansión in vitro de las células mesenquimales se realizaron pruebas de diferenciación a linaje condral, óseo y adiposo. Con la finalidad de corroborar el potencial de las CTM y se realizaron tinciones en los 3 cultivos para verificar.



Alcian Blue 10x



Von Kossa 10x



Nile Red 10x

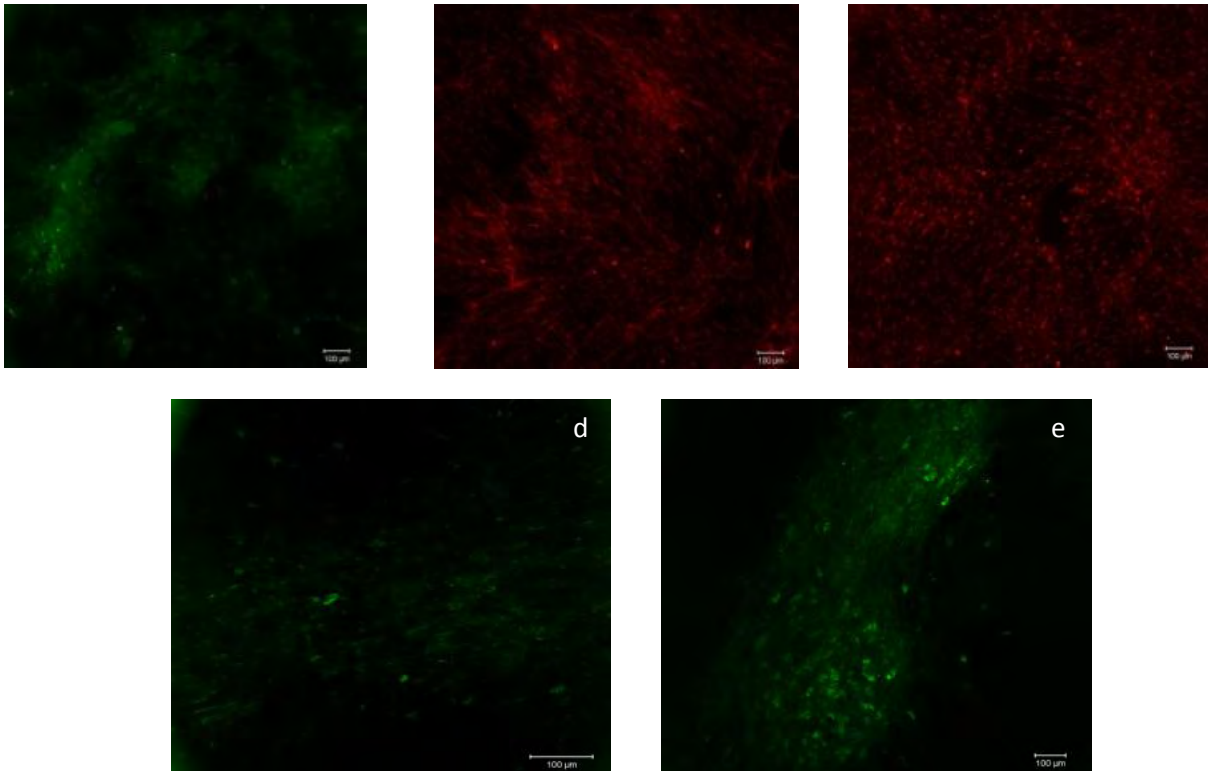
Azul alciano para cartílago, Von Kossa para tejido óseo y Rojo Nilo para tejido adiposo.

INDUCCIÓN CONDRAL

Para generar un estímulo condral se adiciono al medio de cultivo sustancias relacionadas con el proceso de condrogénesis tales como TGF- β (100ng/ml) y

BMP-2 (100ng/ml) además de insulina y ácido ascórbico se probó a tres diferentes tiempo a los 7, 14 y 21 días.

Posteriormente se realizaron pruebas de inmunohistoquímica para corroborar la presencia de marcadores condrales y óseos en los cultivos de monocapa.



En esta figura se muestra el resultado de la inmunofluorescencia llevado a cabo con los cultivos en monocapa(a) Sox 9, (b) colágena II, (c) agregano, (d) osteocalcina, (e) Runx2.

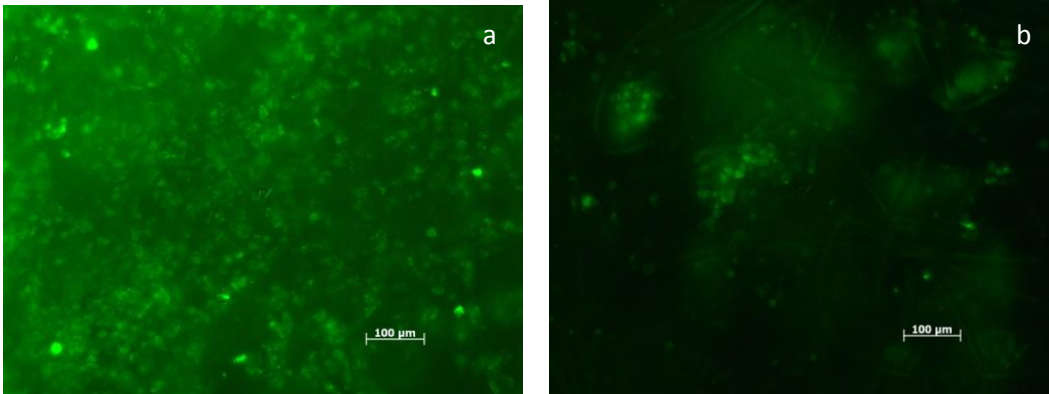
POLÍMEROS

Se usaron 2 diferentes polímeros

1. Colágena tipo I y colágena tipo III.
2. PGA

SIEMBRA EN LOS POLÍMEROS

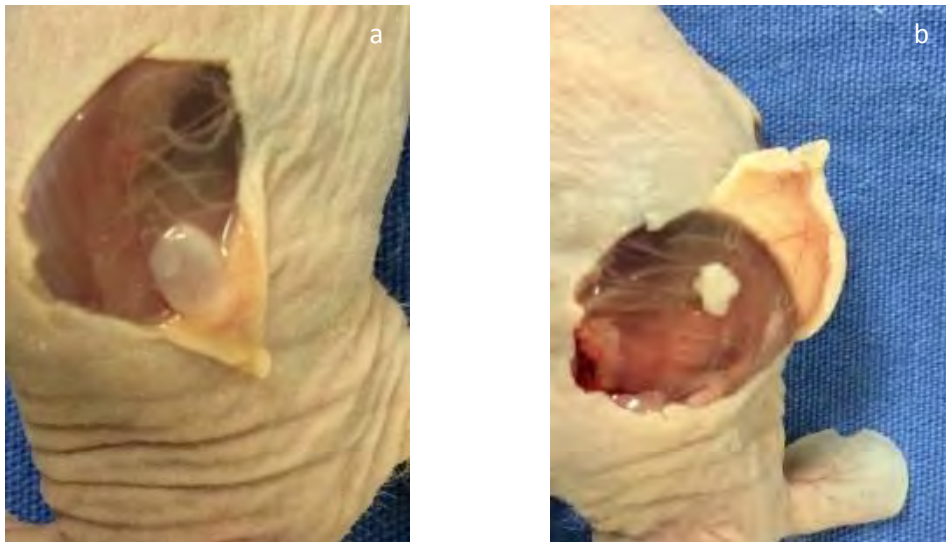
Una vez determinada el mejor momento de diferenciación las células fueron tripsinizadas y sembradas en una proporción de 5×10^4 por cm^2



Cultivo sobre los andamios a utilizar Para generar las construcciones cartilaginosas.

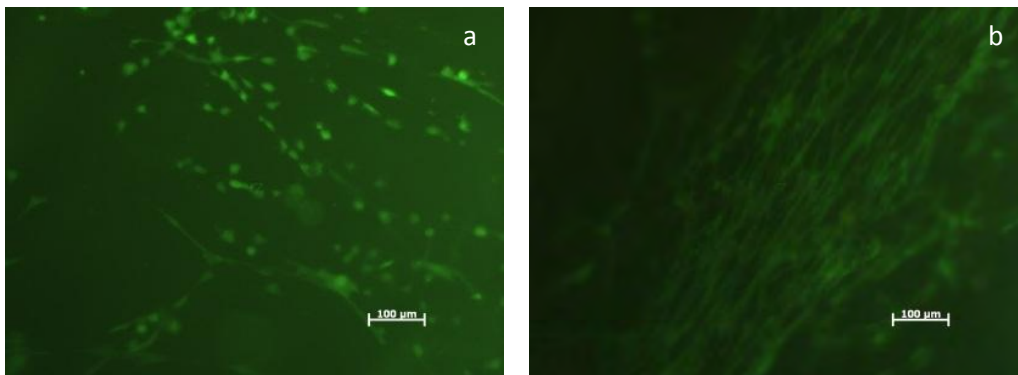
- (a) Andamio 1 Copolímero de colágena I y III (Col.)
- (b) Andamio 2 Polímero de ácido poliglicólico (PGA)

A su vez se realizaron cultivos in vivo en ratones atímicos para verificar la viabilidad de las células:



- Implante en tejido subcutáneo de ratones atímicos
- (a) Andamio 1 Copolímero de colágena I y III (Col.)
 - (b) Andamio 2 Polímero de ácido poliglicólico (PGA)

Se realizó inmunofluorescencia de ambos polímeros:



Se aprecia la fluorescencia de las células en andamio 1 y andamio 2 respectivamente bajo la luz ultravioleta, posterior al implante en ratones atímicos (a) andamio 1 se observa la morfología de las células redonda y organizada en capas sugerente a la morfología del cartílago hialino (b) andamio 2 se observa la morfología de las células un tanto alargada y sin organización.

PRUEBAS DE VIABILIDAD CELULAR

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

PROTOCOLO DE PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Primera Artroscopía:

La artroscopía de la babilla, la cual se compone de la articulación femoropatelar y la articulación femorotibial la cual se divide en lateral y medial es una técnica bien estudiada y que se realiza con mayor frecuencia para tratar osteocondrosis en esta región. También es una herramienta útil para el diagnóstico de diferentes patologías y para determinar el pronóstico posterior a un traumatismo que pudo haber dañado los ligamentos cruzados, meniscos y sus ligamentos y/o al cartílago articular.

El sitio de interés para este estudio es la articulación femoropatelar puesto que la región en la que se realizó el abordaje da una clara visión de la porción distal de la tróclea lateral del fémur, sitio en donde se creó una lesión de 15 mm de diámetro en el cartílago articular y posteriormente se colocó un polímero de ácido poliglicólico (PGA) sembrado con condrocitos diferenciados y se fijó directamente sobre la lesión con la ayuda de un ancla absorbible que mantendrá el implante en su posición, el mismo procedimiento se realizó en la babilla del lado derecho realizando la lesión pero sin colocar un implante, esta servirá como control.

Material utilizado:

- 2 catéteres #14
- 20 gasas estériles
- 4 navajas de bisturí #11
- 1 extensión para catéter
- 1 venoclisis en espiral
- 10 litros de solución Ht en bolsas de 5lt
- 1 campo grande de 3 x 3 m
- 3 campos de 175 x 200 cm
- Instrumental quirúrgico básico
- Lente Artroscópico de 30°

- Instrumento Kinsey-Nash para crear lesiones condrales
- Ancla Lupine con Orthocord
- Rasurador Stryker
- Radiofrecuencia Arthrocare
- Cámara para artroscopio
- Bomba de fluidos para artroscopía
- Fuente de luz
- Camisa para artroscopio y obturador romo
- Palpador de artroscopía
- Curetas quirúrgicas
- Broca para ancla de 2.9mm
- Pinza pasasutura
- Empuja nudos artroscópico
- Cánula de egreso plástica atornillable transparente
- Pinza artroscópica Ronjeur

Procedimiento:

1. Se le administra una dosis de fenilbutazona y una de gentamicina como premedicación quirúrgica.
2. Posterior a 12 horas de ayuno el caballo es llevado a la sala de inducción y se le administra xilacina, Gliceril y ketamina para inducir la anestesia.
3. El caballo es colocado en decúbito dorsal sobre la mesa de cirugía y conectado a la máquina de anestesia inhalada para mantenerlo con isoflurano.
4. Las babillas de ambos miembros son rasuradas ampliamente y se realiza un embrocado quirúrgico con yodo espuma y alcohol en 3 tiempos.
5. Se palpan e identifican las estructuras y posteriormente se distiende la articulación femoropatelar con 60 ml de solución Ht.
6. Se realizó una incisión entre el ligamento lateral y el medio en un punto medio entre la patela y la cresta tibial.
7. Se introduce la camisa con el obturador romo y posteriormente el artroscopio.

8. Se identifican las estructuras visibles, patela, surco intertroclear y tróclea lateral.
9. Una vez confirmando que estamos dentro de la articulación se permite el flujo de agua y se distiende la articulación.
10. Se identifica el sitio en la porción distal de la tróclea lateral del fémur en su parte más aplanada, se elige este sitio para realizar la lesión puesto que es una superficie sin contacto con la patela y permitirá una reparación apropiada para su posterior examinación.
11. Se inserta el catéter #14 para triangular el abordaje apropiado para posteriormente hacer una incisión e introducir el instrumento Kinsey-Nash colocarlo en posición y realizar la lesión en el cartílago hasta 2.7 mm de profundidad aproximadamente, una vez hecha la lesión se elimina el cartílago calcificado restante y se delimita la lesión utilizando una cureta quirúrgica.
12. Se coloca una guía para broca justo en el centro de la lesión y con una broca de 2.9mm se realiza un orificio.
13. Se toma el implante de PGA y se perfora con ambos extremos de la sutura del ancla.
14. Se introduce la cánula de egreso transparente al sitio de la lesión hasta hacerla evidente en el campo de visión a través de la cánula se introduce el ancla y se martilla hasta la profundidad deseada y se confirma su estabilidad.
15. Con ayuda del empuja nudos se desliza el nudo y el implante a través de la cánula transparente y se asegura su apropiada colocación sobre el sitio de lesión.
16. Se realizan de 3-4 nudos mas hasta asegurar bien el implante y con unas tijeras de artroscopía se cortan los cabos restantes de sutura.
17. Se extrae cuidadosamente la cánula y el artroscopio y se procede a cerrar los portales.
18. Se utiliza un punto simple en X para el portal del artroscopio con sutura de polipropileno del 0 en piel y se utilizan puntos simples separados con vicryl de 2-0 para la capsula y puntos simples en X con polipropileno del 0 para el portal

donde se introdujo el instrumento para realizar la lesión y la colocación del implante.

19. Se realiza exactamente el mismo procedimiento hasta el punto #12 en la babilla contrario que servirá como control.
20. Al finalizar el procedimiento se coloca un apósito suturado a la piel cubriendo los sitios de incisión en ambos miembros.
21. Los 5 caballos permanecerán bajo observación y con tratamiento de fenilbutazona 4.4 mg/kg BID y 6.6 mg/kg SID por 5 días

Segunda Artroscopía y toma de biopsias

1. Se le administra una dosis de fenilbutazona y una de gentamicina como premedicación quirúrgica.
2. Posterior a 12 horas de ayuno el caballo es llevado a la sala de inducción y se le administra xilacina, Gliceril y ketamina para inducir la anestesia.
3. El caballo es colocado en decúbito dorsal sobre la mesa de cirugía y conectado a la máquina de anestesia inhalada para mantenerlo con isofluorano.
4. Las babillas de ambos miembros son rasuradas ampliamente y se realiza un embrocado quirúrgico con yodo espuma y alcohol en 3 tiempos.
5. Se palpan e identifican las estructuras y posteriormente se distiende la articulación femoropatelar con 60 ml de solución Ht.
6. Se realizó una incisión entre el ligamento lateral y el medio en un punto medio entre la patela y la cresta tibial.
7. Se introduce la camisa con el obturador roma y posteriormente el artroscopio.
8. Se identifican las estructuras visibles, patela, surco intertroclear y tróclea lateral.
9. Una vez confirmando que estamos dentro de la articulación se permite el flujo de agua y se distiende la articulación.
10. Se identifica el sitio en la porción distal de la tróclea lateral del fémur en su parte más aplanada en donde se aprecia el sitio de la lesión con tejido de reparación.

11. Se inserta el catéter #14 para triangular el abordaje apropiado para posteriormente hacer una incisión e introducir el instrumento con el que se tomará una biopsia de 8mm de diámetro por 3 mm de profundidad, situando el instrumento justo sobre el límite de la lesión procurando tomar una porción de tejido sano y una porción de tejido de reparación.
12. Una vez que se ha colocado la cánula para biopsiar, se dan ligeros golpes con el martillo para alcanzar la profundidad deseada de 3mm y se hacen movimientos ligeros de lado a lado para aflojar el fragmento osteocondral y posteriormente se retira la cánula biopsiadora sin perder de vista el fragmento, se ser necesario se puede disminuir el flujo de agua para evitar turbulencia y perder la biopsia.
13. Se inserta una pinza ronjeaur y se toma la biopsia cuidadosamente asegurándose de no presionar la muestra por completo y extrayéndola cuidadosamente.
14. Posteriormente se inserta una cureta y se detallan los límites de la lesión recientemente creada por el biopsiador y nos aseguramos de curetear ligeramente el hueso subcondral visible para promover un proceso de cicatrización y reparación de la lesión adecuados, ya que estos caballos no se eutanasiaron.
15. Por último se extrae la cureta y se inserta una cánula de egreso y se aumenta el flujo de líquido para lavar la articulación.
16. Se extrae cuidadosamente la cánula y el artroscopio y se procede a cerrar los portales.
17. Se utiliza un punto simple en X para el portal del artroscopio con sutura de polipropileno del 0 en piel y se utilizan puntos simples separados con vicryl de 2-0 para la capsula de ser necesario y puntos simples en X con polipropileno del 0 para el portal donde se introdujo el instrumento para realizar la lesión y la colocación del implante.
18. Se realiza exactamente el mismo procedimiento hasta el punto #12 en la babilla contrario que sirvió como control.

19. Al finalizar el procedimiento se coloca un apósito suturado a la piel cubriendo los sitios de incisión en ambos miembros.

20. Los 5 caballos permanecerán bajo observación y con tratamiento de fenilbutazona 4.4 mg/kg BID y 6.6 mg/kg SID por 5 días

PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS DE TEJIDO DE REPARACIÓN

Una vez obtenidas las biopsias osteocondrales, estas se colocaron en un tubo de 50 ml con tapa con formol al 10% para su transporte y fijación durante 24h. Pasadas las 24 h las muestras se pasaron a un solución descalcificadora (Surgipath Decalcifier II, Leica), durante 2h inicialmente (como lo especifica el producto) y con una navaja de bisturí se verificó la consistencia de las muestras, que debido a la porción de hueso subcondral tomo un aproximado de 10-15 días para que la muestras estuvieran viables para corte e inclusión en parafina.

Se incluyeron las muestras en parafina dividiéndolas por bloques, muestras experimentales, muestras controles experimentales y muestras controles cartílago normal, de cada caballo (5 caballos). Posteriormente se realizaron los cortes en el micrótopo y el montaje en laminillas, para realizar tinciones e inmunohistoquímicas.

PROTOCOLO TINCIONES

Tinción Safranina-O:

Se comienza por desparafinar las muestras a 58°C por 1 hora en el horno de temperatura controlada y se procede a rehidratar las muestras:

*Rehidratación:

Solución	Tiempo
Xilol 1	5 min.
Xilol 2	30 seg.
ETOH 100% anhidro 1	30 seg.
ETOH 100% anhidro 2	30 seg.
ETOH 96% 1	30 seg.
ETOH 96% 2	30 seg.
ETOH 80%	30 seg.
ETOH 70%	30 seg.
ETOH 60%	30 seg.
ETOH 50%	30 seg.
Agua destilada	30 seg.
Agua destilada	5 min.

Tinción

Hematoxilina de Weigert	10 min.
Lavar agua corriente	10 min.
Agua destilada	2 remojones.
Verde Rápido al 0.02%	5 min.
Acido acético	10 – 15 seg.
Safranina O al 0.1%	5 – 10 min.
ETOH 96% 1 safranina	30 seg.
ETOH 96% 2 safranina	30 seg.

*Deshidratación

ETOH 96% 1	30 seg.
------------	---------

ETOH 96% 2	30 seg.
ETOH 100% anhidro 1	30 seg.
ETOH 100% anhidro 2	30 seg.
Xilol 1	30 seg.
Xilol 2	5 min.
Dejar secar bien	10 min.
Montar laminillas con resina	

Tinción Tricrómica de masson:

Se lleva a cabo el mismo proceso para desparafinar y rehidratar.

***Desparafinar**

***Rehidratar**

Tinción

Solución de Bouin	Toda la noche a Temp. Amb.
Lavar con agua corriente	Hasta aclarar secciones
Agua destilada	30 seg.
Hematoxilina de Weigert	10 min
Lavar con agua corriente	10 min
Agua destilada	30 seg
Fuscina acida-escarlata de Biebrich	15 min
Agua destilada	10 remojones
Sol. acido fosfotúngstico	10-15 min
Sol. azul de anilina	5-10 min
Agua destilada	10 remojones
Ácido acético al 1%	3-5 min
ETOH 96% 1 Tinción Masson	30 seg.
ETOH 96% 2 Tinción Masson	30 seg

***Deshidratar**

***Montar en laminillas con resina**

Tinción de Herovici:

Se lleva a cabo el mismo proceso para desparafinar y rehidratar.

***Desparafinar**

***Rehidratar**

Tinción

PBS/Tween	5 min
Azul celestino	10 min
Lavar con agua corriente	
Hematoxilina de Regaud	5 min
Lavar con agua corriente	
Amarillo de Metanilo	2 min
Ácido acético 5%	lavado rápido
Carbonato de litio	2 min
Lavado con agua destilada	
Solución policrómica	2 min
Ácido acético 1%	lavado rápido

***Deshidratar o dejar secar a temperatura ambiente**

***Montar en laminillas con resina**

Tinción Azul de Toluidina:

Se lleva a cabo el mismo proceso para desparafinar y rehidratar.

***Desparafinar**

***Rehidratar**

Tinción

Azul de Toluidina al 0.04%	10 min
Lavar con agua de la llave flujo constante	1 min
Dejar secar bien	10 min
XILOL 1	1 min
XILOL 2	1 min

Montar las laminillas con resina

Dejar secar y Observar al microscopio

***Deshidratar o dejar secar a temperatura ambiente**

***Montar en laminillas con resina**

INMUNOHISTOQUÍMICA

Los anticuerpos primarios utilizados fueron los siguientes:

Colágena II:

Immuno, Anti-Human Collagen Type II, Mouse (Clone II-4CII)

Agregano:

Santa cruz biotechnologies, Aggrecan (4F4): sc-3395

Procedimiento Inmunohistoquímica

Se prepararon las siguientes soluciones:

- ✓ Peróxido de hidrógeno al 0.9%
- ✓ PBST (Solución buffer de fosfatos/Tween 20, 0.1%)
- ✓ Solución de Bloqueo (KIT VECTOR)
- ✓ Anticuerpo primario
- ✓ Anticuerpo secundario
- ✓ Streptavidina/HRP (ABC del KIT VECTOR)
- ✓ DAB sustrato DAKO

Se selecciono las laminillas requeridas y se siguió el siguiente procedimiento:

***Desparafinar (igual que para tinciones)**

***Rehidratar (igual que para tinciones)**

Buffer de Citratos 10 mM pH6	aprox. 10 min en olla de presión
Reposo	5 – 10 min en agua fría sin contacto
Digestión enzimática con Hialuronidasa (Solo muestras para colágena)	15 min a 37°c
Agua destilada	2 lavados de 30 seg
Peróxido de hidrógeno 0.9%	5 min
PBST	1 lavado de 4 min
Solución de bloqueo	20 min
Anticuerpo primario	Toda la noche a 4°c
PBST	1 lavado de 4 min

Anticuerpo secundario (KIT)	2 hr a 37°c
PBST	1 lavado de 4 min
Streptavidina/HRP (ABC del KIT)	30 min
PBST	1 lavado de 4 min
DAB sustrato DAKO	Ver en microscopio (20 min max.)
Agua corriente	
CONTRATINCIÓN	
Hematoxilina de Harris	filtrar 1-5 min
Agua corriente	sumergir laminillas
Alcohol ácido	sumergir laminillas
Agua corriente	sumergir laminillas
Carbonato de litio saturado	sumergir laminillas
Agua destilada	sumergir laminillas
Deshidratar en alcoholes (96%1, 96%2, 100%1, 100%2, xilol1 y xilol2	30 seg. c/u y xiloles 1 min. c/u
Montar en resina	
Observar al microscopio	

VIII. RESULTADOS

El primer procedimiento al que se sometieron los caballos fue a la toma de muestra de médula ósea de esternón, misma que ocurrió sin ninguna complicación.

Las muestras fueron procesadas y evaluadas in vitro en el laboratorio de ingeniería de tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR).

El primer procedimiento artroscópico se realizó en las instalaciones del Hospital de Equinos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM (FMVZ), durante este procedimiento se realizó artroscopía de babilla de ambos miembros posteriores de los caballos, en los que se crearon lesiones experimentales de 15 mm de diámetro x 3mm de profundidad en la porción distal de la tróclea lateral del fémur.

En el miembro derecho se realizó solo la lesión experimental y funcionó como control y en el miembro izquierdo se creó la lesión experimental y se colocó un disco de polímero de PGA sembrada con CTM diferenciadas a condrocitos y fijado con un ancla LUPINE™ PLUS with Orthocord Instability System (Johnson & Johnson).

No se presentaron ningún tipo de complicaciones durante los procedimientos realizados ni tampoco hubo reacción sugerente de rechazo de los injertos, los caballos se recuperaron totalmente sin presentar inflamación, dolor o claudicación.

El segundo procedimiento artroscópico se realizó 8 meses posterior al primero y se llevó a cabo una evaluación macroscópica de tejidos de reparación así como obtención de biopsias de ambas babillas.

Tampoco se presentaron complicaciones trans-operatorias ni post-operatorias en este procedimiento y los caballos se recuperaron satisfactoriamente

8.1 Evaluación y pruebas *in vitro* realizadas a las células troncales mesenquimales CTM

Una vez que se llevó a cabo el procesamiento de la médula ósea, se realizó un conteo celular para determinar la cantidad de células mononucleares obtenidas de cada caballo, y el resultado del conteo fue el siguiente:

Angustias: 18 millones

Bob: 8.5 millones

Navidad: 16 millones

Rocky: 17.5 millones

Zidane: 15 millones

Citometría de flujo

Como análisis fenotípico Los marcadores o proteínas de superficie que se analizaron en las citometrías de flujo fueron los siguientes:

CD90: También conocido como Thy1, proteína de superficie altamente específica para identificar células mesenquimales.

CD73: Enzima utilizada como un marcador de diferenciación linfocítica.

CD105: Glicoproteína parte del complejo receptor TGF beta.

CD45: Enzima codificada para la proteína tirosin fosfatasa, utilizada para diferenciar entre células troncales mesenquimales y células troncales hematopoyéticas, ya que se encuentra en todos los leucocitos.

CD34: Expresión de Antígeno de célula troncal hematopoyética progenitora, mediador de la unión entre células troncales y la matriz extracelular de la médula ósea.

CD14: Se expresa en macrófagos y en neutrófilos.

Lecturas para caracterización celular

	ANGUSTIAS	BOB	NAVIDAD	ROCKY	ZIDANE
CD90	61.59%	59.34%	16.21%	13.61%	56.12%
CD73	36.12%	34.13%	4.19%	5.73%	42.95%
CD105	13.06%	9.46%	5.47%	5.52%	22.70%
CD45	0.38%	0.36%	0.54%	0.37%	0.62%
CD34	1.41%	0.21%	0.44%	0.47%	0.78%
CD14	1.01%	0.27%	0.56%	0.56%	0.50%

INTERPRETACIÓN: En esta primera citometría los resultados indicaron que existe un mayor porcentaje de marcadores que indican presencia de células con características propias de células mesenquimales y un bajo porcentaje de otro tipo de células tales como monocitos y linfocitos.

Células en pase 1

	ANGUSTIAS	BOB	NAVIDAD	ROCKY	ZIDANE
CD90	96.86%	95.68%	97.04%	37.15%	24.29%
CD73	56.63%	25.75%	35.21%	3.78%	8.02%
CD105	13.33%	3.54%	0.94%	4.47%	5.09%
CD45	0.25%	0.45%	0.43%	0.33%	8.00%
CD34	0.54%	0.37%	0.08%	0.05%	0.45%
CD14	0.72%	0.40%	0.16%	0.38%	0.50%

INTERPRETACIÓN: En el pase 1 se tomo una muestra de células tras un proceso de expansión celular *in vitro* en un cultivo celular. En este primer pase la presencia de marcadores positivos a células con características propias de células mesenquimales aumento considerablemente, lo cual es indicativo de la presencia de dichas células y la presencia de un bajo porcentaje de otro tipo de células es un factor deseable.

8.2 Evaluación artroscópica del tejido de reparación

La segunda evaluación artroscópica se realizó 8 meses posteriores a la creación de las lesiones. El tejido de reparación de ambos miembros (control-derecho y Experimental-izquierdo) fue evaluado macroscópicamente con base en los sistemas de calificación establecidos de International Cartilage Repair Society ICRS y Oswestry (14)

Cuadro 1

ICRS Evaluación macroscópica de tejido de reparación

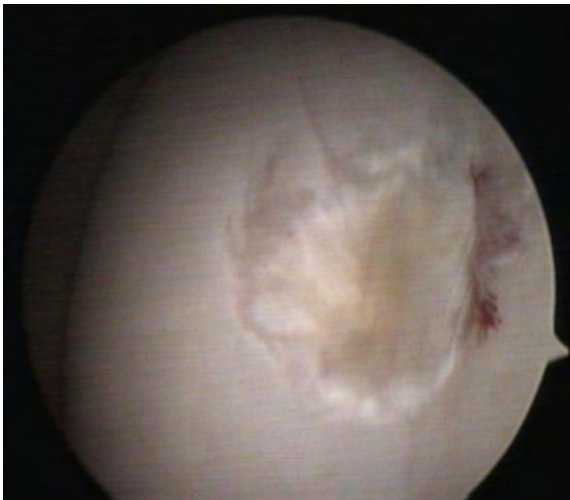
Evaluación de cartílago de reparación ICRS	Puntos
Grado de reparación de lesión	
A nivel con cartílago adyacente	4
75% reparación de profundidad de lesión	3
50% reparación de profundidad de lesión	2
25% reparación de profundidad de lesión	1
0% reparación de profundidad de lesión	0
Integración al borde de lesión	
Integración completa con cartílago adyacente	4
Borde de demarcación menor a 1mm	3
$\frac{3}{4}$ de integración de implante, $\frac{1}{4}$ con notable borde mayor a 1 mm en grosor	2
$\frac{1}{2}$ del implante integrado a cartílago adyacente, $\frac{1}{2}$ con notable borde mayor a 1 mm	1
Contacto nulo a $\frac{1}{4}$ de implante integrado a cartílago adyacente	0
Apariencia macroscópica	
Superficie suave e intacta	4
Superficie fibrilar	3
Pequeñas, y multifocales fisuras o rupturas	2
Múltiples y pequeñas o pocas pero grandes fisuras	1
Degeneración total del área de implante	0
Evaluación general del tejido de reparación	
Grado I: Normal	12
Grado II: casi normal	11 – 8
Grado III: anormal	7 – 4
Grado IV: severamente anormal	3 – 1

Cuadro 2

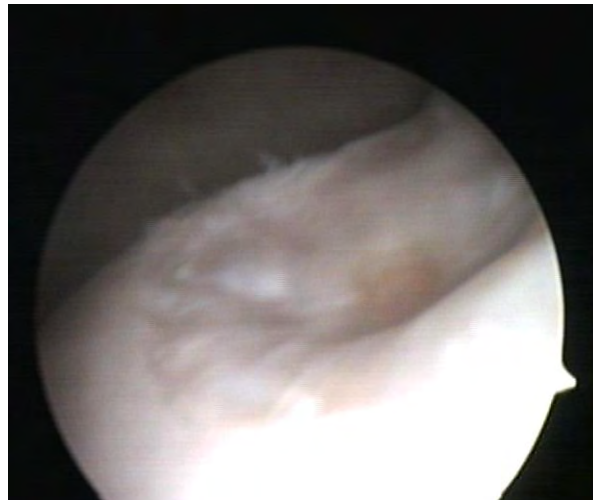
OAS (Calificación Artroscópica Oswestry)

OAS	Puntos
Nivel del tejido con cartílago adyacente	
A nivel	2
Elevado	1
Menor o por debajo	0
Integración con cartílago adyacente	
Completa	2
Interrupción mínima (menos del 25% del área)	1
Interrupción severa (más del 25% del área)	0
Apariencia de la superficie	
Suave	2
Leves irregularidades	1
Severas irregularidades/fibrilación	0
Color del tejido	
Aperlado, apariencia hialina	2
Blanco	1
Hueso amarillo	0
Firmeza a la palpación	
Normal comparado al cartílago adyacente	2
Más suave	1
Muy suave ó duro	0
Total	0 – 10

ANGUSTIAS			
ICRS	Score	OAS (oswestry arthroscopy score)	Score
Babilla derecha (control)		Babilla derecha (control)	
Grado de reparación de lesión	1	Nivel del tejido con cartílago adyacente	0
Integración al borde de lesión	2	Integración a cartílago adyacente	0
Apariencia macroscópica	1	Apariencia de la superficie	0
Evaluación general de reparación	2	Color del tejido	2
		Firmeza a la palpación	0
		Total	2
Babilla izquierda (implante)		Babilla izquierda (implante)	
Grado de reparación de lesión	1	Nivel del tejido con cartílago adyacente	0
Integración al borde de lesión	2	Integración a cartílago adyacente	1
Apariencia macroscópica	1	Apariencia de la superficie	0
Evaluación general de reparación	2	Color del tejido	1
		Firmeza a la palpación	1
		Total	3

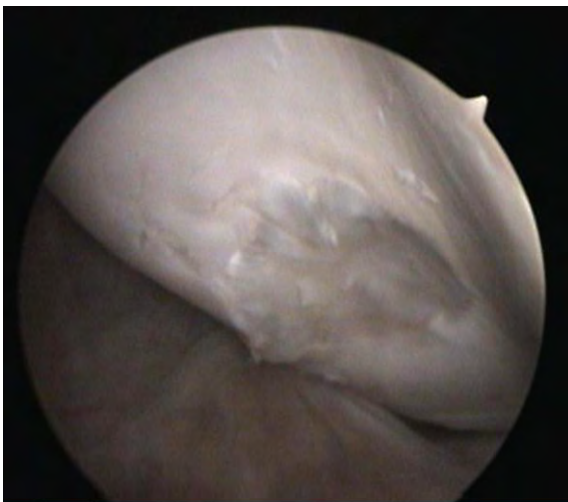


Angustias.
Babilla derecha sin implante

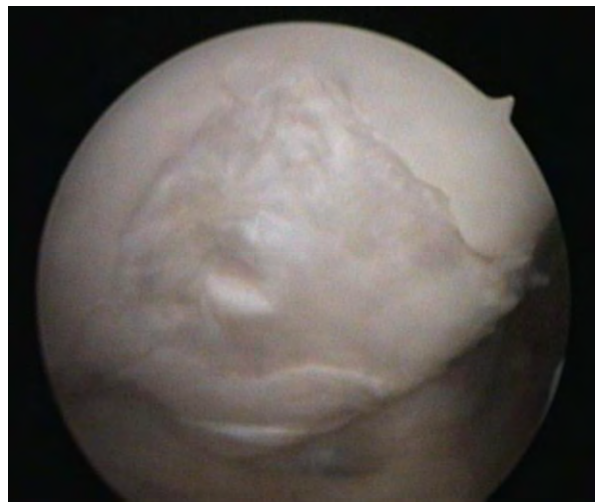


Angustias.
Babilla izquierda con implante

BOB			
ICRS	Score	OAS (oswestry arthroscopy score)	Score
Babilla derecha (control)		Babilla derecha (control)	
Grado de reparación de lesión	2	Nivel del tejido con cartílago adyacente	0
Integración al borde de lesión	2	Integración a cartílago adyacente	1
Apariencia macroscópica	2	Apariencia de la superficie	0
Evaluación general de reparación	6	Color del tejido	2
		Firmeza a la palpación	1
		Total	4
Babilla izquierda (implante)		Babilla izquierda (implante)	
Grado de reparación de lesión	3	Nivel del tejido con cartílago adyacente	2
Integración al borde de lesión	3	Integración a cartílago adyacente	1
Apariencia macroscópica	3	Apariencia de la superficie	2
Evaluación general de reparación	9	Color del tejido	2
		Firmeza a la palpación	1
		Total	8

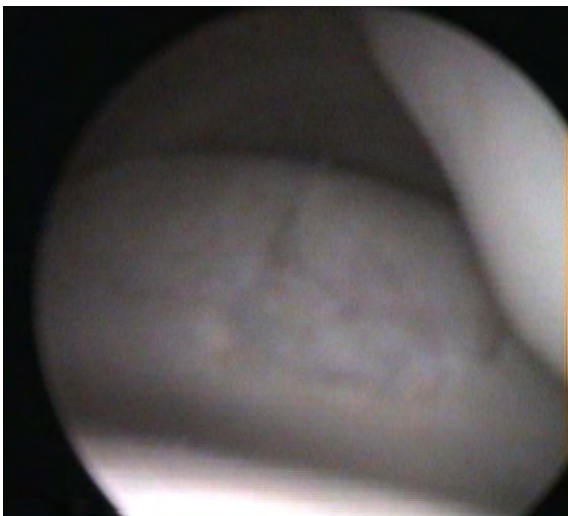


Bob.
Babilla Derecha sin implante



Bob.
Babilla izquierda con implante

NAVIDAD			
ICRS	Score	OAS (oswestry arthroscopy score)	Score
Babilla derecha (control)		Babilla derecha (control)	
Grado de reparación de lesión	3	Nivel del tejido con cartílago adyacente	0
Integración al borde de lesión	3	Integración a cartílago adyacente	1
Apariencia macroscópica	3	Apariencia de la superficie	2
Evaluación general de reparación	5	Color del tejido	2
		Firmeza a la palpación	1
		Total	6
Babilla izquierda (implante)		Babilla izquierda (implante)	
Grado de reparación de lesión	4	Nivel del tejido con cartílago adyacente	2
Integración al borde de lesión	3	Integración a cartílago adyacente	1
Apariencia macroscópica	3	Apariencia de la superficie	2
Evaluación general de reparación	9	Color del tejido	2
		Firmeza a la palpación	1
		Total	8

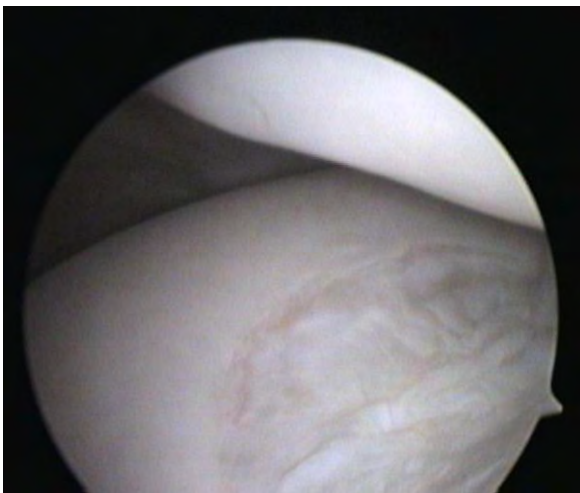


Navidad.
Babilla Derecha sin implante



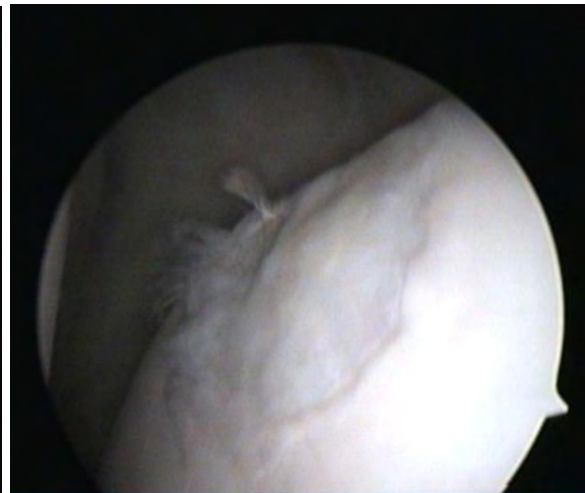
Navidad.
Babilla izquierda con implante

ROCKY			
ICRS	Score	OAS (oswestry arthroscopy score)	Score
Babilla derecha (control)		Babilla derecha (control)	
Grado de reparación de lesión	1	Nivel del tejido con cartílago adyacente	2
Integración al borde de lesión	1	Integración a cartílago adyacente	1
Apariencia macroscópica	1	Apariencia de la superficie	1
Evaluación general de reparación	3	Color del tejido	2
		Firmeza a la palpación	1
		Total	7
Babilla izquierda (implante)		Babilla izquierda (implante)	
Grado de reparación de lesión	2	Nivel del tejido con cartílago adyacente	0
Integración al borde de lesión	2	Integración a cartílago adyacente	1
Apariencia macroscópica	2	Apariencia de la superficie	2
Evaluación general de reparación	6	Color del tejido	2
		Firmeza a la palpación	1
		Total	6



Rocky.

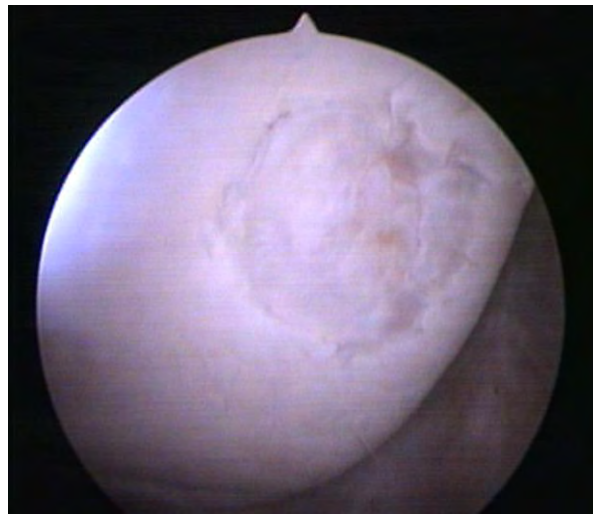
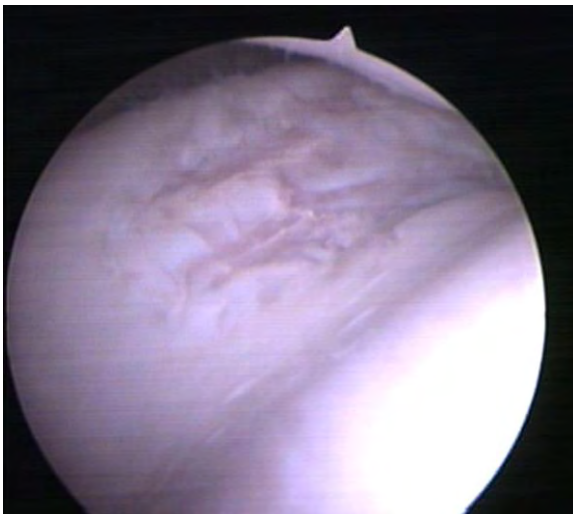
Babilla Derecha sin implante



Rocky.

Babilla izquierda con implante

ZIDANE			
ICRS	Score	OAS (oswestry arthroscopy score)	Score
Babilla derecha (control)		Babilla derecha (control)	
Grado de reparación de lesión	1	Nivel del tejido con cartílago adyacente	0
Integración al borde de lesión	0	Integración a cartílago adyacente	0
Apariencia macroscópica	1	Apariencia de la superficie	0
Evaluación general de reparación	2	Color del tejido	2
		Firmeza a la palpación	0
		Total	2
Babilla izquierda (implante)		Babilla izquierda (implante)	
Grado de reparación de lesión	3	Nivel del tejido con cartílago adyacente	2
Integración al borde de lesión	3	Integración a cartílago adyacente	1
Apariencia macroscópica	3	Apariencia de la superficie	2
Evaluación general de reparación	6	Color del tejido	1
		Firmeza a la palpación	0
		Total	6



Zidane.

Babilla Derecha sin implante

Zidane.

Babilla izquierda con implante

8.3 Resumen de resultados obtenidos en la evaluación del tejido de reparación

Macroscópicamente se aprecian algunas diferencias a destacar entre el tejido de reparación control y la lesión en la que se utilizó el polímero de PGA. En ambos grupos se aprecia el desarrollo de un proceso de cicatrización y la superficie de las lesiones está cubierta en su mayoría por tejido de reparación, sin embargo en la lesión control el tejido es poco uniforme y se evidencian zonas focales en las que el proceso regenerativo es escaso; en el caso de las lesiones experimentales, la superficie de las lesiones están en su mayoría cubiertas por tejido de reparación que cubre en su mayoría la totalidad de las lesiones, y la zona de unión al cartílago sano adyacente presenta tejido medianamente uniforme y con un color y firmeza similar.

Al realizar lesiones de grosor completo, es decir retirando el cartílago y el cartílago calcificado que se encuentra por debajo de este, se expone el hueso subcondral, el cual juega un papel crucial en la reparación de lesiones condrales ya que libera múltiples factores de crecimiento y células mononucleares, entre ellas las células mesenquimales, que promueven dicha reparación. Las lesiones control desarrollaron un tejido de reparación con características similares a las del grupo experimental en cuanto a firmeza y color, sin embargo la superficie de las lesiones presentó mayor irregularidad y zonas focales en donde el tejido de reparación no proliferó de la misma manera.

En las tablas mostradas a continuación se hace evidente un puntaje mayor en cuanto a calificación cualitativa, en ambos sistemas de calificación de tejido de reparación.

ICRS		
Caballo	Control exp.	Experimental
1. Angustias	6	6
2. Bob	12	18
3. Navidad	14	19
4. Rocky	6	12
5. Zidane	4	15
Total	42	70

Oswestry		
Caballo	Control exp.	Experimental
1. Angustias	2	3
2. Bob	4	8
3. Navidad	6	8
4. Rocky	7	6
5. Zidane	2	6
Total	21	31

Comentario: En la tabla de ICRS el grupo experimental superó por 28 puntos al grupo control, mientras que en la tabla de Oswestry el grupo experimental superó al grupo control por 10 puntos.

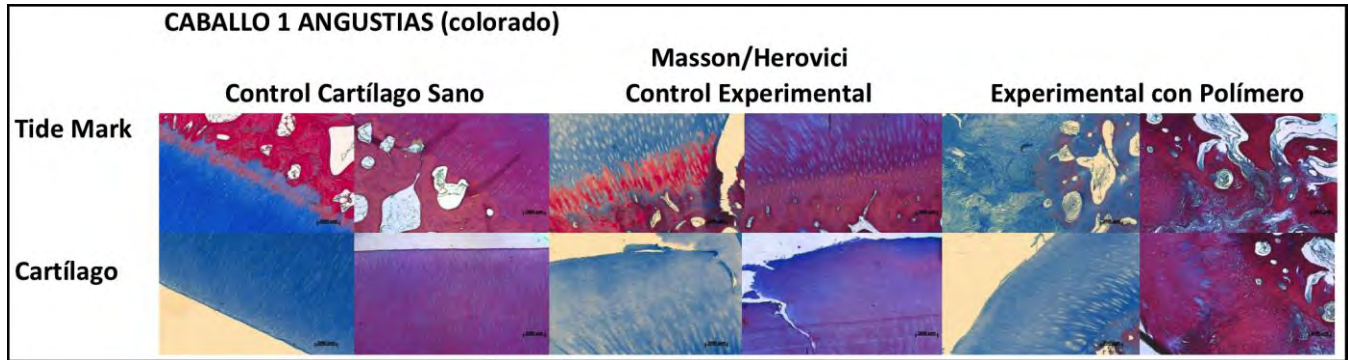
8.4 Evaluación histológica del tejido de reparación

La evaluación de las muestras de tejido de reparación fue calificada con base en la siguiente tabla (70):

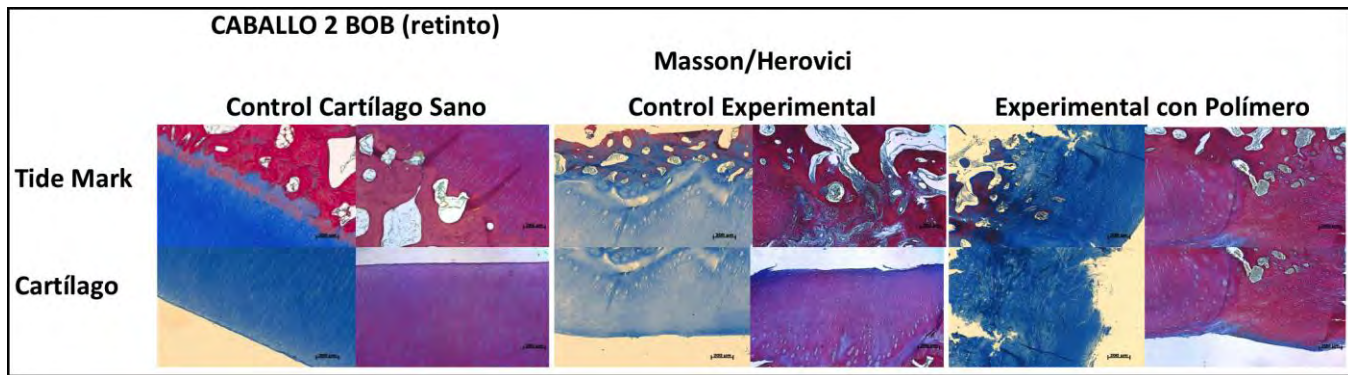
CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN
1. Morfología	Hialino=3
	Hialino/fibrocartílago= 2
	Fibrocartílago= 1
	Tejido fibroso= 0
2. Afinidad por la tinción	Cercana a la normal= 1
	Anormal= 0
3. Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal= 2
	Moderadamente irregular=1
	Muy irregular=0
4. Agregados de condrocitos	Ninguno= 1
	Menor o igual al 25% de las células= 0.5
	Mayor al 25% de las células= 0
5. Integración basal	Buena= 1
	Pobre= 0

8.5 Tinciones realizadas al tejido de reparación

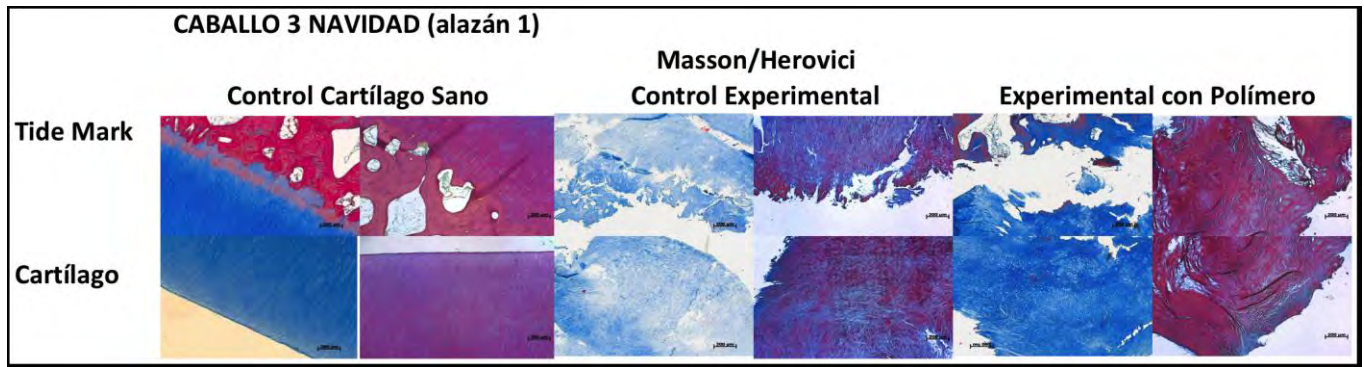
MASSON/HEROVICI



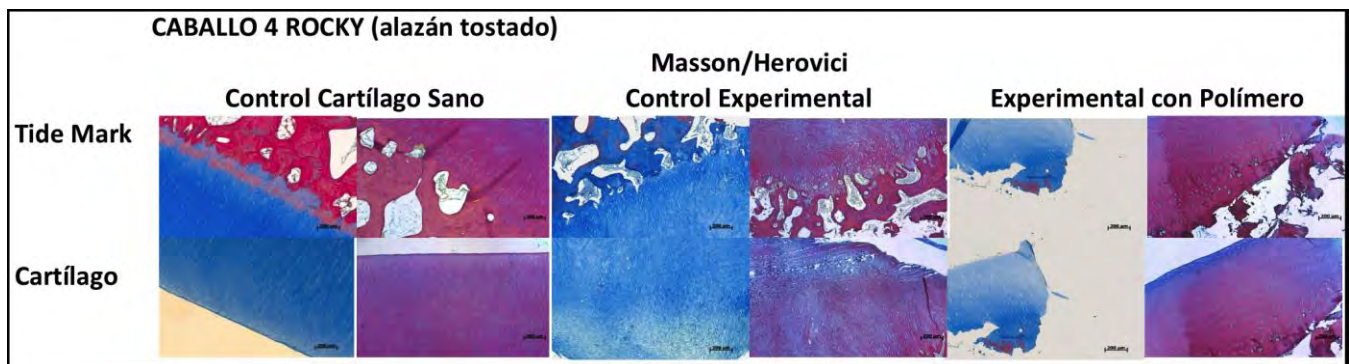
Morfología	3	3	Morfología	2	2	Morfología	2	2
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	1	1
Arq. Superficie	2	2	Arq. superficie	1	1	Arq. superficie	1	0
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	0
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	1	1



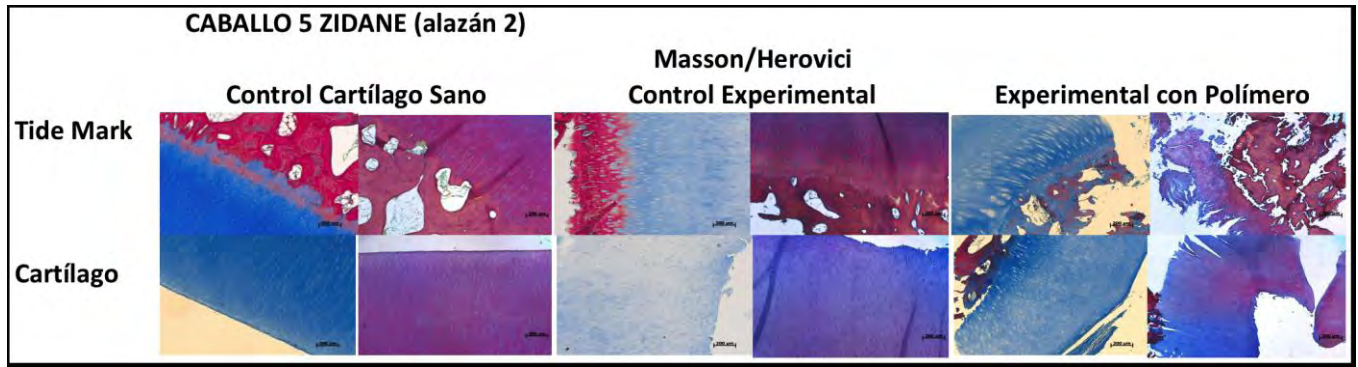
Morfología	3	3	Morfología	2	1	Morfología	2	2
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	0	1	Afinidad por la tinción	1	1
Arq. Superficie	2	2	Arq. superficie	1	0	Arq. superficie	1	1
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	.5	0	Agregados de condrocitos	.5	.5
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	1	1



Morfología	3	3	Morfología	2	2	Morfología	2	2
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	0	1	Afinidad por la tinción	1	1
Arq. Superficie	2	2	Arq. Superficie	1	1	Arq. superficie	1	1
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	.5	.5	Agregados de condrocitos	1	1
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	1	1

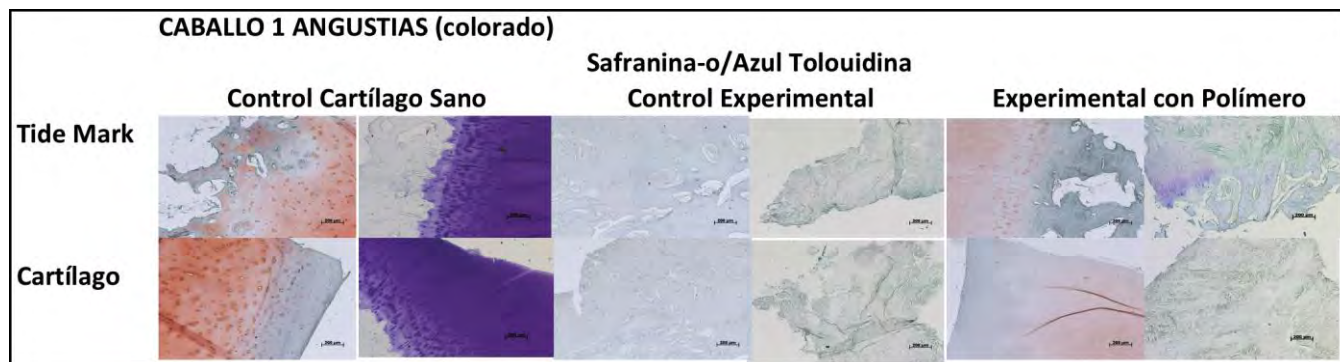


Morfología	3	3	Morfología	2	2	Morfología	2	3
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	1	1
Arq. Superficie	2	2	Arq. Superficie	1	1	Arq. superficie	2	2
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	0	0

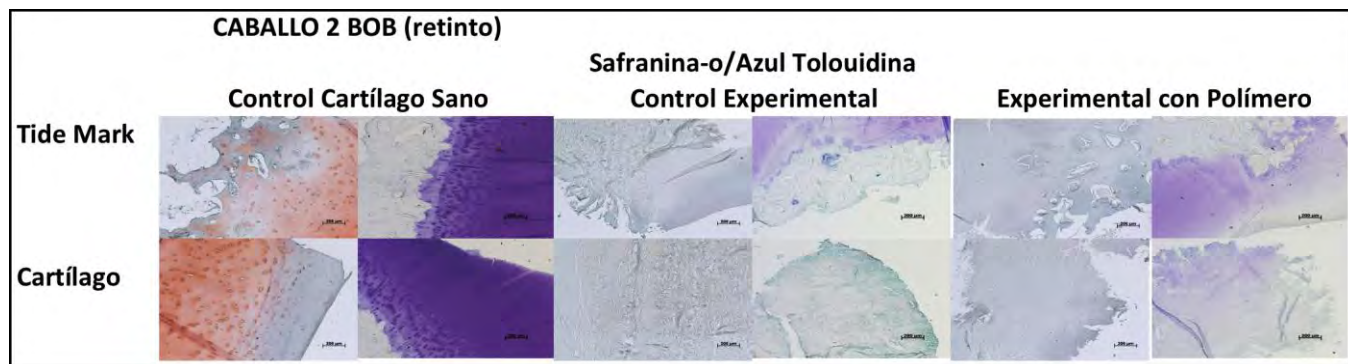


Morfología	3	3	Morfología	3	3	Morfología	3	2
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	0	1	Afinidad por la tinción	1	1
Arq. Superficie	2	2	Arq. superficie	2	2	Arq. superficie	2	1
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	1	0

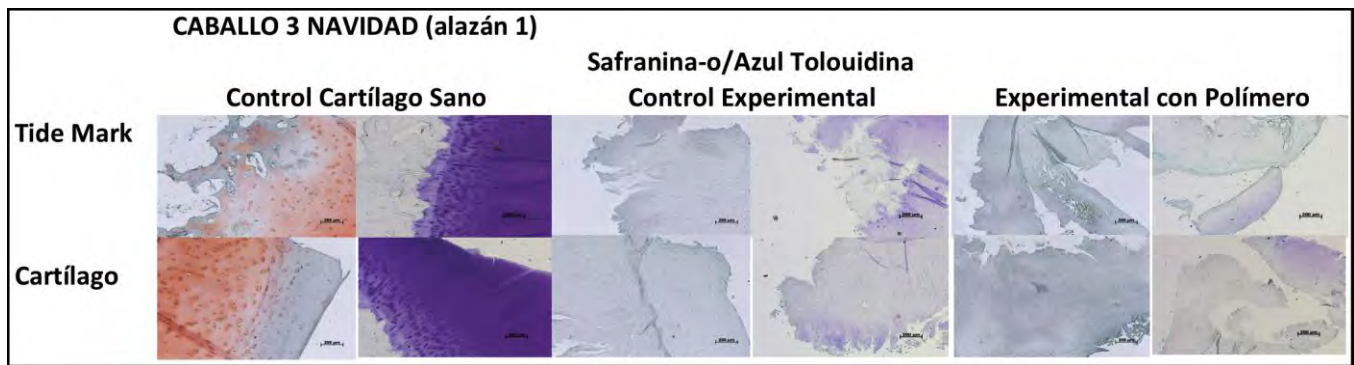
SAFRANINA-O/AZUL DE TOLOUIDINA



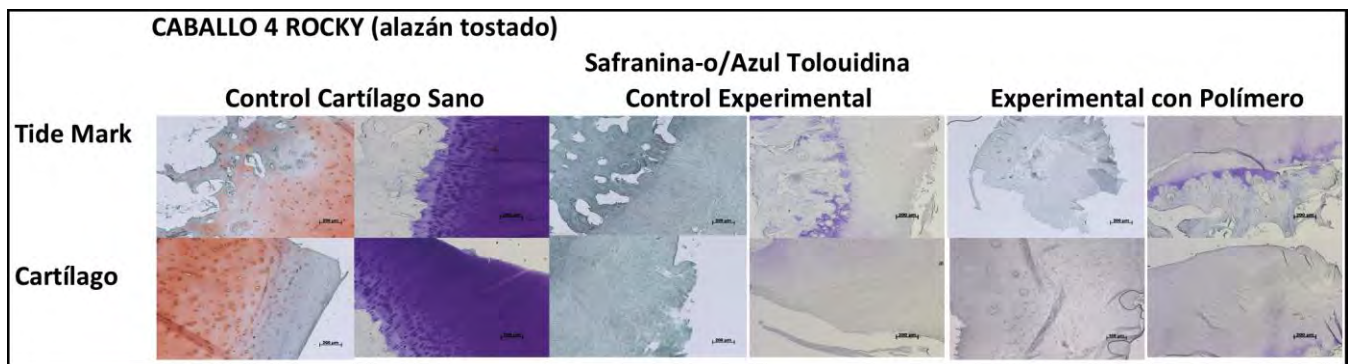
Morfología	3	3	Morfología	1	1	Morfología	2	2
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	0	0	Afinidad por la tinción	0	0
Arq. Superficie	2	2	Arq. Superficie	0	0	Arq. superficie	2	1
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	1	1



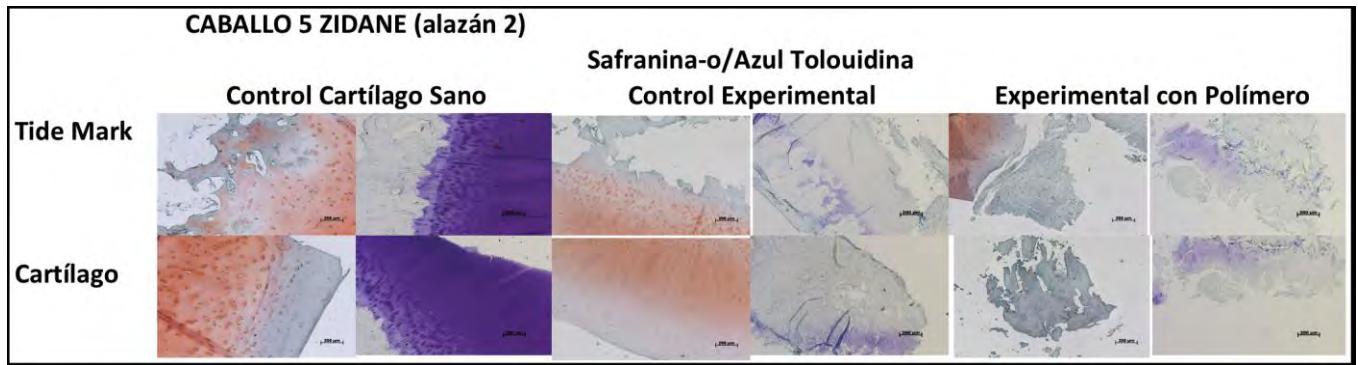
Morfología	3	3	Morfología	1	2	Morfología	1	2
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	0	0	Afinidad por la tinción	0	0
Arq. Superficie	2	2	Arq. Superficie	0	0	Arq. superficie	0	0
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	1	1



Morfología	3	3	Morfología	1	2	Morfología	2	2
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	0	0	Afinidad por la tinción	0	0
Arq. Superficie	2	2	Arq. superficie	0	0	Arq. superficie	0	0
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1
Integración basal	1	1	Integración basal	0	1	Integración basal	1	1



Morfología	3	3	Morfología	2	2	Morfología	2	2
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	0	0	Afinidad por la tinción	0	0
Arq. Superficie	2	2	Arq. superficie	1	1	Arq. superficie	1	2
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	0	1



Morfología	3	3	Morfología	3	2	Morfología	2	1
Afinidad por la tinción	1	1	Afinidad por la tinción	0	0	Afinidad por la tinción	0	0
Arq. Superficie	2	2	Arq. Superficie	2	1	Arq. superficie	0	1
Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1	Agregados de condrocitos	1	1
Integración basal	1	1	Integración basal	1	1	Integración basal	0	1

8.5.1 Interpretación de resultados de tinciones

Afinidad de los colorantes en las tinciones:

SAFRANINA-O	Color
Matriz de cartílago	Naranja a rojo
Hueso subyacente	Verde
Núcleo	Negro
Citoplasma	Verde gris

AZUL DE TOLOUDINIA	Color
Matriz de cartílago (estructuras ricas en glicosaminoglicanos sulfatados), núcleo	Violeta intenso
Citoplasma y otros elementos del tejido	Varios tipos de azul claro

TRICRÓMICA DE MASSON	Color
Núcleos	Negro
Músculo, citoplasma, queratina, Hueso	Rojo
Colágena	Azul

HEROVICI	Color
Colágena recién sintetizada o joven (Colágena III), otras colágenas, glucoproteínas y proteoglicanos.	Azul
Colágena madura o Colágena tipo I	Rojo
Citoplasma	Amarillo verdoso
Núcleo	Negro
Queratina, músculo y glóbulos rojos	Amarillo brillante
Cartílago hialino	Verde azulado

Caballo 1 Angustias (colorado)

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Tricromica de Masson						
Control Exp.	2	1	1	1	1	6
Experimental	2	1	1	1	1	6

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Herovici						
Control Exp.	2	1	1	1	1	6
Experimental	2	1	0	0	1	4

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Safranina-O						
Control Exp.	1	0	0	1	1	3
Experimental	2	0	2	1	1	6

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Azul de Toloudina						
Control Exp.	1	0	0	1	1	3
Experimental	2	0	1	1	1	5

Caballo 2 Bob (retinto)

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Tricromica de Masson						
Control Exp.	2	0	1	0.5	1	4.5
Experimental	2	1	1	0.5	1	5.5

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Herovici						
Control Exp.	1	1	0	0	1	3
Experimental	2	1	1	0.5	1	5.5

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Safranina-O						
Control Exp.	1	0	0	1	1	3
Experimental	1	0	0	1	1	3

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Azul de Toloudina						
Control Exp.	2	0	0	1	1	4
Experimental	2	0	0	1	1	4

Caballo 3 Navidada (alazán 1)

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Tricromica de Masson						
Control Exp.	2	0	1	0.5	1	4.5
Experimental	2	1	1	1	1	6

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Herovici						
Control Exp.	2	1	1	0.5	1	5.5
Experimental	2	1	1	1	1	6

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Safranina-O						
Control Exp.	1	0	0	1	0	2
Experimental	2	0	0	1	1	4

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Azul de Toloudina						
Control Exp.	2	0	0	1	1	4
Experimental	2	0	0	1	1	4

Caballo 4 Rocky (alazán tostado)

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Tricromica de Masson	1	2	3	4	5	
Control Exp.	2	1	1	1	1	6
Experimental	2	1	2	1	0	6

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Herovici	1	2	3	4	5	
Control Exp.	2	1	1	1	1	6
Experimental	3	1	2	1	0	7

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Safranina-O	1	2	3	4	5	
Control Exp.	2	0	1	1	1	5
Experimental	2	0	1	1	0	4

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Azul de Toloudina	1	2	3	4	5	
Control Exp.	2	0	1	1	1	5
Experimental	2	0	2	1	1	6

Caballo 5 Zidane (alazán 2)

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Tricromica de Masson	1	2	3	4	5	
Control Exp.	3	0	2	1	1	7
Experimental	3	1	2	1	1	8

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Herovici	1	2	3	4	5	
Control Exp.	3	1	2	1	1	8
Experimental	2	1	1	1	0	5

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Safranina-O	1	2	3	4	5	
Control Exp.	3	0	2	1	1	7
Experimental	2	0	0	1	0	3

Tinción	Características del tejido					Total
	1	2	3	4	5	
Azul de Toloudina	1	2	3	4	5	
Control Exp.	2	0	1	1	1	5
Experimental	1	0	1	1	1	4

8.5.2 Resumen de resultados por tinciones

Resultados por tinción y por caballo:

Tricrómica de Masson

Caballo	Control exp.	Experimental
1. Angustias	6	6
2. Bob	4.5	5.5
3. Navidad	4.5	6
4. Rocky	6	6
5. Zidane	7	8
Total	28	31.5

Herovici

Caballo	Control exp.	Experimental
1. Angustias	6	4
2. Bob	3	5.5
3. Navidad	5.5	6
4. Rocky	6	7
5. Zidane	8	5
Total	28.5	27.5

Safranina-O

Caballo	Control exp.	Experimental
1. Angustias	3	6
2. Bob	3	3
3. Navidad	2	4
4. Rocky	5	4
5. Zidane	7	3
Total	20	20

Azul de toloudina

Caballo	Control exp.	Experimental
1. Angustias	3	5
2. Bob	4	4
3. Navidad	4	4
4. Rocky	5	6
5. Zidane	5	4
Total	21	23

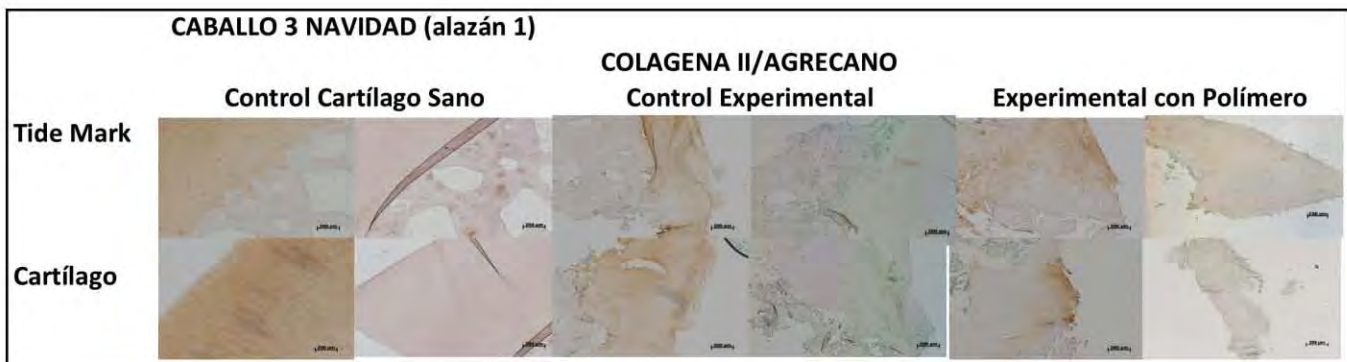
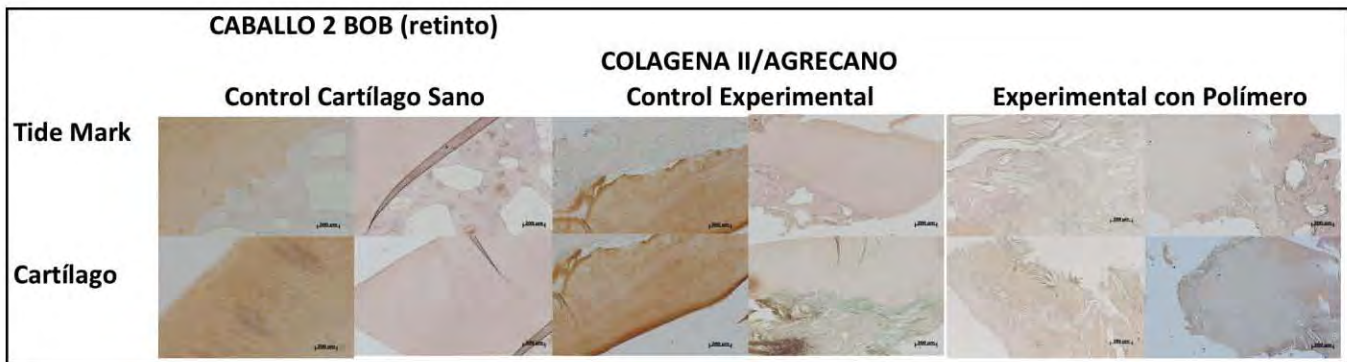
Puntaje total acumulado:

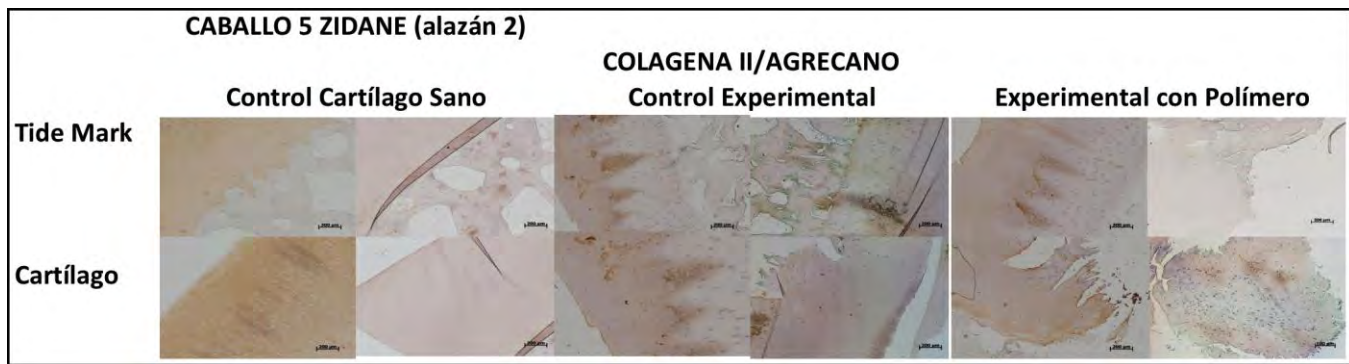
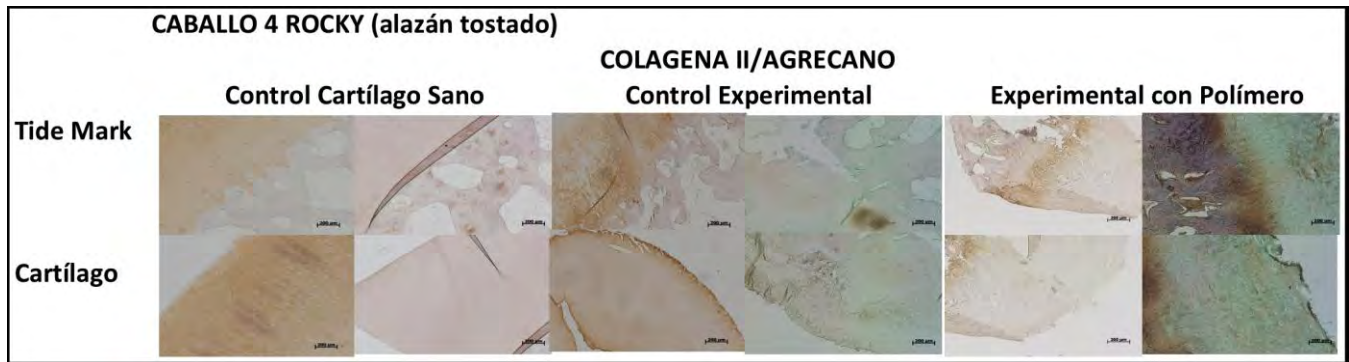
Tinción	Control exp.	Experimental
Tricrómica de Masson	28	31.5
Herovici	28.5	27.5
Safranina-O	20	20
Azul de toluidina	21	23
Total	97.5	102

Comentario: El grupo control superó al grupo experimental por 4.5 puntos.

8.6 Inmunohistoquímica realizada a tejido de reparación

COLÁGENA II/AGRECANO





8.7 Resumen de resultados obtenidos por inmunohistoquímica

A los 8 meses de realizada la implantación, la expresión de colágena II (color café intenso) es evidente en toda la superficie de las lesiones, tanto experimental como control.

En la muestra experimental de los caballos 2, 3 y 4 se aprecia una menor intensidad en el grado de expresión de colágena II, siendo un poco mas evidente en los grupos control.

8.8 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de este estudio, dada la naturaleza de la variable (La variable respuesta es continua y esta medida en escala ordinal) se decidió usar la prueba No paramétrica de Friedman, debido a que las k muestras están relacionadas, de forma que las características de los i -ésimos elementos de cada muestra son idénticas, las diferencias observadas entre las muestras serán atribuidas únicamente al efecto del factor diferenciador de los grupos. El contraste de la hipótesis de que las k muestras proceden de una misma población no puede realizarse mediante el análisis de varianza o con la prueba t-Student, al incumplirse los supuesto de normalidad, igualdad de varianza y más importante el de independencia de las muestras. La hipótesis nula que se contrasta es que las respuestas asociadas a cada uno de los "tratamientos" tienen la misma distribución de probabilidad o distribuciones con la misma mediana, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos la distribución de una de las respuestas difiere de las demás.

El modelo estadístico fue:

$$Y \sim A|B$$

Dónde:

Y: es la variable respuesta (medida en escala ordinal);
A: es el factor grupo (Control Ex., Experimental);
B: es el factor bloque (Caballo: 1, 2, 3, 4,5).

El análisis estadístico se desarrolló en el software *R 3.1.0. Para la contratación de la hipótesis se utilizó una significancia (α) de 0.05.

Control Ex. VS. Experimental	
Macro	<i>p-value</i>
ICRS	0.0455*
Oswestry	0.1797
Tinción	
Tricrómica de Masson	0.0832
Herovici	0.6547
Safranina-O	1
Azul de toloudina	0.5637

* $p\text{-value} \leq 0.05$ se rechaza H_0 . Y se concluye que existe evidencia estadística suficiente para decir que los tratamientos son diferentes.

En el cuadro anterior podemos apreciar los diferentes *p-values* para cada variable respuesta. Con los $p\text{-values} \leq 0.05$ se concluye que estadísticamente son diferentes el grupo Control Ex. y el grupo Experimental. La variable ICRS es la única que cuenta con una *p-value* menor a 0.05. Por lo tanto, concluimos que los grupos son diferentes. El resto de las variable obtuvieron un *p-value* superior a 0.05 por lo tanto no se rechaza la hipótesis nula que enuncia que los grupos son iguales.

*R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Adicionalmente se corrió el análisis estadístico en el programa XSTAT (2015), en el cual se confirmaron los mismos resultados, el resumen de los análisis se agrega a continuación.

Safranina – O:

Summary statistics:

Variable	Observations	Obs. with missing data	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Control exp.	5	0	5	2.000	7.000	4.000	2.000
Experimental	5	0	5	3.000	6.000	4.000	1.225

Friedman's test:

Q (Observed value)	0.000
Q (Critical value)	3.841
DF	1
p-value (Two-tailed)	1.000
Alpha	0.05

Test interpretation:

H0: The samples come from the same population.

Ha: The samples do not come from the same population.

As the computed p-value is greater than the significance level $\alpha=0,05$, one cannot reject the null hypothesis H0.

The risk to reject the null hypothesis H0 while it is true is 100,00%.

Ties have been detected in the data and the appropriate corrections have been applied.

Azul de toluidina:

Summary statistics:

Variable	Observations	Obs. with missing data	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Control exp.	5	0	5	3.000	5.000	4.200	0.837
Experimental	5	0	5	4.000	6.000	4.600	0.894

Friedman's test:

Q (Observed value)	0.333
Q (Critical value)	3.841
DF	1
p-value (Two-tailed)	0.564
Alpha	0.05

Test interpretation:

H0: The samples come from the same population.

Ha: The samples do not come from the same population.

As the computed p-value is greater than the significance level $\alpha=0,05$, one cannot reject the null hypothesis H0.

The risk to reject the null hypothesis H0 while it is true is 56,37%.

Ties have been detected in the data and the appropriate corrections have been applied.

Tricrómica de Masson:

Summary statistics:

Variable	Observations	Obs. with missing data	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Control exp.	5	0	5	4.500	7.000	5.600	1.084
Experimental	5	0	5	5.500	8.000	6.300	0.975

Friedman's test:

Q (Observed value)	3.000
Q (Critical value)	3.841
DF	1
p-value (Two-tailed)	0.083
Alpha	0.05

Test interpretation:

H₀: The samples come from the same population.

H_a: The samples do not come from the same population.

As the computed p-value is greater than the significance level $\alpha=0,05$, one cannot reject the null hypothesis H₀.

The risk to reject the null hypothesis H₀ while it is true is 8,33%.

Ties have been detected in the data and the appropriate corrections have been applied.

Herovici:

Summary statistics:

Variable	Observations	Obs. with missing data	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Control exp.	5	0	5	3.000	8.000	5.700	1.789
Experimental	5	0	5	4.000	7.000	5.500	1.118

Friedman's test:

Q (Observed value)	0.200
Q (Critical value)	3.841
DF	1
p-value (Two-tailed)	0.655
Alpha	0.05

Test interpretation:

H0: The samples come from the same population.

Ha: The samples do not come from the same population.

As the computed p-value is greater than the significance level $\alpha=0,05$, one cannot reject the null hypothesis H0.

The risk to reject the null hypothesis H0 while it is true is 65,47%.

ICRS:

Summary statistics:

Variable	Observations	Obs. with missing data	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Control exp. Experiment	5	0	5	4.000	14.000	8.400	4.336
al	5	0	5	6.000	19.000	14.000	5.244

Friedman's test:

Q (Observed value)	4.000
Q (Critical value)	3.841
DF	1
p-value (Two-tailed)	0.046
Alpha	0.05

Test interpretation:

H0: The samples come from the same population.

Ha: The samples do not come from the same population.

As the computed p-value is lower than the significance level $\alpha=0,05$, one should reject the null hypothesis H0, and accept the alternative hypothesis Ha.

The risk to reject the null hypothesis H0 while it is true is lower than 4,55%.

Ties have been detected in the data and the appropriate corrections have been applied.

Oswestry:

Summary statistics:

Variable	Observations	Obs. with missing data	Obs. without missing data	Minimum	Maximum	Mean	Std. deviation
Control exp.	5	0	5	2.000	7.000	4.200	2.280
Experimental	5	0	5	3.000	8.000	6.200	2.049

Friedman's test:

Q (Observed value)	1.800
Q (Critical value)	3.841
DF	1
p-value (Two-tailed)	0.180
Alpha	0.05

Test interpretation:

H₀: The samples come from the same population.

H_a: The samples do not come from the same population.

As the computed p-value is greater than the significance level $\alpha=0,05$, one cannot reject the null hypothesis H₀.

The risk to reject the null hypothesis H₀ while it is true is 17,97%.

IX. DISCUSIÓN

Hace aproximadamente 5 décadas, Friedstein y colaboradores, describieron una población de células no hematopoyéticas aisladas de la médula ósea del humano con la habilidad *in vitro* de adherirse, proliferar y diferenciarse a condrocitos, osteoblastos y adipocitos.

Debido a sus propiedades de diferenciación y la relativa facilidad para aislarlas y expandirlas *in vitro*, estas células mesenquimales eran naturalmente consideradas como una atractiva fuente de células progenitoras para ingeniería de tejidos y aplicaciones en medicina regenerativa. La gran capacidad de proliferación y diferenciación de las células mesenquimales es controlada por una extensa lista de factores de crecimiento, citoquinas, hormonas, moléculas de señalización tanto solubles como insolubles y factores de transcripción. Los tejidos musculoesqueléticos demandan una específica forma y fuerza mecánica, y el éxito de la ingeniería de tejidos es dependiente de las interacciones dinámicas de las células, polímeros o andamios y diversos tipos de señalización tanto físicas como químicas (19).

A diferencia de otros estudios realizados anteriormente en los cuales se obtenían condrocitos autólogos directamente del paciente, lo cual implica un procedimiento quirúrgico adicional para la obtención de dichas células (12, 43, 45), en este estudio se utilizaron CTM derivadas de médula ósea y diferenciación condrocítica. Aunque el procedimiento para la obtención de médula ósea conlleva cierto grado de estrés y la necesidad de sedación, el tiempo de recuperación y manejo del paciente son mínimos, y con esto se evita someter al paciente al estrés de un segundo procedimiento quirúrgico, anestesia, manejo post operatorio y el impacto económico relacionado a cada uno de estos puntos.

El efecto terapéutico de las técnicas de estimulación con médula ósea, se atribuye principalmente al rol de las CTM dentro de la médula ósea. En un estudio realizado en 2012, se realizaron diferentes defectos condrales y microfracturas en

conejos y se midió el número de CTM obtenidas a partir de la médula ósea proveniente de dichos defectos, la cantidad de CTM varía dependiendo el método de estimulación, es decir el tamaño y profundidad de las lesiones, a mayor profundidad de la lesión sobre el hueso subcondral, mayor número de CTM drenadas (49). Dicho hallazgo resalta la importancia de crear lesiones experimentales eliminando el cartílago calcificado y dejando al descubierto el hueso subcondral e incluso complementar con microfracturas, obteniendo así la mayor liberación de CTM.

Así como en un estudio realizado en 2009, en el cual se evaluó la respuesta a mediano plazo de la reparación de lesiones a cartílago articular de borrego, comparando el uso de polímeros de ácido poliglicólico (PGA) sin células en lesiones con microfracturas (51), en este estudio también se utilizó un polímero de PGA utilizando a los caballos como modelo animal con la diferencia que en este caso se utilizaron CTM. En dicho estudio se concluyó que las lesiones en las que se colocó el polímero de PGA sin células en adición a las microfracturas, indujeron una reparación de tipo cartilaginosa y con presencia de colágena tipo II. Las lesiones que se trataron solo con microfractura, desarrollaron una combinación de tejido cartilaginoso y fibrocartílago hacia los márgenes de la lesión (51). Se sugiere que cubrir con un polímero de PGA las lesiones que se han microfracturado, puede ser una opción prometedora de tratamiento contra defectos condrales y mejoran la regeneración del cartílago articular, y si a esto le agregamos la utilización de CTM autólogas, las características y calidad del tejido de reparación se ven mejoradas como se demostró en este estudio mismo en el que podemos suponer que la utilización de PGA como andamio para implantación de CTM diferenciadas es seguro para su utilización en equinos y provee el ambiente adecuado para el crecimiento y proliferación celular.

En el presente estudio se llevó a cabo la diferenciación de las CTM a diferentes linajes celulares (adiposo, óseo y condral) y por medio de distintos métodos de tinción se confirmó el tipo celular. La diferenciación a un linaje condral tiene como consecuencia un efecto de reparación en las lesiones osteocondrales creadas en

la troclea lateral del fémur de los caballos y al ser sembradas en polímeros biodegradables es posible proveer un medio ambiente propicio para su expansión dentro de las articulaciones, tal y como lo describen Lam y colaboradores, quienes evaluaron la habilidad de células mesenquimales condrogénica y osteogénicamente pre-diferenciadas y encapsuladas en hidrogeles, de tener un efecto de reparación sobre lesiones osteocondrales en el cóndilo femoral de conejos. Tras un análisis del tejido de reparación de las muestras, se concluyó que la regeneración de cartílago en defectos osteocondrales puede ser estimulada por CTM pre-diferenciadas en condrocitos u osteoblastos previo a la implantación de los hidrogeles (63).

El sitio en el que fueron realizadas las lesiones articulares fue elegido con base en el conocimiento que se tiene de biomecánica de la articulación femoropatelar tomando en cuenta que la tróclea lateral del fémur en su porción distal, cuenta con una faceta plana antes de continuar hacia el cóndilo femoral, es en esta región en donde ocurre una menor fricción patelar y se puede colocar un implante celular con un menor riesgo de perderlo por aplicar carga o fricción, de esta manera mejorando las posibilidades de que un proceso de reparación ocurra de manera ininterrumpida. En el estudio anteriormente citado, realizado por Orth y colaboradores se detallaron las ventajas de utilizar la tróclea lateral contra los cóndilos femorales en un estudio realizado en borregos (16). Estudios en humanos revelan la relevancia de la biomecánica en procesos de osteoartritis, es por esta razón que se determinó cuidadosamente el sitio para realizar las lesiones experimentales.

Borotikar y Sheehan establecieron un modelo *in vivo* para comprensión de la mecánica de contacto en la articulación femoropatelar en humanos. La información adquirida fue a través de resonancia magnética dinámica y un programa de metodología computacional. En dicho estudio se determinó que la biomecánica tiene un papel principal en el proceso de osteoartritis de la articulación femoropatelar y es un primer paso para entender la patofisiología del dolor articular (66).

Cada vez es más claro que la diferenciación de las CTM está regulada por señales mecánicas, las fuerzas mecánicas generadas intrínsecamente dentro de las células y señales mecánicas extrínsecas provenientes del medio ambiente en el que se desarrollan las células, tienen un rol central determinando el futuro de las CTM (61).

En este estudio, las biopsias osteocondrales tomadas durante el segundo procedimiento quirúrgico permanecieron en Formalina buferada al 10% durante 24h y posteriormente se colocaron en una solución descalcificadora (Surgipath Decalcifier II, Leica), misma en la que permanecieron durante un periodo aproximado de 2 semanas y fueron evaluadas físicamente realizando pequeños cortes a través de la muestra hasta que el hueso subcondral fue suficientemente suave para que posible atravesarlo con una navaja de bisturí.

Schmitz y colaboradores utilizaron un proceso similar pero utilizando un descalcificador diferente y dejando las muestras por un periodo de 8 semanas, cambiando la solución semanalmente hasta realizar el montaje en parafina. La descalcificación con EDTA como la que fue utilizada en este estudio es ideal para la preservación de los proteoglicanos y la conservación e integridad del cartílago para su posterior análisis (34).

El tamaño de las lesiones, 15 mm de diámetro X 3 mm de profundidad, estuvo determinado por antecedentes de un estudio realizado en 2006 por Wilke y colaboradores, en los que se realizaron lesiones circulares de 15 mm de diámetro en la tróclea lateral del fémur, y en donde se trataron las lesiones con CTM y un pegamento a base de fibrina (11). En otro estudio realizado por Ibarra y colaboradores se realizaron lesiones de 8 mm de diámetro y se utilizó una técnica de reparación con un polímero de colágena sembrado con condrocitos (12). Sin embargo se ha descrito que lesiones menores a 8 mm puedan llegar a repararse de manera natural es por eso que el tamaño de la lesiones se ha establecido en 15 mm. Filardo y colaboradores También crearon lesiones osteocondrales de 15 mm en rodillas de cadáveres humanos en las que utilizó un pegamento de fibrina

para colocar polímeros en las lesiones y las expuso a un movimiento pasivo continuo para comprobar la relevancia de la fibrina en la integridad y estabilidad de los polímeros sometidos a dinámica (58), creando de esta manera un modelo que simula el estrés que genera la fricción y el impacto sobre las lesiones en un paciente en recuperación.

Inicialmente se hacían lesiones de 4-5 mm de diámetro las cuales se consideraban de tamaño crítico mínimo para no ocurriera una reparación propia del organismo, sin embargo con el paso del tiempo y diversos estudios el tamaño de las lesiones experimentales paso de 5 a 8 mm y hasta llegar a 15 mm considerando que este es el tamaño ideal de lesión para impedir una reparación propio del organismo y ser más precisos al realizar procedimientos de reparación condral (6). Al realizar el procedimiento artroscópico fue necesario crear una incisión de aproximadamente 1cm en la piel y cápsula para poder ingresar el instrumento con el que se realizarón las lesiones de 15 mm de diámetro, por esta razón mantener la presión dentro de la articulación y mantener la articulación distendida para una mejor visibilidad implicó un reto, sin embargo la disminución en la turbulencia generada por el flujo de fluido permitió que la implantación de los polímeros con células se llevara a cabo de una manera mas cuidadosa y sin tanto desprendimiento de células. Para sujetar dichos polímeros se utilizó un ancla biodegradable que promueve el crecimiento óseo alrededor de ella lo que provee mayor estabilidad al implante. En el presente estudio, 8 meses fueron suficientes para que las suturas biodegradables se desintegraran y los polímeros con células se integraran al tejido de reparación, sin embargo hay reportes que indican que 8 semanas son suficientes para que las suturas se degraden (44).

Wilke y colaboradores utilizaron gas helio para distender las articulaciones y colocar una combinación de fibrina con CTM, evitando así el desprendimiento de células por turbulencia de fluido, sin embargo se desconoce si el gas helio tuvo algún efecto nocivo para las células (11).

A los 8 meses post-implantación se realizó el segundo procedimiento artroscópico en el cual se evaluó macroscópicamente las características del tejido de reparación y se obtuvo una biopsia osteocondral de 8 mm de diametro de cada caballo, 5 controles de babilla derecha y 5 experimentales de babilla izquierda. Tanto las lesiones control como las experimentales se encontraban practicamente llenas de tejido de reparación aunque presentaban diferencias en calidad y apariencia, se consideró que 8 meses es un lapso de tiempo adecuado para la evaluación de la reparación de lesiones de 15 mm de diametro aunque el tiempo se podría extender a los 12 meses.

Una de las 4 tinciones realizadas fue la Tricrómica de Masson, con la cual se determino la presencia de colágena pero no se especificó su tipo, a la par de esta tinción se realizó la de Herovici la cual nos permite diferenciar la colágena madura o colágena tipo II de la inmadura o colágena tipo III. Las otras dos tinciones realizadas fueron Safranina – O y Azul de Toloudina las cuales fueron hechas para identificar la presencia de proteoglicanos así como glicosaminoglicanos, sin embargo con ninguna de estas se obtuvo una gran retención del colorante y por ende se determinó que la presencia de estas proteínas se vio disminuida por los procesos de fijación, descalcificación e inmersión en parafina, en los cuales se ha reportado con anterioridad que puede haber una perdida de hasta un 40% de estas proteínas al ser sometidas a estos procesos (34). Otro factor a tomar en cuenta en este proceso es que el método ideal de descalcificación de cartílago es el ácido etilendiaminotetracético ó EDTA y en este estudio se utilizó un producto comercial, (Surgipath Decalcifier II, Leica) el cual pudo haber influido en la integridad de las muestras (34,51).

Otros métodos diagnósticos que podrían enriquecer la evaluación de tejido de reparación son los de imagenología de alta resolución, como lo describen Kira Novakofski y colaboradores en un artículo de 2016. Los 3 principales métodos

utilizados para diagnóstico de OA son, radiografías, que aunque no es posible determinar el daño a cartílago articular, su interpretación se centra en evidenciar cambios en hueso subcondral, tomografía computarizada y resonancia magnética, con los cuales se pueden diagnosticar eficazmente en la matriz del cartílago articular. Otra prueba altamente específica que se puede realizar en un resonador es la cuantificación de macromoléculas mediante medición de intercambios químicos entre las largas cadenas de glicosaminoglicanos existentes en la matriz extracelular del cartílago (65).

Debido a que en este estudio los caballos en los que fue realizado el estudio no fueron eutanasiados, realizar pruebas más específicas como CT y MRI resulta imposible por el momento en México. Y debido a que la evaluación mediante observación artroscópica y análisis de biopsias de cartílago resulta muy específica y brinda información altamente detallada, estas opciones fueron descartadas.

Durante los procesos rutinarios de fijación de los tejidos, de 15 – 20% de los proteoglicanos se pueden perder. La descalcificación está asociada a la extracción de proteoglicanos (34).

X. CONCLUSIONES

Tanto el grupo control como el experimental demostraron presencia de fibrocartilago y colágena II en el tejido de reparación sin embargo fue en diferente cantidad. Existe evidencia estadística significativa en la evaluación del tejido por escala de puntuación ICRS, para decir que el tejido del grupo experimental es de mejor calidad que el tejido en las lesiones control. Ninguno de los estudios recientes en los que se han utilizado diferentes técnicas de reparación articular, ha demostrado ser completamente efectivo para obtener una completa regeneración del cartilago articular.

Las células troncales mesenquimales diferenciadas y sembradas en polímeros biodegradables de ácido poliglicólico resultó ser un método favorable para promover la reparación de lesiones osteocondrales.

Las debilidades de este estudio incluyen un número reducido de animales, un seguimiento postquirúrgico relativamente corto y una mejor selección de técnicas de procesamiento de tejidos en laboratorio. Las fortalezas de este estudio radican en la habilidad para aislar, caracterizar y diferenciar células mesenquimales autólogas derivadas de médula ósea para ser sembradas en polímeros biodegradables sintéticos y poder ser satisfactoriamente implantados artroscópicamente en lesiones articulares experimentales, demostrando así los beneficios de la utilización de CTM autólogas diferenciadas y de limitar el proceso a solo un procedimiento quirúrgico y anestésico para reparación de cartilago articular.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mike W. Ross, Sue J. Dyson. *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. Saunders. USA. 2003.
2. M. J. López y J. Jarazo. State of the art: stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Veterinary Journal*. 2014. ISSN 0425-1644.
3. David D. Frisbie. Future Directions in Treatment of Joint Disease in Horses. *Vet Clin Equine*. 21 (2005). 713-724
4. David D. Frisbie, Matthew C. Stewart. Cell-based Therapies for Equine Joint Disease. *Vet Clin Equine* 27 (2011). 335-349
5. L. Zheng, H. S. Fan, J. Sun, X. N. Chen, G. Wang, L. Zhang, Y. J. Fan X. D. Zhang. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells induced by collagen-based Hydrogel: An in vivo study. *J. Biomed Mater Res* 93A: 783-792, 2010.
6. David D. Frisbie. Practical Description of Equine and Rabbit Models. 5th ICRS Laboratory Skills Course for Translational Science “Animal Models”. Course lectures. Colorado State University. 2014
7. Wayne C. McIlwraith. Overview of Cartilage Resurfacing Models. 5th ICRS Laboratory Skills Course for Translational Science “Animal Models”. Course lectures. Colorado State University. 2014
8. Wayne C. McIlwraith, Alan J. Nixon, Ian M. Wright and K. Josef Boening. *Diagnostic and Surgical Arthroscopy in the Horse*. Third edition. Elsevier. 2005 Chapter 6
9. Lauren V. Schnabel, Lisa A. Fortier, C. Wayne McIlwraith, Karl M. Nobert. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *The Veterinary journal*. 197 (2013) 570-577.
10. Fortier, L.A., Potter, H.G., Rickey, E.J., Schnabel, L.V., Foo, L.F., Chong, L.R., Stokol, T., Cheetham, J., Nixon, A.J., Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture

in the equine model. *The Journal of Bone and Joint surgery: American* 92, 1927-1937. 2010.

11. Wilke, M.M., Nydam, D.V., Nixon, A.J., 2007. Enhanced early chondrogenesis in articular defects following arthroscopic mesenchymal stem cell implantation in an equine model. *Journal of Orthopaedic Research* 25, 913-925.
12. Clemente Ibarra, Aldo Izaguirre, Enrique Villalobos, Maria Masri, German lombardero. Et al. Follow-up of a New arthroscopic technique for Implantation of Matrix-Encapsulated Autologous Chondrocytes in the Knee. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol 30, No 6 (June), 2014: pp 715-723
13. Klaus E. Kuettner, Rudolf Schleyerbach, Vincent C. Hascall. *Articular Cartilage Biochemistry*. Workshop Conference Hoechst-Werk Albert. Raven Press. New York, September 1985.
14. M. P. J. van den Bome, N.J.H. Raijmakers, et.al. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte Implantation (ACI) and microfracture. *Osteoarthritis and Cartilage* (2007) 15, 1397-1402.
15. Alan J. Nixon, Lisa A. Fortier. *New Horizons in Articular Cartilage Repair*. AAEP Proceedings. Vol. 47 (2001) 217-226.
16. Patrick Orth, Heinz-Lothar Meyer, et al. Improved Repair of Chondral and Osteochondral Defects in the Ovine Trochlea Compared with the Medial Condyle. *Journal of Orthopaedic Research*. November (2013) 1772-1779.
17. Van der Kraan PM, Buma P, et al. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular Cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10:631-637
18. Geneser F. *Histología sobre bases moleculares*. 3a ed. Argentina:Editorial Médica Panamericana, 2000.
19. Peter G. Alexander, Heidi R Hofer, Karen L Clark and Rocky S.Tuan. *Mesenchymal Stem Cells in Musculoskeletal Tissue Engineering*. Principles of Tissue Engineering. Elsevier. 2014: 1171-1190

20. Ulrich N, Lars Rackwitz, Andre F. Steinert, Rocky S. Tuan. Principles of Tissue engineering and cell- and gene-based therapy. The scientific Basis of Rheumatic Disease. 160-164
21. Allison A. Worster, Brent D Brower-Toland, Lisa A. Fortier, et al. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor- β 1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. Journal of Orthopaedic Research 19 (2001) 738-749
22. Flores E. Detección de colágena tipo II, agrecano, Sox 9 y colágena tipo I, análisis molecular comparativo de cartílago articular normal y condrocitos en dos tipos de cultivo primario. Tesis de Maestría. 2008 FMVZ- UNAM. México.
23. Hayes DW Jr, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury and repair. Clinics in Podiatry Medicine & Surgery 2001: 18(1): 35-53
24. Fawcett DW. Cartílago. En: Tratado de Histología. 12a ed. Madrid: Ed. Interamericana McGraw-Hill, 1995: 203-215.
25. Goodrich R. Nixon J. Medical treatment of osteoarthritis in the horse – A review The Veterinary Journal. 2006. 171:51–69.
26. Geneser F. Tejido esquelético. En: Histología. 2ª ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 1993: 200-205.
27. Angulo J. Cartílago articular, degeneración y reparación. Tesis 1999. Facultad de Medicina U.N.A.M.
28. J. Saucedo. El Cartílago Articular.
29. Richard D Mitchell. Stifle Lameness in the Athletic Horse. Focus on Lameness and Imaging. Fort Collins, Colorado. AAEP, 2007
30. Gartner LP and Hiatt JL. Color atlas of histology. 2nd ed. Baltimore USA: Williams & Wilkins, 1994.
31. Masri M. Función del Cartílago Articular. Jornadas internacionales de cirugía veterinaria (SECIVE). Barcelona del 11 al 12 de noviembre del 2006.

32. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Research* 2002; 4 (suppl 3): 63-68.
33. Temenoff JS and Mikos AG. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 2000; 21(5): 431-440.
34. N. Schmitz, S. Laverty, V. B. Kraus, T. Aigner. Basic methods in histopathology of joint tissues. *Osteoarthritis and Cartilage* 18 (2010) S113 – S116.
35. McIlwraith, C.W., Current concepts in equine degenerative joint disease. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 1982. 180: 239–250.
36. K. L. Camplejohn and S. A. Allard. Limitations of safranin O staining in proteoglycan-depleted cartilage demonstrated with monoclonal antibodies. *Histochemistry* (1988) 89:185-188.
37. Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (First Part). *The England Journal of Medicine* 1974a; 291(24): 1285-1292
38. Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (Second Part). *The England Journal of Medicine* 1974b; 291(25): 1335-1340
39. Van der Kraan PM, Buma P, Van Kuppevelt T, Van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular Cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10: 631-637.
40. Jeyapradha Duraiyan, Rejeshwar Govindarajan, et.al. Applications of immunohistochemistry *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*. 2012 Aug; 4(Suppl 2): S307-S309
41. R. D. Lillie, R. E. Tracy, et.al. Differential staining of collagen types in paraffin sections: A color change in degraded forms. *Virchows Archiv A*. April 1980, Vol. 386, issue 2, pp 153 – 159
42. McIlwraith WC TG. *Joint Disease in the Horse*. Philadelphia: WB Saunders; 1996.
43. Maria Masri Daba. PhD Thesis: Evaluación Morfológica y Molecular de la Reparación Experimental de Lesiones de Cartílago Articular Empleando

Técnicas de Ingeniería de Tejidos y Terapia Génica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2006

44. José Germán Lombardero Goldaracena. Master in Science Thesis: Evaluación por Resonancia Magnética, Artroscopía e Histología de Defectos Condrales en Caballos, Reparados Mediante Técnicas de Ingeniería de Tejidos. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 2005
45. María Masri, Germán Lombardero, Clemente Ibarra, et. al. Matrix-Encapsulation Cell-Seeding Technique to Prevent cell Detachment During Arthroscopic Implantation of Matrix-Induced Autologous Chondrocytes. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol 23, No 8 (August), 2007: pp 877-883
46. Dori L. Borjesson, John F. Peroni. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. *Clin Lab Med*, 31,(2011) 109-123.
47. Broeckx Sarah, Zimmerman Marieke, Crocetti Sara, et. al. Regenerative Therapies for Equine Degenerative Joint Disease: A Preliminary Study. *PLOS ONE*. January 2014, Volume 9, issue 1, e85917
48. Adams M. K., Goodrich L. R., Rao S., et al. Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells (BMDMSCS) from the Ilium and Sternum: Are there Differences? *Equine Veterinary Journal*. 45 (2013) 372-375
49. Byoung-Hyun Min, Woo Hee Choi, Yu Sang Lee, et al. Effect of Different Bone Marrow Stimulation Techniques (BSTs) on MSCs Mobilization. *Journal of Orthopaedic Research*. November 2013. 31:1814-1819
50. Fortier L. A., Sundman E. A., Cole B. J. Biologic Therapy for Joint Disease Platelet-Rich Plasma, Inteleukin-1 Receptor Antagonist Protein/Autologous Condition Serum, and Bone Marrow Aspirate. *AAEP Proceedings*. Vol. 57. 2011.
51. Erggelet C., Endres M., Neumann K., et al. Formation of Cartilage Repair Tissue in Articular Cartilage Defects Pretreated with Microfracture and

Covered with Cell-Free Polymer-Based Implants. *Journal of Orthopaedic Research*. October 2009. 27:1353-1360.

52. Gratz K. R., Wong V. W., Chen A. C., et al. Biomechanical assessment of tissue retrieved after in vivo cartilage defect repair: tensile modulus of repair tissue and integration with host cartilage. *Journal of Biomechanics* 39 (2006) 138-146
53. Abrams G. D., Mall N. A., Fortier L. A., et al. BioCartilage: Background and Operative Technique. *Operative Techniques in Sports Medicine*. 21:116-124. 2013.
54. Yuan X. L., Meng H. Y., Wang Y. C., et al. Bone—Cartilage interface crosstalk in osteoarthritis: potential pathways and future therapeutic strategies. *Osteoarthritis and Cartilage* 22 (2014) 1077 – 1089.
55. Elmorsy S., Funakoshi T., Sasazawa F., et al. Chondroprotective effects of high-molecular-weight cross-linked hyaluronic acid in a rabbit knee osteoarthritis model. *Osteoarthritis and Cartilage* 22 (2014) 121 – 127.
56. Steinert A. F., Noth U., Tuan R. S., Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury, Int. J. Care Injured* (2008) 3951, S97 – S113.
57. McIlwraith C. W., Frisbie D. D., Rodkey W. G., et al. Evaluation of Intra-Articular Mesenchymal Stem Cells to Augment Healing of Microfractured Chondral Defects. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery*, Vol 27, No 11 (November), 2011: pp 1552 – 1561.
58. Filardo G., Drobnic M., Perdisa F., et al. Fibrin glue improves osteochondral scaffold fixation: study on the human cadaveric knee exposed to continuous passive motion. *Osteoarthritis and Cartilage* 22 (2014) 557 – 565.
59. Kawcak C. E. Review of Physiology Modifiers: Hyaluronan, Polysulfated Glycosaminoglycan, and Tiludronate. *AAEP Proceedings*. Vol. 57, November 18 – 22, 2011.
60. Van den Borne M. P. J., Raijmakers N. J. H., Vanlauwe J., et al. International Cartilage Repair Society (ICRS) and Oswestry macroscopic cartilage evaluation scores validated for use in Autologous Chondrocyte

Implantation (ACI) and Microfracture. *Osteoarthritis and Cartilage* (2007)15, 1397 – 1402.

61. Kelly D. J., Jacobs C. R. The Role of Mechanical Signals in Regulating Chondrogenesis and Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *Birth Defects Research (Part C)* 90: 75 – 85 (2010)
62. Janjanin S., Wan-Ju L., Morgan M. T., et al. Mold-Shaped, Nanofiber Scaffold-Based Cartilage Engineering Using Human Mesenchymal Stem Cells and Bioreactor. *Journal of Surgical Research* 149, 47 – 56 (2008).
63. Lam J., Lu S., Lee., et al. Osteochondral defect Repair using bilayered hydrogels encapsulating both chondrogenically and osteogenically pre-differentiated mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Osteoarthritis and Cartilage* 22 (2014) 1291 – 1300.
64. Jiashen Li., Yun Chen., Mak A. F. T., et al. A one-step method to fabricate PLLA scaffolds with deposition of bioactive hydroxyapatite and collagen using ice-based microporogens. *Acta Biomaterialia* 6 (2010) 2013-2019.
65. Novakofski K. D., Pownder S. L., Koff M. F., et al. High-Resolution Methods for Diagnosing Cartilage Damage *In Vivo*. *Cartilage* 2016, Vol. 7(1) 39-51.
66. Salgado R. M. Fundamentos de una tinción policrómica: Tinción de Herovici. *Investigación en Discapacidad*. Vol. 1, Núm. 1 Mayo-Agosto 2012 pp 35-36
67. Fitzgerald A. M. P., Kirkpatrick J. J. R., Foo I. T. H. et al. Human skin histology as demonstrated by Herovici's stain: a guide for the improvement of dermal substitutes for use with cultured keratinocytes? *Burns* Vol. 22, no. 3, pp. 200-202, 1996.
68. Dreir R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Research & Therapy*. 2010. 12:216
69. Man-Ger Sun M., Beier F. Chondrocyte Hypertrophy in Skeletal Development, Growth, and Disease. *Birt Defects Research (Part C)* 102:74-82, 2014.

- 70.** Roberts S., McCall I. W., Darby A. J., et al. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Research and Therapy* 2002; 5 (1): 60-73