



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INGENIERÍA DE TEJIDOS

**EVALUACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE TEJIDO CARTILAGINOSO
UTILIZANDO CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES DE ORIGEN
EQUINO SEMBRADAS SOBRE POLÍMEROS BIOCOMPATIBLES.**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA

Ricardo Gómez García

Tutor Principal:

Dr. Antonio Verdugo Rodríguez

COMITÉ TUTOR

Dr. Julio Granados Arriola

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y
DE LA SALUD ANIMAL

Ciudad Universitaria. Cd. Mx.

Enero 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi familia.

A mi Escorpión favorito que es una bendición que dios nos dio, me encanta pasar mi tiempo contigo hijito y enseñarte cosas nuevas, siempre estás en mis pensamientos.

A mi Pamelita hermosa por ser un apoyo con el cual siempre puedo contar, y una compañera versátil que siempre estás cuando me siento mal o he tenido días difíciles, cada día de mi vida es un descubrimiento nuevo contigo.

A mi madre Gloria Martha por todo lo que he aprendido contigo sobre cómo manejar situaciones difíciles y ser feliz en todo momento, me encanta tu libro, estoy muy orgulloso de ser tu hijo y disfruto mucho los desayunos que nos haces y el cariño tan puro e inteligente que nos has mostrado a mi hermano y a mí. Por ser un pan; pero duro.

A mis Tutores y Maestros Dra. María Masri Daba un ejemplo a seguir siempre la he admirado y lo seguiré haciendo nunca voy a olvidar el primer día que platique con usted; sin usted no estaría en este campo y disciplina tan apasionante y lleno de retos. A la Dra. María Cristina Velasquillo Martínez por su tiempo y consejos; así como su colaboración, guía y apoyo en todos los proyectos que emprendemos. Al Dr. Julio Granados Arriola por ser tan encantador y enseñarme tanto sobre temas de investigación y cultura general, es un placer recibir sus comentarios siempre. Al Dr. José Clemente Ibarra Ponce de León que con solo platicar o realizar un comentario me llena de inquietudes y orgullo por ser su colaborador, siempre le estaré agradecido. Al Dr. Antonio Verdugo Rodríguez por enseñarme a guiar y apoyar a las nuevas generaciones de personas que estarán a mi cargo lo cual me falta desarrollar y nunca dejar de aprender. Un agradecimiento especial al Dr. Luis Guillermo Ibarra Ibarra por su fortaleza y templanza al generar un proyecto increíble del cual siempre estaré admirado el INRLGII; descanse en paz.

A mis amigos y compañeros que día con día convivimos, trabajamos, nos peleamos, nos reconciamos, nos divertimos, ganamos, perdemos, de todos y cada uno he aprendido algo en especial de ti Batman. Valentín, Carlitos, Julieta, Rocío, David, Fernando Best, Phaedra, Roberto, Carmen, mi angelito de los reactivos Xochitl, Carmina, Juliane que siempre está ahí, mis primos consentidos que siempre los tengo al lado Danny y Cocoy, a mi hermanito Arturo, al Dr. Berebichez, al Dr. Montero y al Dr. Granados. Un Gallito Primo!! jejejeje

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los involucrados desde el mantenimiento de las instalaciones de la Universidad Nacional Autónoma de México, el personal involucrado en el cuidado y manejo de los caballos que nos ayudaron con sus muestras y su organismo para poder generar una mejor calidad de vida sus congéneres y desde luego por ser un modelo validado para lesiones articulares en humanos en los cuales se podrá generar un nuevo tratamiento respecto a la regeneración del cartílago articular.

Agradezco al Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra por existir y generar investigación de punta en el área de ingeniería de tejidos y rehabilitación para pacientes desde luego equipo sin el cual no se hubieran realizado las pruebas, cultivos y análisis que componen este trabajo.

Desde luego un agradecimiento al Gobierno de México por otorgar los financiamientos para este estudio.

SECITI 086/2013, PAPIIT 1T201712, IN225316

RESUMEN

La ingeniería de tejidos combina los conocimientos tanto de la biología celular como de la ingeniería de materiales, con la finalidad de generar neotejidos que asemejen la estructura y las características de los tejidos nativos, tal es el caso de cartílago articular. En este proyecto se compararon dos polímeros tridimensionales biocompatibles contruidos con células troncales mesenquimales (CTMs), cuantificando y comparando su similitud al cartílago hialino nativo mediante la detección de marcadores de linaje condral, con el objetivo de determinar cuál de éstos favorece la condrogénesis. Se aislaron y caracterizaron CTMs de médula ósea 12 caballos, mediante la evaluación de sus marcadores de superficie CD90, CD73, CD105, CD45, CD34 y CD14 y con la realización de cultivos de diferenciación a linaje condral, óseo y adiposo. Las construcciones fueron realizadas con dos tipos de andamios: 1) un polímero biológico fabricado a partir de colágeno (Col I) y 2) otro sintético fabricado a partir de Ácido poliglicólico (PGA). Los marcadores de linaje condral fueron analizados por inmunofluorescencia y en las células aisladas, estos también fueron detectados posterior al estímulo de diferenciación condral en cultivo, mostrando características propias de linajes condral, óseo y adiposo. Se elaboraron construcciones condrales *in vitro* para analizar y cuantificar la presencia de marcadores Sox9, Colágena tipo II y Agrecano de diferenciación condral. No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los polímeros. Las construcciones fueron implantadas dentro de ratones atímicos, los cuales fueron extraídos 4 semanas después. Las construcciones de realizadas con PGA resultaron ser más similares a los testigos de cartílago hialino que las construcciones elaboradas con colágeno. Con este estudio se demostró que es posible generar construcciones tridimensionales *in vitro* con características similares al tejido nativo, siendo analizadas por inmunofluorescencia. La evidencia confirma, con el modelo de ratón atímico, que las construcciones generadas con el polímero de PGA son más similares a los testigos de cartílago hialino que las construcciones elaboradas con colágeno. El polímero de PGA es el candidato ideal para utilizarlo en proyectos subsecuentes para generar construcciones cartilaginosas para la regeneración de cartílago hialino articular en un modelo *in vivo* de lesión condral inducida.

Palabras clave: Células Troncales Mesenquimales, Cartílago, Polímeros Biocompatibles.

ABSTRACT

Tissue engineering combines knowledge from both cell biology and material engineering to generate neotissues that resemble the structure and characteristics of native tissue, i.e. chondral tissue. In this work, we detected chondral lineage markers in constructs generated using bone-marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs), on two biocompatible three-dimensional polymers, to quantify and to compare them against native hyaline cartilage and determining which of the polymers favor chondrogenesis. BMMSCs from 12 horses were isolated and characterized by evaluating CD90, CD73, CD105, CD45, CD34 and CD14 surface markers and differentiation cultures to chondral, bony and adipose lineage. The constructs were generated using cells from two types of scaffolds: 1) a biological polymer made from collagen (Col I) and, 2) a synthetic polymer made from polyglycolic acid (PGA). Following histological analysis and immunofluorescence, MSCs chondral lineage markers from the isolated cells were detected. When stimulated in culture, these MSCs showed characteristics of chondral, bony and adipose lineages. *In vitro* chondral constructs were elaborated to analyze and to quantify the presence of Sox9, Collagen type II γ Aggrecan chondral markers. No statistically significant difference between both polymers was found. These constructs were implanted inside athymic mice to analyze the chondral neotissues after 4 weeks of implantation. When excised, the PGA constructs were the most similar to hyaline cartilage when compared to those elaborated with collagen. This study shows that it is possible to isolate and characterize MSCs from the equine bone marrow. It is also possible to generate *in vitro* three-dimensional constructs which have characteristics of cartilaginous tissue, as demonstrated by immunofluorescence. Evidence shows that the PGA polymer is the ideal candidate for use in a follow-up project to generate cartilage constructs for regeneration of articular hyaline cartilage in an *in vivo* model of induced chondral injury.

Key words: Mesenchymal Stem Cells, Cartilage, Biocompatible Polymers.

Contenido	Página
Capítulo I Resumen_____	5
Capítulo II Abstract_____	6
Abreviaturas_____	10
Capítulo III Introducción_____	11
Anatomía_____	15
Función_____	16
Estructura_____	16
Condrocitos_____	19
Matriz Extracelular_____	20
Lesiones en el Cartilago Articular	
Lesiones Traumáticas_____	22
Osteoartritis Secundaria_____	23
Tecnicas de Reparación	
Conservador_____	23
Quirúrgico_____	24
Ingeniería de Tejidos (Cartílago Articular)	
Polímeros_____	24
Células Condrales_____	27
Células Troncales Mesenquimales_____	28
Capítulo IV Material y Métodos_____	32
Obtención y Caracterización de Células Troncales Mesenquimales_____	32
Generación de Construcciones Celulares y Análisis <i>in vitro</i> _____	33
Modelo de Ratón Atímico y Análisis de Neotejido_____	34
Capítulo V Resultados_____	36
Capítulo VI Discusión y Conclusiones_____	47
Referencias_____	52
Anexos_____	61

Lista de Cuadros y Gráficas**Página**

Gráfica 1. Marcadores de células mesenquimales durante la fase de cultivo_____	37
Gráfica 2. Representación gráfica del número de células sobre los polímeros_____	41
Gráfica 3. Análisis de varianza de la expresión de marcadores condrales _____	46
Cuadro 1. Análisis de la expresión del marcador CD105_____	64
Cuadro 2. Análisis de la expresión del marcador CD73_____	64
Cuadro 3. Análisis de la expresión del marcador CD90_____	65
Cuadro 4. Análisis de la expresión del marcador CD45_____	65
Cuadro 5. Análisis de la expresión del marcador CD34_____	66
Cuadro 6. Análisis de la expresión del marcador CD14_____	66
Cuadro 7. Anexo Gráfica 2. Número de células sembradas_____	67
Cuadro 8. Anexo Gráfica 3. Análisis de marcadores condrales PGA_____	68
Cuadro 9. Anexo Gráfica 3. Análisis de marcadores condrales Colágena_____	69

Lista de Figuras**Página**

Figura 1. Ubicación de cartílago articular en la articulación de la babilla_____	16
Figura 2. Zonas de cartílago_____	17
Figura 3. Micrografía confocal mostrando células osteoblásticas_____	26
Figura 4. Histogramas obtenidos por los análisis de citometría de flujo_____	36
Figura 5. Morfología de las células_____	38
Figura 6. Tinciones de cultivos en monocapa_____	39
Figura 7. Inmunofluorescencias para cultivos en monocapa_____	39
Figura 8. Comparación de dos polímeros_____	41
Figura 9. Tinciones de las construcciones y control_____	43
Figura 10. Análisis de Inmunofluorescencia de marcadores condrales_____	44
Figura 11. Comparación histológica de los neotejidos_____	45
Figura 12. Análisis de Inmunofluorescencia de los neotejidos_____	46

Abreviaturas y Siglas Usadas

CD	Cluster Differentiation
Coll	Colágeno
PGA	Ácido poliglicólico
Ch	Cartílago hialino
OA	Osteoartritis
CTM	Células troncales mesenquimales
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
IL-1 β	Interleucina-1 β
AINES	Antiinflamatorios no esteroideos
MSM	Metil-sulfonil-metano
GAG	Glucosaminoglucanos
HA	Hidroxiapatita
TCP	Fosfato tricálcico
PLLA	Poliestireno-ácido poli-L-láctico
PLGA	Poli-dl-láctico-co-glicólico
Hial	Ácido hialurónico
Al	Alginato
Qn	Quitano
ACI	Implante de condrocitos autólogos
TGF β 1	Factor de crecimiento transformante beta 1
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
PDG	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
BrdU	5-bromo-2-desoximidina

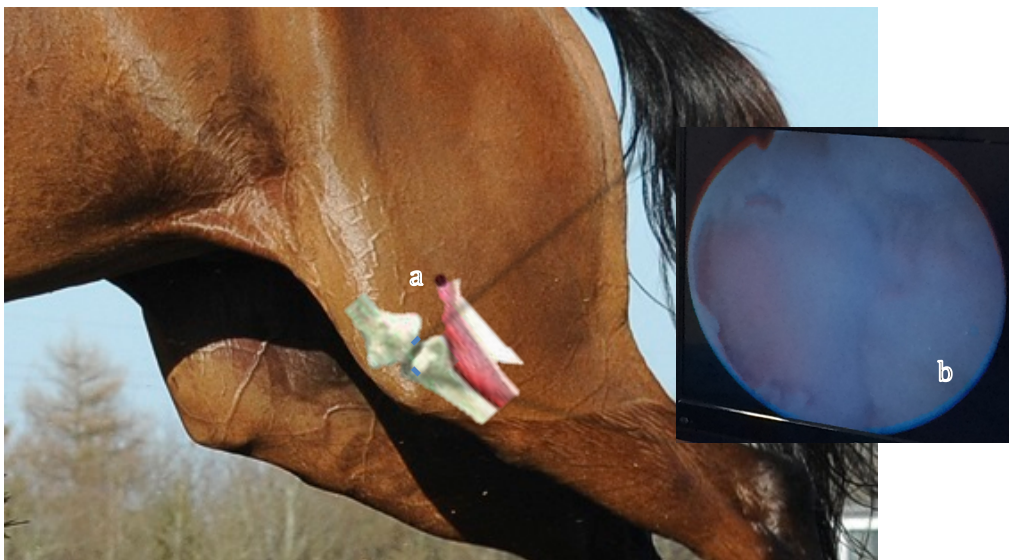
Introducción

El cartílago hialino (Ch) es un tejido conjuntivo hipocelular que se encuentra recubriendo la superficie articular en la cual forma una capa de aproximadamente 5 mm de espesor, cubriendo los extremos de los huesos móviles (1). Este tejido forma una superficie color blanco nacarada, vítrea y translúcida que, por su contenido de proteoglicanos y colágeno, confiere a los extremos óseos que forman la articulación una capacidad de movimiento con un índice de fricción muy bajo. Puede soportar cargas equivalentes a, aproximadamente, de cinco a siete veces el peso corporal. Por otra parte, al ser aneural y avascular, el cartílago articular obtiene sus nutrientes del líquido sinovial y del sistema circulatorio de la placa de hueso subcondral.

En las articulaciones encargadas de recibir impactos, como las rodillas por ejemplo formadas por la articulación de huesos largos, el cartílago hialino representa una parte estructural esencial ya que es el responsable de distribuir y absorber las cargas generadas por el peso del cuerpo. Si se supera la carga en el cartílago pueden generarse lesiones traumáticas las cuales predisponen al desarrollo de la enfermedad articular degenerativa u osteoartritis (OA) (2). Parte del problema se ocasiona debido a que los condrocitos al sufrir un estrés, comienzan a producir enzimas proteolíticas degradando la matriz condral; y debido a que el proceso de degradación es generado de manera más eficaz que el proceso de producción de matriz condral, sobre la superficie articular comienza a generarse una perforación la cual da lugar al progreso de enfermedad articular degenerativa (3).

La matriz extracelular en el cartílago hialino es producida por los condrocitos, estas células expresan un factor de transcripción denominado Sox 9 que a su vez promueve en el condrocito la expresión de colágeno tipo II una de las principales proteínas estructurales en la matriz extracelular del cartílago y agregano un proteoglicano que de la misma manera juega un papel importante en la resistencia biomecánica del cartílago articular (4) (5).

Al ocurrir una lesión en la superficie del cartílago articular se desencadena un proceso inflamatorio lo que genera un cambio en el microambiente de la articulación favoreciendo la degradación de la matriz extracelular (6), lo cual genera un desgaste paulatino de la superficie derivando finalmente en OA. Para reducir el proceso de inflamación en una lesión articular existen tratamientos farmacológicos; así mismo para tratar de recubrir las lesiones de la superficie articular existen los tratamientos quirúrgicos, sin embargo, ninguno está enfocado en la regeneración del tejido condral lesionado.



<http://www.horseadvice.com/horse/messages/4/156273.html>

Figura 1. Ubicación de cartílago articular en la articulación de la babilla, que es el final del fémur, la parte superior de la tibia y la parte posterior de la rótula. (a) localización externa de la articulación. (b) vista artroscópica del cartílago articular.

Función del cartílago articular

El cartílago articular tiene dos funciones principalmente, El tejido sirve como un soporte de carga, debido a que es un material elástico es responsable de resistir las fuerzas de compresión y la distribución de carga, minimizando de este modo el estrés en el hueso subcondral. También tiene un papel importante en la disminución de la fricción entre los huesos que unen, ayudado por el líquido sinovial (6,7).

Estructura del cartílago articular

El cartílago articular se puede subdividir en cuatro zonas de capas horizontales dependiendo de la alineación de las fibras de colágeno; esta orientación da a cada zona en particular ventajas biomecánicas para resistir el estrés del movimiento.

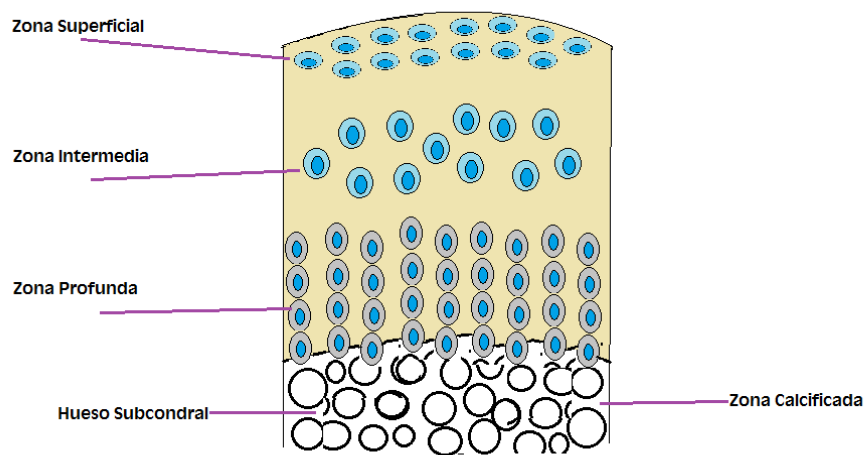


Figura 2. En esta imagen se pueden observar las diferentes zonas que componen el cartílago articular; los condrocitos, varían en la forma, la densidad, la actividad metabólica dependiendo la zona en la cual se localizan (5,8).

Zona Superficial (tangencial)

La zona superficial es la zona más delgada de cartílago articular (10 a 20% del total volumen de cartílago) y contiene un número relativamente alto de los condrocitos aplanadas (9). Esta zona tiene el mayor contenido de agua, relativamente bajo contenido de proteoglicanos, y densamente fibras empaquetadas de colágeno (10). Esta zona consiste en dos capas de colágeno. La primera capa, conocida como la lámina splendens, se compone de red de colágeno dentro de ella es comprometida de los haces de colágeno entrelazadas únicos dispuestos paralelos entre sí para dar al tejido sus propiedades mecánicas (11,12).

La segunda capa de fibras de colágeno es alineado perpendicular a la superficie articular. Esta organización específica de la zona superficial influye en las propiedades mecánicas de los tejidos y también puede actuar como una barrera para el paso de grandes moléculas a partir de líquido sinovial de cartílago.

Zona intermedia (De transición)

La zona media (zona de transición) contiene 40 a 60% del volumen total del cartílago. Esta zona compone de condrocitos esféricas rodeadas por matriz extracelular. Las fibras de colágeno son más gruesas y organizado de forma aleatoria con una baja densidad de condrocitos, y el contenido de proteoglicanos se incrementa. Mecánicamente, esta zona es resistente a la compresión.

Zona Profunda (radial)

En la zona profunda (zona radial, 30% del volumen total del cartílago), los condrocitos se disponen principalmente en columnas, y el volumen de la celda está en su nivel más bajo. Esta zona ofrece la mayor resistencia a fuerzas de compresión, dado que las fibras de colágeno se encuentran organizadas perpendicularmente respecto a la superficie. El contenido de proteoglicanos es el más alto y el contenido de agua es el más bajo. Esta parte contiene las fibras de colágeno más grandes en diámetro.

Zona calcificada

Actúa como un ancla entre el cartílago articular y el hueso subcondral. Esta zona se caracteriza por que los condrocitos tienen forma esférica y están localizados en lagunas sin proteoglicanos. Las fibras de colágeno se disponen perpendiculares a la superficie articular y son de mayor diámetro (11). Desde el cartílago, las fuerzas dinámicas se transmiten al hueso subcondral (13).

Marca de Agua (tidemark)

La marca de agua que es una línea ondulada e irregular que separa la zona profunda (no calcificada) de la zona calcificada (Figura 2). Desempeña un papel crucial en la transmisión de las fuerzas mecánicas en el hueso subcondral (14). La línea de transición funciona como mecanismo de división entre el hueso y el cartílago; existen pequeños huecos en la línea de transición; éstos con la intención de proporcionar nutrientes (15). En la osteoartritis, el área de marca de agua se encuentra aumentada y comienza a generarse neovascularización en la zona la cual penetra a través de la marca de agua (16).

La matriz extracelular

Dependiendo del tipo de organización de las proteínas y distribución de proteoglicanos alrededor de los condrocitos, la matriz extracelular se puede subdividir en la pericelular, territorial e interterritorial alrededor de cada uno de los condrocitos (5,17,18).

Los condrocitos en cada capa están rodeados circunferencialmente por un 2-3 micras de matriz pericelular la cual es abundante en ácido hialurónico, tipo II, VI, IX y XI y colágeno proteoglicanos tales como agregano, decorina y biglicano (19-21). En esta matriz se protege al condrocito de manera directa durante la carga fisiológica. El condrocito junto con su microambiente generado por la matriz extracelular se denomina "condron" (22). Ross et al. (23) introdujo las morfologías de los condrones simples y dobles. Para la expansión de condrocitos, es necesario la modificación o remodelación de la matriz extracelular, esta remodelación consta de 3 fases.

En la fase I, colágeno y agrecano se destruyen por metaloproteinasas de la matriz (MMP) y agrecanasas ayudada por la expansión hidrodinámica del condrocito. Durante la fase II El colágeno fibrilar es abatido por la división de la célula progenitora condral y se da el inchamiento de la matriz extracelular. La fase III se da con la migración del condrocito propiamente. En suma, la iniciación y progresión de la remodelación del condron se asocia con los primeros acontecimientos en el proceso de artrosis (6).

La región territorial rodea la matriz pericelular y consta de fibras de colágeno de mayor diámetro cerca las cuales se unen a la matriz pericelular. Estas fibras se disponen de manera radial (6) y la concentración de proteoglicanos sulfatados es alta (condroitin sulfato) (24). La matriz interterritorial tiene fibras de colágeno de mayor diámetro que las de la matriz territorial y tiene una mayor concentración de proteoglicanos (queratán sulfato) (24).

El colágeno

Este tipo de proteína, constituye aproximadamente el 60% del cartílago articular. La resistencia del cartílago depende las fibras de colágeno entrelazadas y de los cambios producidos en la arquitectura fibrilar.

El principal tipo de colágeno en el cartílago articular es el de tipo II y constituye entre el 90 a 95% del colágeno del cartílago sin embargo colágenos de tipo III, VI, IX, X, XI, XII y XIV contribuyen a dar estructura a la matriz condral (25,26).

Proteoglicanos

Los proteoglicanos, son moléculas formadas de una proteína, ácido hialurónico (ácido hialurónico), con múltiples subunidades de glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos incluyen condroitina-4-sulfato, condroitin-6-sulfato y queratan sulfato (27). Los proteoglicanos forman el 90% de la masa total en el cartílago; sus polisacaridos de cadena larga con carga negativa son capaces de retener agua dentro del tejido (presión osmótica) lo cual ayuda a resistir la compresión.

Los proteoglicanos como el biglicano, decorina y fibromodulina constituyen el 3 % de la masa total del cartílago y ayudan a la estabilización del tejido. Durante los procesos inflamatorios la estructura del proteoglicano se desintegra lo cual inhibe su capacidad para la retención de agua, esto conduce a la ruptura progresiva de la red de colágeno finalizando con la exposición del hueso subcondral, causando dolor y discapacidad.(28)

IV. El cartílago articular Lesiones

Las lesiones de cartílago articular son debidas generalmente por inestabilidad articular debida ligamentos o lesiones en menisco (29,31) Dependiendo de la lesión extensión y localización en ocasiones las lesiones se recuperan sin ninguna intervención; Sin embargo, nunca se ha informado que la regeneración del cartílago hialino es estable.

Lesiones traumáticas y artrosis secundaria (OA)

Al ocurrir una lesión los condrocitos e inicialmente las células sinoviales (sinoviocitos) liberan citoquinas pro-inflamatorias (factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y la interleucina- 1β (IL- 1β), quimiocinas y mediadores catabólicos (metaloproteinasas de la matriz (MMPs)) (32-34). TNF- α y la IL- 1β se liberan en el espacio interarticular iniciando la degradación de la matriz extracelular, deteniendo su síntesis (35,36). Además, la lesión traumática del cartílago genera un incremento en la apoptosis de las células condrales (37-39,8).

V. Regeneración del cartílago articular

Los condrocitos articulares reciben se nutren por los componentes embebidos en el líquido sinovial dado que es un tejido avascular, su capacidad intrínseca para la regeneración de su integridad en el caso de una lesión es limitada; por esta razón, las lesiones no pueden ser reparadas por los condrocitos y comúnmente las superficies articulares con lesiones, desencadenan enfermedad articular degenerativa (osteoartritis) si las lesiones o defectos no son tratados (40-42).

Las opciones de tratamiento para los defectos articulares producidos por una lesión son variados (30), sin embargo, se pueden englobar en dos tipos de tratamientos, el conservador y el quirúrgico.

Tratamiento conservador

Este tipo de tratamiento se considera cuando existe una lesión leve donde la cirugía se considera perjudicial. El objetivo del tratamiento conservador es reducir los síntomas, no reparar el daño. Varios enfoques no quirúrgicos pueden ser considerados dependiendo de la gravedad de la lesión del cartílago (43). El enfoque médico en el tratamiento conservador se fundamenta en el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINES), analgésicos, hormonas (estrógeno y hormona de crecimiento) son ejemplos de medicamentos.

El enfoque mecánico del tratamiento conservador consiste en utilizar aparatos ortopédicos, bastones, hielo, terapia física, el descanso, la pérdida de peso y nutrición; al suministrar nutrientes tales como la glucosamina y el sulfato de condroitina (56) metil-sulfonil-metano (MSM), Omega-3, calcio y vitaminas.

Tratamiento quirúrgico

Este tipo de tratamiento es invasivo y se enfoca en la eliminación de factores locales de la articulación que pueden predisponer a la lesión de la superficie articular o simplemente en reparar las zonas lesionadas de una superficie articular dañada. Así los procedimientos como el lavado y desbridamiento articular, artroplastia de abrasión, perforación subcondral, microfracturas, injerto osteocondral e implantación de células condrales autólogas son las opciones comúnmente usadas por los cirujanos para fomentar la regeneración de una superficie articular y reducir el progreso de la osteoartritis.

La Ingeniería de Tejidos es un campo multidisciplinario de investigación que combina los conocimientos de diferentes áreas de biología celular, molecular e ingeniería de materiales con la finalidad de generar neotejidos que puedan ser empleados para reparar, reconstruir o reemplazar la estructura o función de tejidos u órganos lesionados o ausentes.

Con el uso de nuevas técnicas para el tratamiento de las lesiones articulares, El potencial para la aplicación de diferentes técnicas de Ingeniería de Tejidos en el campo de la Ortopedia es una línea de investigación en desarrollo (44). Entre estas se incluye el uso de polímeros biodegradables y biocompatibles como hidrogeles, o cerámicas; el uso de células troncales mesenquimales y factores de crecimiento para estimular su diferenciación condral u ósea (45-49)

En 2007 una investigación llevada a cabo por Masri et al. (50) en la cual utilizó células condrales autólogas en un polímero compuesto de ácido poliglicólico y poliláctico permitió establecer que la técnica artroscópica es adecuada para la implantación de células autólogas; por otra parte en un estudio Lombardero et al. utilizando condrocitos autólogos en un polímero de colágena demostró que este polímero mejoraba la calidad del tejido de neoformación (51).

Al trabajar con condrocitos como células autólogas para la formación de cartílago requiere una cirugía previa para obtener una biopsia tejido condral, a partir de la cual se deben aislar las células que se cultivarán *in vitro*, para finalmente ser implantadas artroscópicamente. Una alternativa al uso de condrocitos autólogos es el uso de células troncales mesenquimales (CTM). Estas tienen mayor capacidad de proliferación y el potencial para diferenciarse en diversos tipos de células especializadas (52-54).

Las CTM se caracterizan por expresar marcadores positivos para CD29, CD44, CD59, CD73, CD90, CD105, CD117, CD166 y STRO-1 y negativos para CD11a, CD11b, CD14, CD33, CD34, CD28, CD45 (55,56) también se considera como característica de célula troncal la capacidad de adherencia de las células a las superficies de cultivo y una morfología semejante a los fibroblastos.

Por otro lado, es considerada su capacidad de autorenovación y la de generar células especializadas entre las cuales se encuentran células de linaje condral. Estas propiedades hacen a las células un candidato ideal para ser utilizadas con la ingeniería de tejidos para generar tejidos de reemplazo y regenerar el tejido lesionado (57).

En estudios previos llevados a cabo por nuestro equipo de investigación se demostró que las células precursoras obtenidas de sangre periférica y tejido adiposo de equino, suino y humano, al ser analizadas por medio de citometría de flujo exhiben marcadores de superficie específicos de células troncales (CD34, CD45, CD14, CD117, CD90, CD73) (58). Finalizando la etapa de diferenciación en los cultivos se encontraron marcadores tisulares específicos mostrando plasticidad hacia tejido nervioso, adiposo y condral (59).

VI. Polímeros en Ingeniería de tejidos

Los materiales biocompatibles inicialmente fueron desarrollados utilizados para generar dispositivos médicos destinados a la interacción biológica funcional en el organismo (60); actualmente el uso y desarrollo se dirige del mismo modo a la interacción con los sistemas biológicos para tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido u órgano del organismo; tomando en cuenta los procesos biológicos llevados a cabo por las células para promover la regeneración de tejidos.

Existe una gran variedad de materiales biocompatibles los cuales se han utilizado para generar repuestos biológicos, para lo cual independientemente del tipo de tejido, se toma en cuenta una serie de consideraciones clave importantes en el diseño o la determinación de la idoneidad de un andamio para el uso en la ingeniería de tejidos:

1.- Biocompatibilidad

Los materiales deben mantener la funcionalidad de las células, permitir su migración y proliferación (61); el andamio no debe poseer antigenicidad de tal manera que pueda reducir la regeneración del tejido lesionado o causar rechazo inmunológico.

2.- Biodegradable

El material debe permitir la acción del sistema inmune para generar su eliminación durante el tiempo necesario para que las células implantadas generen su propia matriz extracelular. Los subproductos de la degradación del material no deben ser tóxicos y deben ser eliminados con facilidad del organismo; la respuesta del organismo a los materiales significa un área de estudio novedosa que se encuentra en expansión (61).

3.- Propiedades mecánicas

El material a implantar debe tener propiedades mecánicas similares al sitio donde se planea implantar; ser lo suficientemente fuerte para permitir el manejo quirúrgico durante la implantación y poseer la estructura necesaria para funcionar desde el momento de la implantación hasta el momento del remplazo por matriz extracelular propia del tejido (62).

4.- Arquitectura

Los materiales deben generar andamios con porosidad y deben facilitar la conexión entre células, esto con la finalidad de facilitar la penetración celular y la difusión adecuada de nutrientes y así mismo facilitar la eliminación de los productos de desecho derivados de la degradación del mismo. Las células interactúan principalmente con andamios a través de grupos químicos (ligandos) en la superficie del material.

Los andamios sintetizados a partir de materiales extracelulares naturales (por ejemplo, colágeno) poseen naturalmente estos ligandos en la forma de Arg-Gly-Asp (RGD) secuencias de unión (Fig. 3), mientras que andamios hechos de materiales sintéticos pueden requerir la incorporación deliberada de estos ligandos mediante, por ejemplo, la adsorción de proteínas.

5.- Tecnología de elaboración

Los materiales y la síntesis de los andamios deben ser rentables de tal manera que sea posible incrementar la producción de los mismos si se incrementa su demanda a gran escala.

El desarrollo de procesos de elaboración fundamentados en las buenas prácticas de laboratorio es importante para garantizar la producción eficaz e inocua de los polímeros para ingeniería de tejidos. Otro factor es el producto final, el procedimiento con el cual se genera la entrega del producto y la logística que conlleva debe ser apegada a la seguridad de la construcción y su inocuidad enfocados siempre en la salud del paciente.

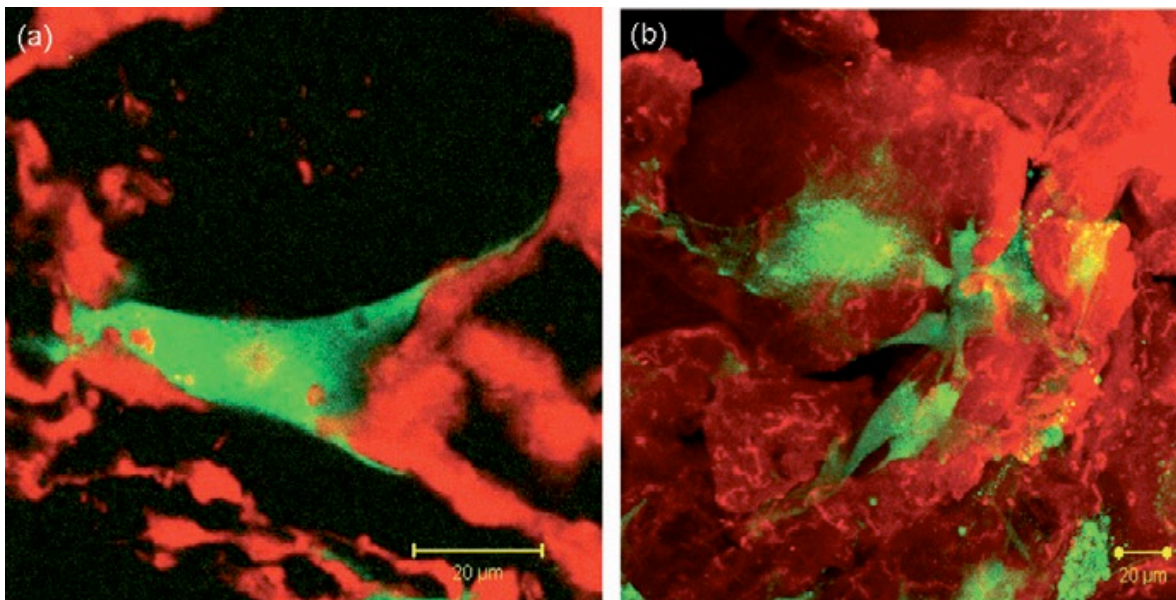


Figura 3. Micrografía confocal mostrando células osteoblásticas (verde) unidas a un andamio de colágeno-GAG altamente poroso (rojo). El mecanismo por el cual Células se unen a biomateriales y andamios para la ingeniería de tejidos es críticamente importante para la regeneración tisular exitosa.

Grupos de Biomateriales

Existen 3 grupos de biomateriales los cerámicos, los polímeros sintéticos y los polímeros biológicos. Cada uno de los grupos posee sus ventajas y desventajas. El estudio de cada grupo y sus combinaciones siguen siendo una línea de investigación que genera información para su aplicación clínica en la generación de tejidos específicos.

Los andamios cerámicos, como hidroxapatita (HA) y fosfato tricálcico (TCP), caracterizados típicamente por una alta rigidez mecánica se aplican para regeneración ósea, mejorando la diferenciación de osteoblastos y proliferación (63,64).

Los polímeros sintéticos se han usado en el intento de producir andamios incluyendo poliestireno, ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA) y poli-dl-láctico-co-glicólico (PLGA). Estos materiales pueden ser fabricados con una arquitectura específica similar a la matriz de los tejidos y sus características de degradación empatan con la producción de matriz por parte de las células implantadas (65-66).

Los polímeros de materiales biológicos como el colágeno (Col) y ácido hialurónico (Hial), junto con los sustratos a base de alginato (Al) y quitosano (Qn) se han utilizado en la producción de andamios para la ingeniería de tejidos. Estos polímeros biológicamente activos, promueven una excelente adhesión celular y proliferación. Además, también son biodegradables y por lo tanto permiten que las células implantadas produzcan su propia matriz extracelular. Además, los armazones tienen generalmente malas propiedades mecánicas, lo que limita su uso (66).

Implante de condrocitos autólogos (ACI)

El implante de condrocitos autólogos (ACI) es una de las técnicas más prometedoras para la reparación de defectos del cartílago articular. Esta técnica requiere de dos tiempos quirúrgicos uno para obtener la biopsia de cartílago articular para aislar condrocitos autólogos y llevar a cabo su expansión por medio de cultivo celular *in vitro*; posterior a la fase de cultivo las células condrales se inyectan en el defecto para cubrir la lesión con un parche de periostio o una membrana de colágeno. Brittber et al. (67-69).

Otras fuentes de células para implante

Además de condrocitos autólogos, las células aisladas del estroma de la médula ósea ó CTM (70) células de periostio (71), de músculo esquelético (72) adipocitos y fibroblastos sinoviales (73-75) representan posibles fuentes de células para la reparación del cartílago; del mismo modo, estas células necesitan una fase de expansión por cultivo *in vitro* para obtener células para el implante.

Otra fuente prometedora para su uso en ingeniería de tejidos son las células troncales mesenquimales; el primer reporte sobre el aislamiento de células mesenquimales en el equino, se llevó a cabo en 1998 por Fortier et al. (76) En el estudio se realizó el aislamiento de células adherentes a partir de una punción directa de médula ósea y se cultivaron en monocapa para evaluar el contenido y tamaño de los proteoglicanos producidos; así mismo evaluaron la expresión de colágenas I y II, llegando a la conclusión de que era posible el aislamiento de células mesenquimales a partir de médula ósea y argumentando la factibilidad de su uso en terapia celular autóloga para la regeneración de cartílago articular. Posteriormente se publicó por este mismo grupo de investigación en el 2000, el efecto del factor de crecimiento transformante beta 1 ($TGF\beta 1$) en condrocitos y células mesenquimales, realizando cultivos en monocapa y evaluando un incremento en la concentración desde 0, 1, 5, o 10 ng/ml en los cultivos se evaluó el contenido de proteoglicanos y se realizó el análisis molecular de la presencia de agregano, decrina, colágeno I y II; realizando tinciones con azul de toluidina y HyE, por otro lado se realizaron análisis por inmunohistoquímica de colágeno I y II. Llegando a la conclusión de que la presencia del factor promueve la expresión de colágeno II a diferencia de los testigos sin tratamiento donde se observó un incremento en la expresión de colágeno I.

Unos meses más tarde en el mismo año, Nixon et al. (77) reporta una modificación en la forma de estimular a las células obtenidas de médula ósea para generar cultivos celulares con fenotipo condral, teniendo como objetivo estimular el mantenimiento del fenotipo condral por medio de la inducción de la expresión de factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), dado que mantiene el metabolismo de cartílago normal y ha demostrado que mejora la regeneración del cartílago *in vivo*, sin embargo el tiempo de expresión para las células transfectadas mostró ser de 28 días en cultivo de monocapa.

Posteriormente en el 2001 Worster et al. (78) publican un estudio en el que evalúan las condiciones de cultivo administrando en monocapa TGF β 1 y posteriormente estimulando en cultivos tridimensionales en un gel de fibrina con IGF-1, llegando a la conclusión de que el estímulo del cultivo tridimensional junto con los factores de crecimiento promovían la producción de proteoglicanos y colágeno tipo II, sin embargo en los cultivos con células condrales en paralelo la expresión de estos marcadores fue diferente mostrando una mayor producción de proteoglicanos en comparación con los cultivos de células troncales mesenquimales.

En el 2002 Saito (79) publica el aislamiento de células embrionarias de blastocistos equinos y su diferenciación *in vitro*. Estudio en el cual establecen que las células producen los mismos marcadores que las células embrionarias de ratón, fosfatasa alcalina, antígeno embrionario específico de estado-1, STAT-3 y Oct 4. Después de 17 pases en cultivo, algunas de las células estimuladas con factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) presentaron características de precursores neurales, también desarrollaron un protocolo para linajes hematopoyéticos y endoteliales, en respuesta a bFGF, factor de células madre y oncostatina. Finalizando con la conclusión que posiblemente esta tipo de células aisladas puedan ser utilizadas en trastornos neurológicos o hematopoyéticos.

En el 2003 Smith et al. (80) reporta por primera vez el uso clínico de “células mesenquimales” en caballos como una moderna alternativa para la regeneración de tendones lesionados artículo en el que documenta que de 100 caballos sometidos al tratamiento con células autólogas el 84% regresó a la intensidad de actividad física previa a la lesión, comparada con el 15% de 66 caballos tratados de manera conservadora.

En 2004 Hegewald et al. (81) promueve el uso de TGF β 1 utilizado con ácido hialurónico y líquido sinovial como factores para promover la diferenciación condral de células troncales mesenquimales obtenidas de médula ósea y utilizando percoll como agente para realizar un gradiente de densidad y separar las células de la médula ósea.

Estas poblaciones celulares fueron cultivadas en micromasas y las estimularon, documentando la expresión de colágeno II y proteoglicanos; sin embargo no se encontraron diferencias entre grupos. En el 2006 se reportó por parte del Carstanjen et al. (82) un estudio en el cual se implantaron células troncales mesenquimales autólogas en el sitio de reparación de un defecto en paladar blando en un intento por mejorar la regeneración del tejido. Se obtuvieron células de médula ósea y se cultivaron en monocapa; estas células fueron marcadas con 5-bromo-2-desoximidina (BrdU), para poder rastrearlas y evaluar si efectivamente las células implantadas formaban parte del tejido de neoformación; finalmente pudieron detectar que las células generando el tejido del paladar blando y organizadas de manera similar al tejido nativo indicando un implante celular exitoso.

En el año 2006 dada la amplia variedad de reportes acerca de la experimentación y la caracterización de células mesenquimales, en la revista *Cytotherapy* (83), se publica la posición de la Sociedad Internacional de Terapia Celular en cuanto al criterio mínimo que se requería para definir una célula multipotente, entendiendo como célula multipotente a cualquier célula indiferenciada aislada de un organismo adulto que posea tres criterios principalmente; el primero es que deben ser adherentes, el segundo es la expresión de receptores de superficie específicos CD90, CD105 y CD73, así como la carencia de receptores CD34, CD14 y CD45, el tercero sería la capacidad de diferenciarse a osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*.

En el 2007 se publica una revisión sobre las características de células hematopoyéticas y su nicho en el cual se menciona la capacidad que deben tener las células mesenquimales para mantener su estado de diferenciación y la capacidad de generar copias de sí mismas haciendo referencia a un cuarto criterio para definir las características de células multipotentes la autorenovación (84).

Implante de neotejidos cartilaginosos

El cartílago generado por medio de ingeniería de tejidos (neotejido) requiere en un inicio una matriz artificial conocida como andamio en el que los condrocitos y / o células progenitoras pueden migrar y diferenciarse produciendo matriz extracelular y llegando a la formación de tejido cartilaginoso de novo. Los andamios deben tener tres características principalmente: el material del andamio debe ser biocompatible, debe permitir la adhesión celular y ser biodegradable (61).

Actualmente no está documentado si existe diferencias en tre cultivar células en andmios biológicos o andamios sintéticos ; por lo cual es necesario evaluar si los andamios biológicos o sintéticos favorecen la condrogénesis al ser cultivados con células troncales mesenquimales como fuente celular para la formación de neotejidos. El objetivo principal de este trabajo es evaluar las características cartilaginosas de las construcciones generadas a partir del cultivo de células troncales mesenquimales sobre dos polímeros biocompatibles y compararlas con cartílago hialino. La hipótesis se formula en función de que si alguno de los neotejidos formados a partir del cultivo de células troncales mesenquimales sobre los andamios biológico o sintético presenta mayor similitud al tejido condral hialino entonces ese andamio favorece la condrogénesis.

Material y Métodos

1. Obtención y Caracterización de Células Troncales Mesenquimales

Se obtuvieron 12 muestras de médula ósea equina por medio de la punción directa del esternón, se realizó el aislamiento de las células mononucleares por gradiente de densidad (Ficoll Paque^{MR} Amersham Biosciences, USA) para posteriormente realizar su caracterización utilizando un citómetro FACS Calibur (Becton Dickinson, USA) con el software Cell Quest PROTM (Becton Dickinson) para documentar la presencia de marcadores de superficie a diferentes tiempos de cultivo. Posteriormente se realizaron pruebas de diferenciación celular utilizando medios de cultivo enriquecidos para generar cultivos de linaje condral, óseo y adiposo (Merk Millipore, Darmstadt, Germany) comprobando la capacidad de los cultivos para producir marcadores de los linajes predichos.

1.1 Aislamiento de células mononucleares a partir de muestras de médula ósea obtenidas por punción esternal.

Se obtuvieron 10 muestras de médula ósea de equinos clínicamente sanos, realizando una punción directa en el esternón; cada muestra fue procesada para realizar el aislamiento de células mononucleares por gradiente de densidad. (Procedimiento Instrucciones 71-7167-00 AG, GE Healthcare). Posterior al procedimiento de aislamiento las células fueron contadas utilizando el procedimiento de cámara de Neubauer (Anexo 2).

1.2 Caracterización por citometría de flujo.

Las células obtenidas del procedimiento de separación por gradiente de densidad fueron cuantificadas utilizando una cámara de Neubauer (Anexo 2) y resuspendidas en PBS para incubarlas con anticuerpos para reconocer las proteínas de superficie CD90, CD73, CD105, CD45, CD34 (sc-7045, Santa Cruz Biotechnology) y CD14 (Anexo 3) El análisis de las muestras se llevó a cabo con el software Cell Quest PROTM (Becton Dickinson).

1.3 Cultivo celular

Las células aisladas por gradiente de densidad destinadas a los cultivos de expansión se sembraron inicialmente en cajas T25 procurando una densidad de 1×10^5 células/cm² utilizando medio de cultivo MesenCult™ para la fase de expansión. Una vez alcanzado el 80% de confluencia en la caja se realizó la resiembra de las poblaciones celulares dividiendo en dos cajas T25; de la misma manera una vez alcanzado el 80% de confluencia se procedió a realizar una segunda resiembra para utilizar las células en las pruebas de diferenciación.

1.4 Pruebas de diferenciación de cultivos celulares

Las células destinadas a las pruebas de diferenciación fueron sembradas en cajas de 12 pozos para poder llevar a cabo las pruebas de tinción e inmunofluorescencia planteadas en el diseño experimental. Los cultivos fueron estimulados utilizando medios comerciales de diferenciación. Para el linaje condrogénico MesenCult™-ACF Chondrogenic Differentiation Medium, para el linaje óseo MesenCult™ Osteogenic Stimulatory Kit y para el linaje adiposo MesenCult™ Adipogenic Differentiation Medium. Se realizaron tinciones (Azul Alciano, Von Kossa y Rojo Nilo respectivamente) para corroborar el estímulo de los cultivos a los linajes predichos y finalmente se evaluó la presencia de marcadores por medio de inmunofluorescencia.

2. Generación de Construcciones Celulares y Análisis *In Vitro*

Para poder documentar si las células podían ser cultivadas sobre los polímeros se diseñó un procedimiento para el cultivo tridimensional sobre los andamios biocompatibles. Los polímeros a utilizar se cortaron en fragmentos de 5x5x2 mm y se prehidrataron con medio de cultivo condroestimulante (Stem Cell Technologies^{MR}) Las células destinadas al cultivo tridimensional fueron prediferenciadas utilizando el protocolo descrito por el fabricante modificado. Durante 7 días las células fueron estimuladas en monocapa y posteriormente fueron sembradas 3×10^6 células en cada fragmento de polímero completando el estímulo por 14 días en cultivo tridimensional.

Al finalizar la fase de estímulo se realizaron tinciones de Safranina O y Azul Alciano para demostrar la diferenciación de los cultivos tridimensionales a linaje condral, finalmente se evaluó la presencia de marcadores condrales por medio de inmunofluorescencia y se realizó la cuantificación de las células positivas a Sox9, la cantidad de zonas positivas a colágeno II y la cantidad de zonas positivas a agrecano en las construcciones celulares, para compararlas con la cantidad de células positivas a estos marcadores en el cartílago hialino equino.

3. Implante de las Construcciones Celulares en un Modelo de Ratón Atímico

Con la finalidad de comparar la expresión de marcadores de linaje condral en las construcciones en un organismo vivo, se utilizó el modelo de implante en ratón atímico. En el cual se evaluó la presencia de células viables sobre la superficie de los polímeros previo al implante en el dorso de los individuos experimentales, posterior a 21 días se recuperaron de los neotejidos implantados y se realizó la histología de los mismos utilizando la prueba de Safranina O y Azul Alciano; para finalmente Evaluar la presencia de marcadores condrales (Sox9, Colágeno II y Agrecano)

Siguiendo el protocolo previamente establecido, se generaron construcciones cartilagosas por duplicado para poder constatar por medio de calceína la presencia de células viables sobre la superficie de los polímeros. Se procedió a realizar el implante de las construcciones en el dorso de ratones atímicos con la finalidad de evaluar las características de las construcciones posterior a la fase de cultivo *in vitro* e indagar si se mantienen después de ser implantadas en un modelo de ratón atímico por tres semanas más incluyendo el testigo de polímero sin células. Las construcciones permanecieron en el dorso de los individuos y al finalizar la tercera semana se realizó la eutanasia de los mismos para recuperar el tejido de neoformación. Las muestras recuperadas se analizaron por medio de histoquímica realizando tinciones de Safranina O y Azul Alciano para mostrar si las características de tejido cartilaginoso permanecieron en el modelo *in vivo*.

Finalmente se evaluó la presencia de marcadores condrales por medio de inmunofluorescencia y se realizó la cuantificación de las células positivas a Sox9, la cantidad de zonas positivas a colágeno II y la cantidad de zonas positivas a agregano, para compararlas con la cantidad de células positivas a estos marcadores en el cartílago hialino equino.

Resultados

Para caracterizar las células aisladas de médula ósea, se realizó la evaluación de las poblaciones celulares aisladas por gradiente de densidad utilizando citometría de flujo, análisis con el cual se demostró la presencia de marcadores positivos a células troncales mesenquimales desde el aislamiento hasta el tercer pase, iniciando con poblaciones positivas a CD105 (media 0.438%), CD73 (media 0.611%) y CD90 (media 0.355%) y mostrando al tercer pase la expresión de CD105 (media 8.682%), CD73 (media 19.455%) y CD90 (media 94.709%).

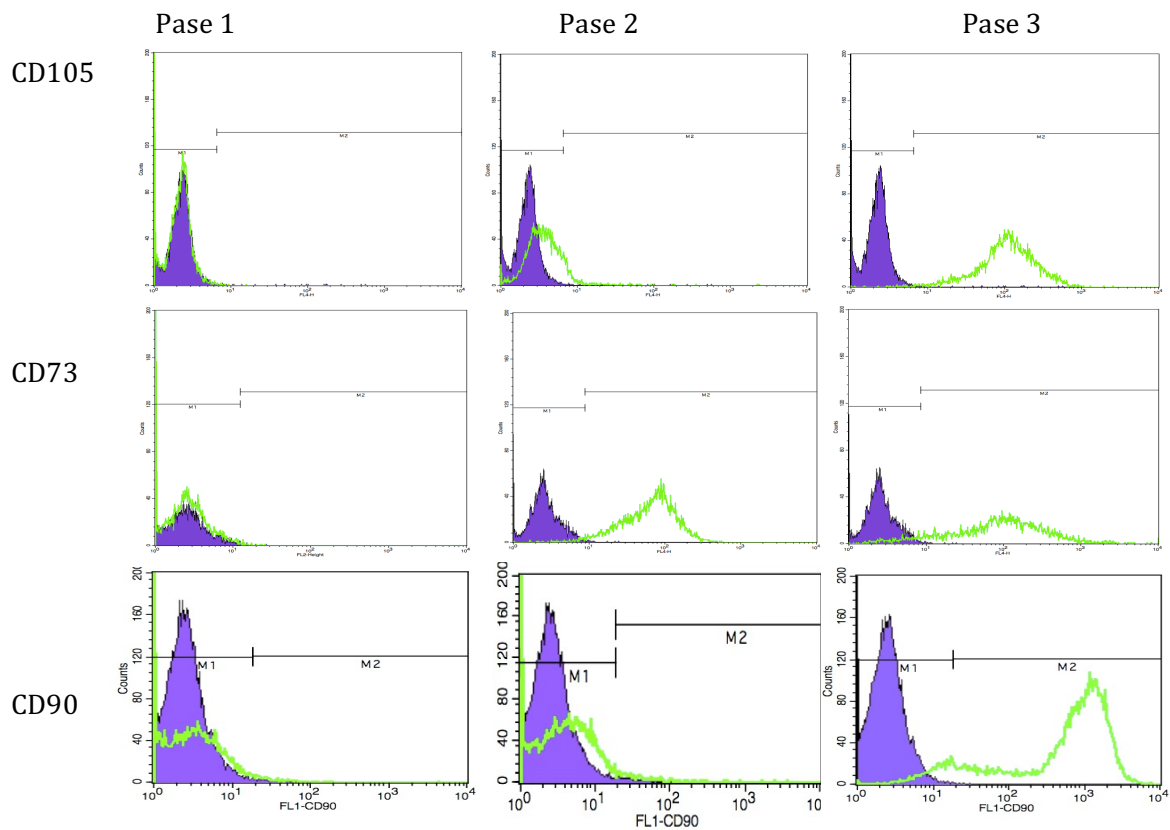
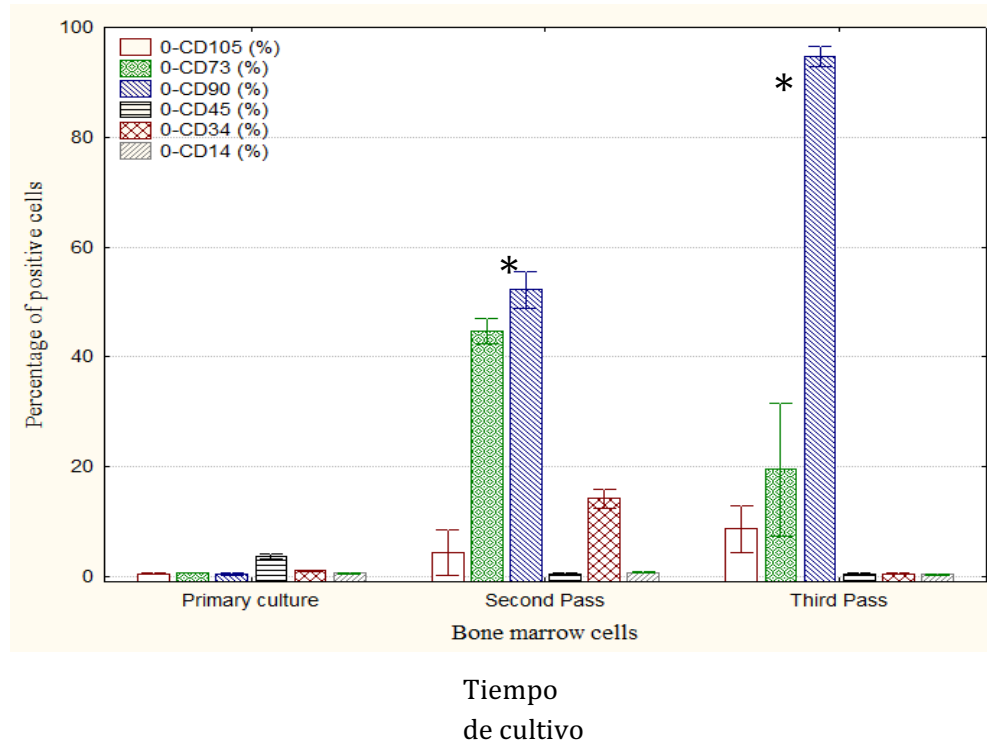


Figura 4. Se observan los histogramas que muestran el cambio de expresión de marcadores de superficie CD105, CD73 y CD90, la sombra morada es el control de isotipo y la línea verde indica la cantidad de células positivas al marcador. Se muestra un incremento evidente en la cantidad de células positivas a los marcadores de células troncales mesenquimales en la columna de la extrema derecha (Pase 3) en comparación con la cantidad de células positivas durante los primeros días de cultivo; columna de extrema izquierda (Pase 1).

Porcentaje de células positivas.



Gráfica 1. En esta gráfica se compara al porcentaje de células positivas (eje de las Y) con el tiempo de cultivo (eje de las X); se puede observar que la expresión de los marcadores CD73 y CD90 presentan diferencia estadísticamente significativa entre el segundo y tercer pase, observándose una menor expresión del marcador CD73 del segundo al tercer pase y por el contrario un incremento en la expresión del marcador CD90.

*Diferencia estadística, $p < 0.05$, prueba de Tukey HSD

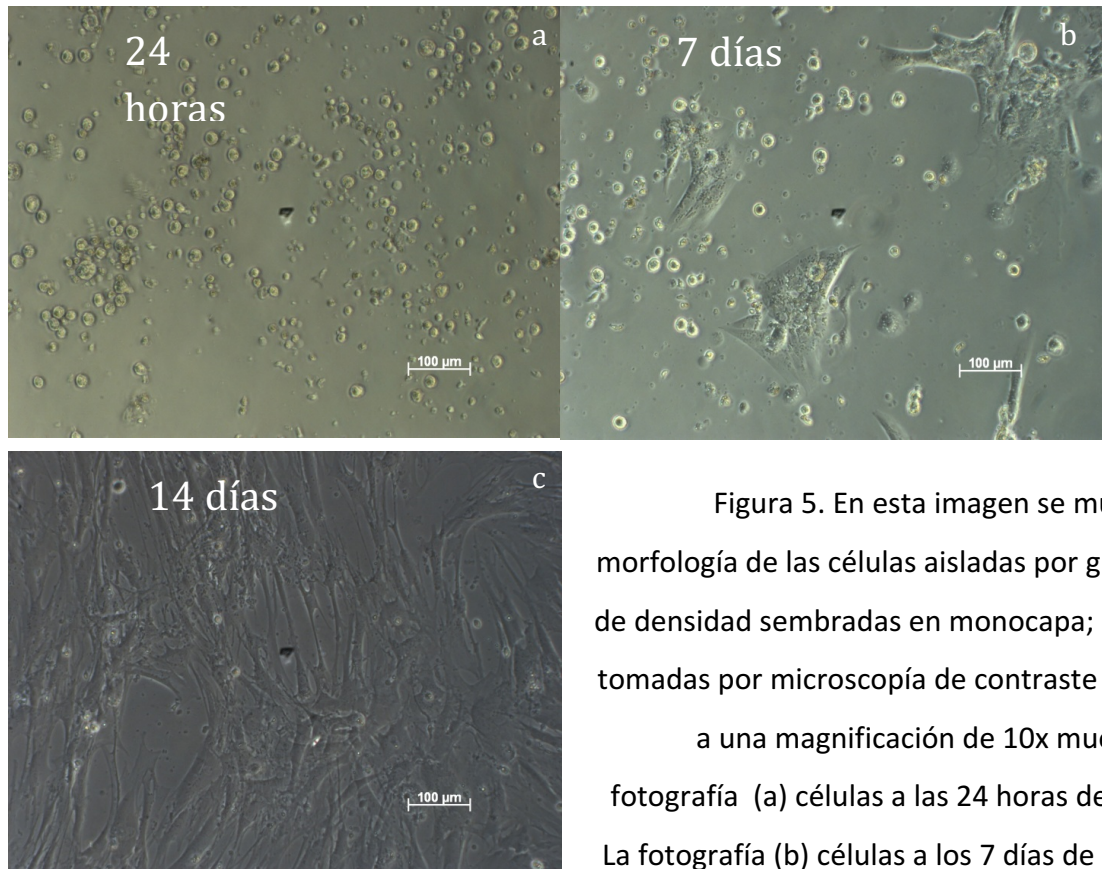


Figura 5. En esta imagen se muestra la morfología de las células aisladas por gradiente de densidad sembradas en monocapa; las fotos tomadas por microscopía de contraste de fases a una magnificación de 10x muestran la fotografía (a) células a las 24 horas de cultivo. La fotografía (b) células a los 7 días de cultivo y la fotografía (c) células a los 14 días de cultivo.

Durante la fase de expansión se realizaron 3 tiempos de cultivo; el cultivo primario donde se inició la expansión de las células obtenidas de médula ósea sembrando a una densidad de 1×10^5 células/cm² en cajas T25, el primer pase donde se obtuvieron en promedio 1.9×10^6 células totales y el segundo pase donde se obtuvieron en promedio 1.89×10^6 células totales para las pruebas de diferenciación. Las células fueron sembradas en cajas de 12 pozos para iniciar los cultivos de diferenciación realizando el estímulo durante 14 días, tiempo que las células mostraron tinciones positivas a Azul Alciano para linaje condral, Von Kossa para linaje óseo y Rojo Nilo para linaje adiposo.

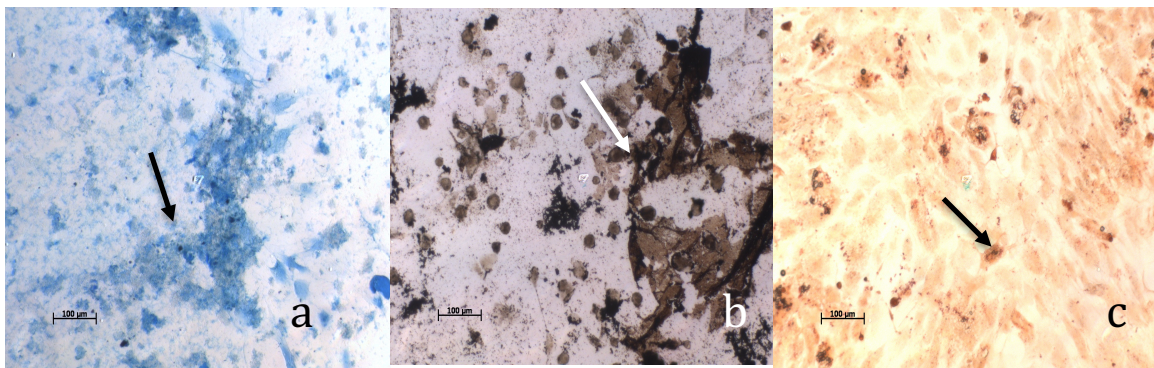


Figura 6. En esta figura se observan los cultivos en monocapa células adherentes obtenidas de médula ósea estimuladas para generar (a) células condrales (Azul Alciano) esta tinción detecta la presencia de proteoglicanos, (b) células óseas (Von Kossa) tinción para los depósitos de calcio color café; y (c) células adiposas (Rojo Nilo) para detectar los cúmulos de ácidos grasos dentro de las células.

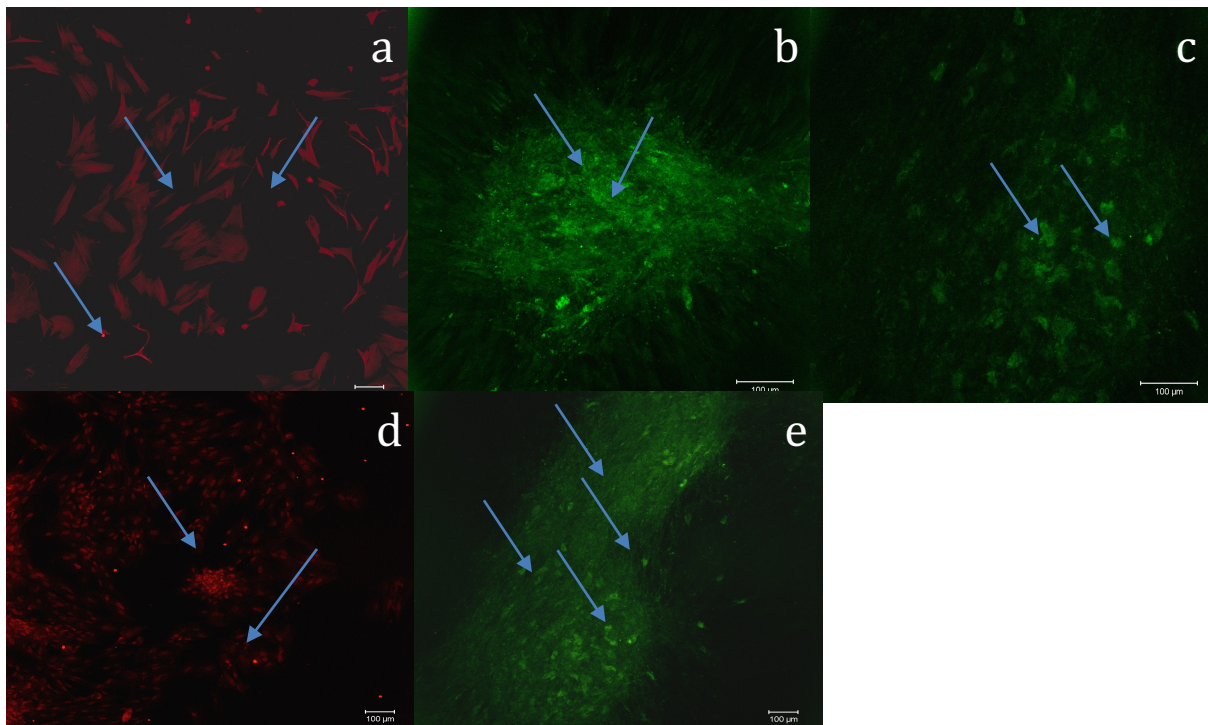


Figura 7. En esta figura se muestran los cultivos en monocapa donde las células estimuladas aisladas de médula ósea presentan inmunoreactividad positiva para marcadores de tejido condral (a) Sox9, (b) Colágeno II y (c) agregano. Así como las inmunofluorescencias para marcadores de tejido óseo (d) Osteocalcina y (e) Runx2.

Posterior a la fase de cultivo y diferenciación, se generaron construcciones al sembrar las células aisladas sobre los polímeros y se realizó una prueba de viabilidad indirecta utilizando calceína; de la misma manera se realizó un conteo celular de las fotografías cuantificando la cantidad de células presentes en la superficie de cada polímero a 7 y 14 días.

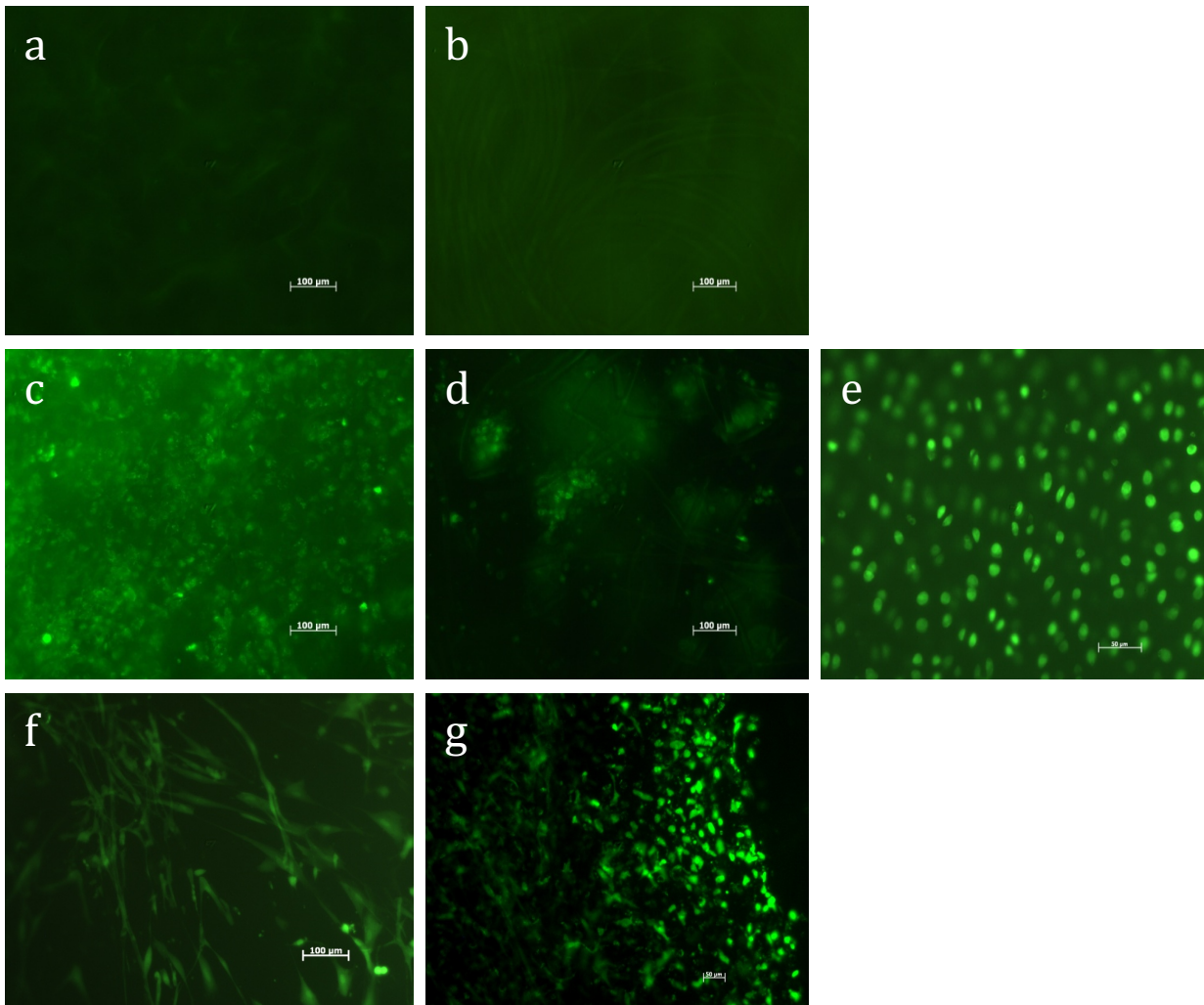
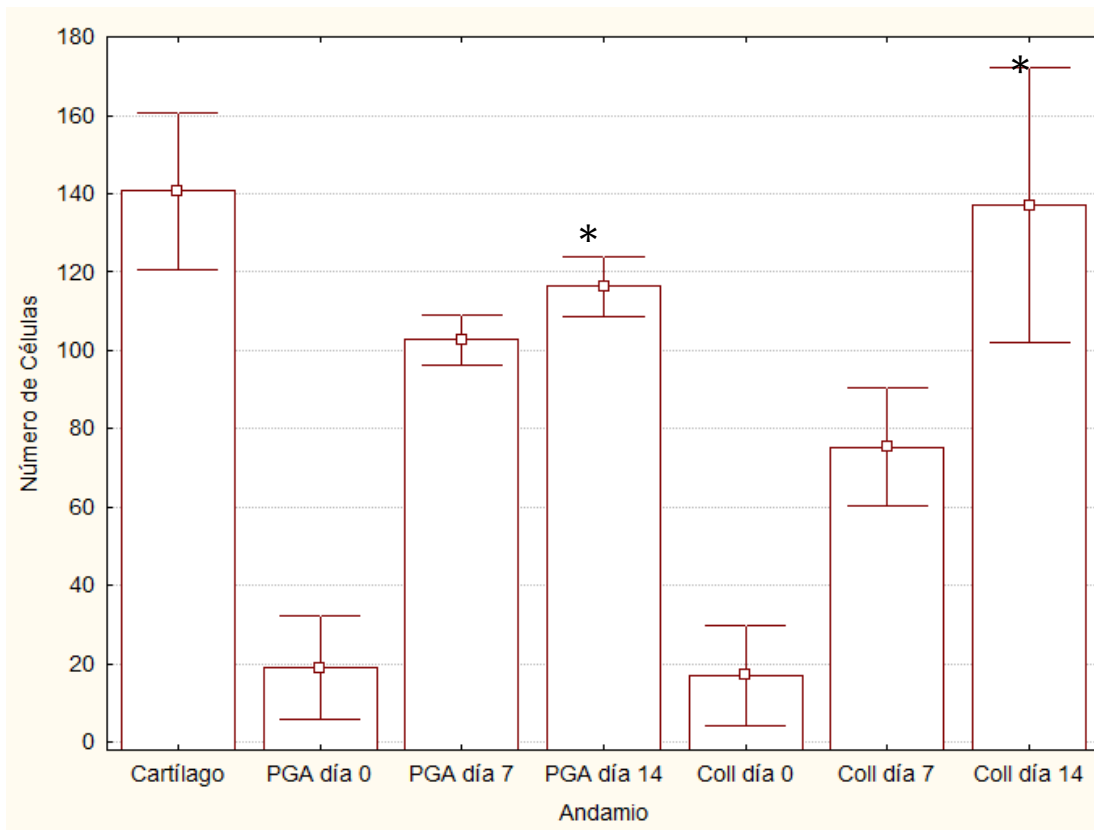


Figura 8. En esta figura se presentan las CTM sobre los polímeros incubadas con calceína y homodimero de etidio con el objetivo de documentar su distribución sobre la superficie de los polímeros. Donde (a) es el polímero de colágeno sin células, (b) es el polímero de PGA sin células; (c,d) son los polímeros a una semana de cultivo respectivamente; (f,g) son las imágenes de los dos polímeros a dos semanas de cultivo y finalmente (e) es el testigo de cartílago hialino equino.



Gráfica 2. En esta gráfica se compara el número de células (eje de las Y) del testigo de cartílago hialino con la cantidad de células sembradas en los polímeros a distintos tiempos de cultivo (eje de las X) donde se cuantificaron las células sobre la superficie de los polímeros al primer día de cultivo (día 0) a los 7 días de cultivo (día 7) y a los 14 días de cultivo (día 14). Comparando la cantidad de células en el testigo (cartílago) Se observa que al día 14 no existe diferencia estadísticamente significativa entre las construcciones de PGA y las construcciones de colágena con el testigo.

*Diferencia estadística, $p < 0.05$, prueba de Tukey HSD

Posterior a la fase de cultivo, se realizaron tinciones de Safranina O y Azul Alciano para mostrar la presencia de proteoglicanos en los cultivos encontrando tinciones positivas en ambas construcciones al día 14 de cultivo, comparándolas con cartílago hialino.

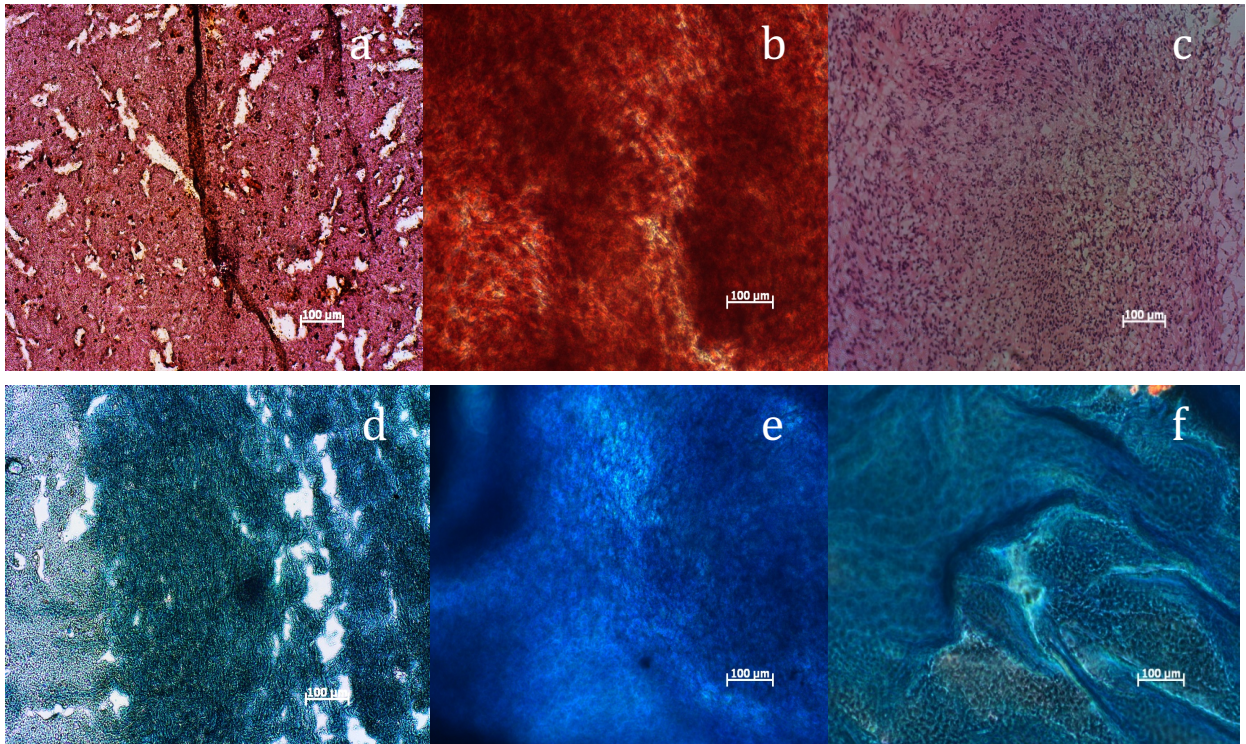


Figura 9. Se presentan las tinciones de los cortes histológicos de las construcciones generadas con los polímeros y el testigo de cartílago hialino. Donde (a) es el testigo de cartílago nativo teñido con Safranina O, (b) es el polímero de colágeno teñido con la misma técnica y (c) es el polímero de PGA teñido igualmente con Safranina O; (d) es el testigo de cartílago teñido con azul alciano, (e) es el polímero de colágeno y (f) es el polímero de PGA teñidos con azul alciano.

En la siguiente etapa del experimento habiendo comprobado mediante tinciones la presencia de matriz condral similar a la del testigo del cartílago hialino, se procedió a realizar un análisis de marcadores de linaje condral utilizando anticuerpos fluorescentes para Sox9 (ab26414), colágeno tipo II (ab34712) y agrecano (ab36861) cuantificando la cantidad de células positivas a Sox9 y las zonas positivas a colágeno II y agrecano utilizando el software ImageJ (NIH).

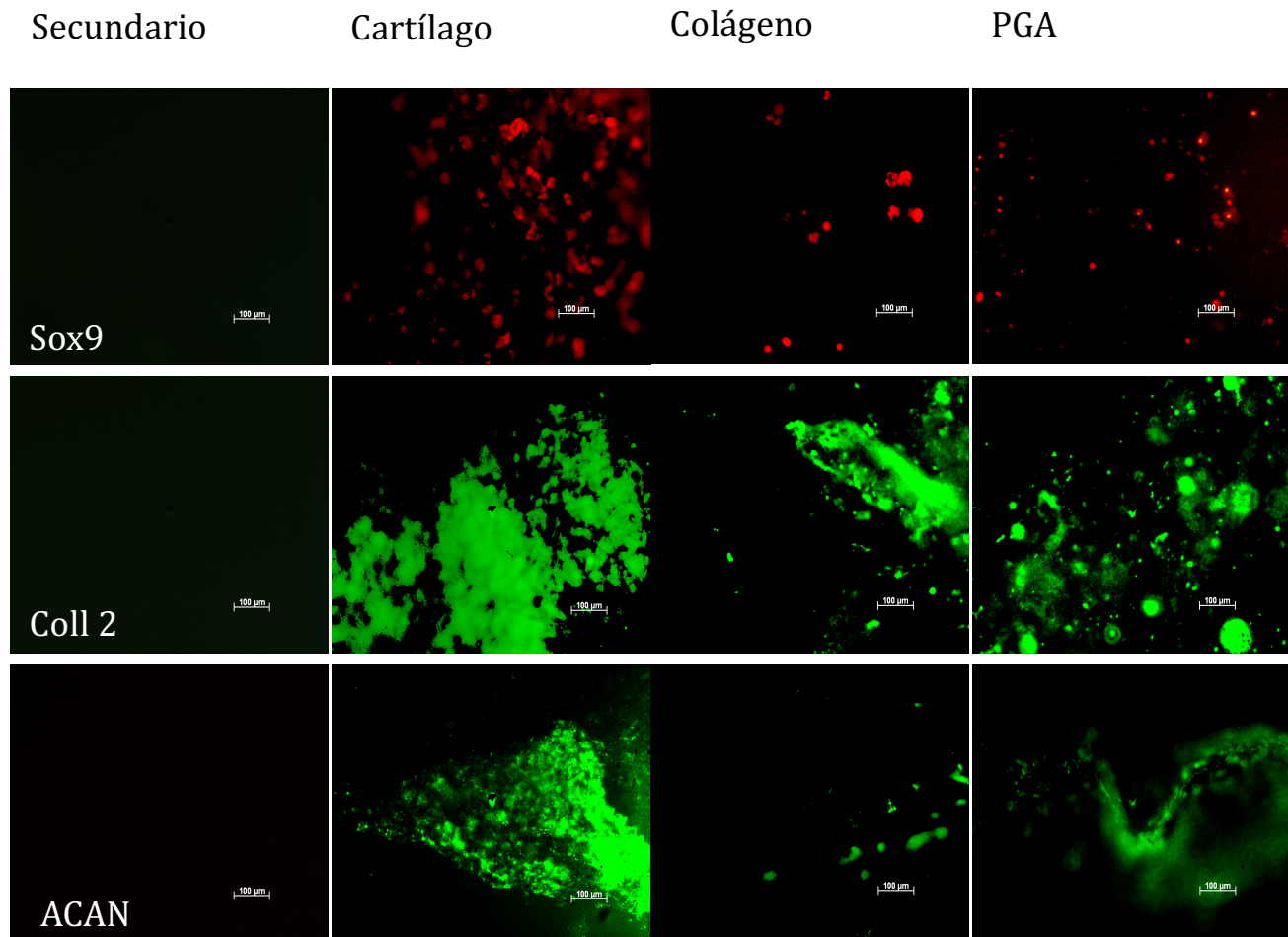


Figura 10. Se observan las fotografías de microscopía de fluorescencia en las cuales se compara la expresión de marcadores condrales en las construcciones generadas *in vitro* con los testigos positivos y negativos de cada experimental. Donde la columna de extrema izquierda representa los testigos negativos de los anticuerpos, la columna titulada “cartílago” muestra la expresión de los marcadores en el tejido hialino nativo. La columna titulada “colágeno y PGA” muestran la expresión de los marcadores en los polímeros cultivados *in vitro*.

Debido a que la expresión de los marcadores de linaje condral entre las construcciones no presentó diferencia estadísticamente significativa, se realizó un implante en un modelo de ratón atímico de las construcciones con los dos tipos de polímeros.

El implante en el dorso de los ratones atímicos se realizó en concordancia con el modelo de ratón atímico realizando un pequeño saco en el tejido subcutáneo de los individuos para insertar la construcción de tejido condral. Posterior a 3 semanas de incubación *in vivo*, los neotejidos fueron analizados por medio de histoquímica realizando tinciones de Safranina O y Azul Alciano.

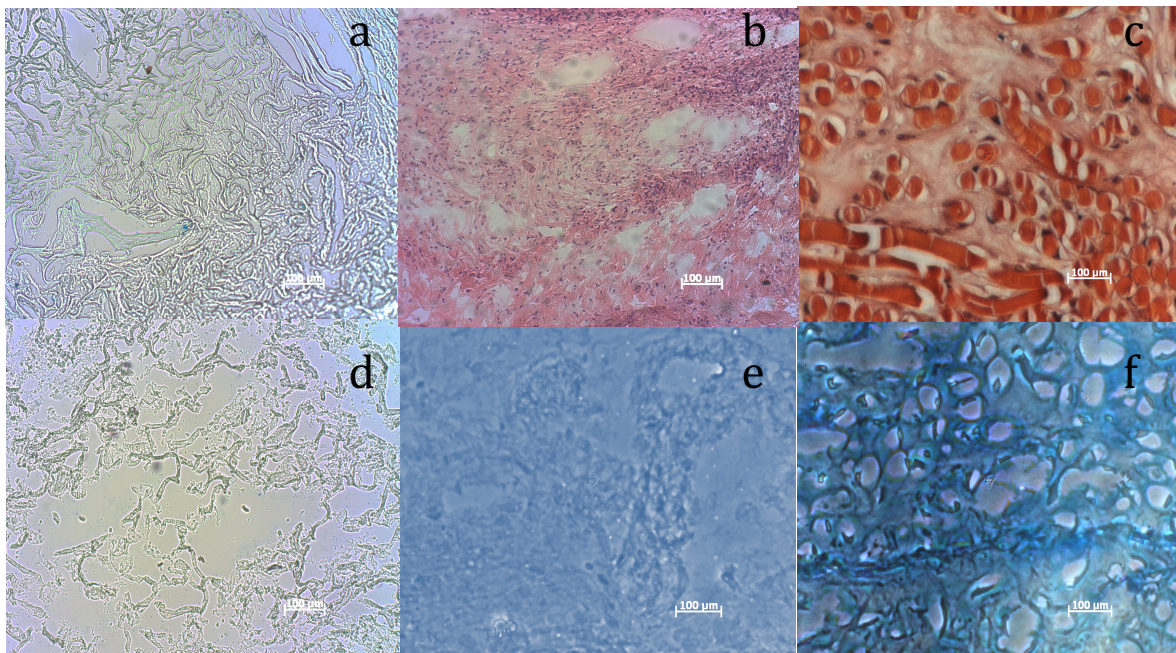


Figura 11. Comparación histológica de los neotejidos recuperados de los individuos atímicos. Donde (a) es el testigo de polímero de PGA sin células, (b) es el neotejido de colágeno teñido con Safranina O, (c) es el neotejido de PGA teñido igualmente con Safranina O; (d) es el testigo de polímero de colágeno, (e) es el neotejido de colágeno teñido con Azul Alciano y (f) es el neotejido de PGA teñido con azul alciano.

Dados los resultados positivos a las tinciones de Safranina O y Azul Alciano se procedió a realizar las evaluaciones por inmunofluorescencia utilizando de la misma manera la detección de Sox9 (ab26414), colágeno tipo II (ab34712) y agrecano (ab36861) cuantificando la cantidad de células positivas a Sox9 y las zonas positivas a colágeno II y agrecano utilizando el software ImageJ (NIH).

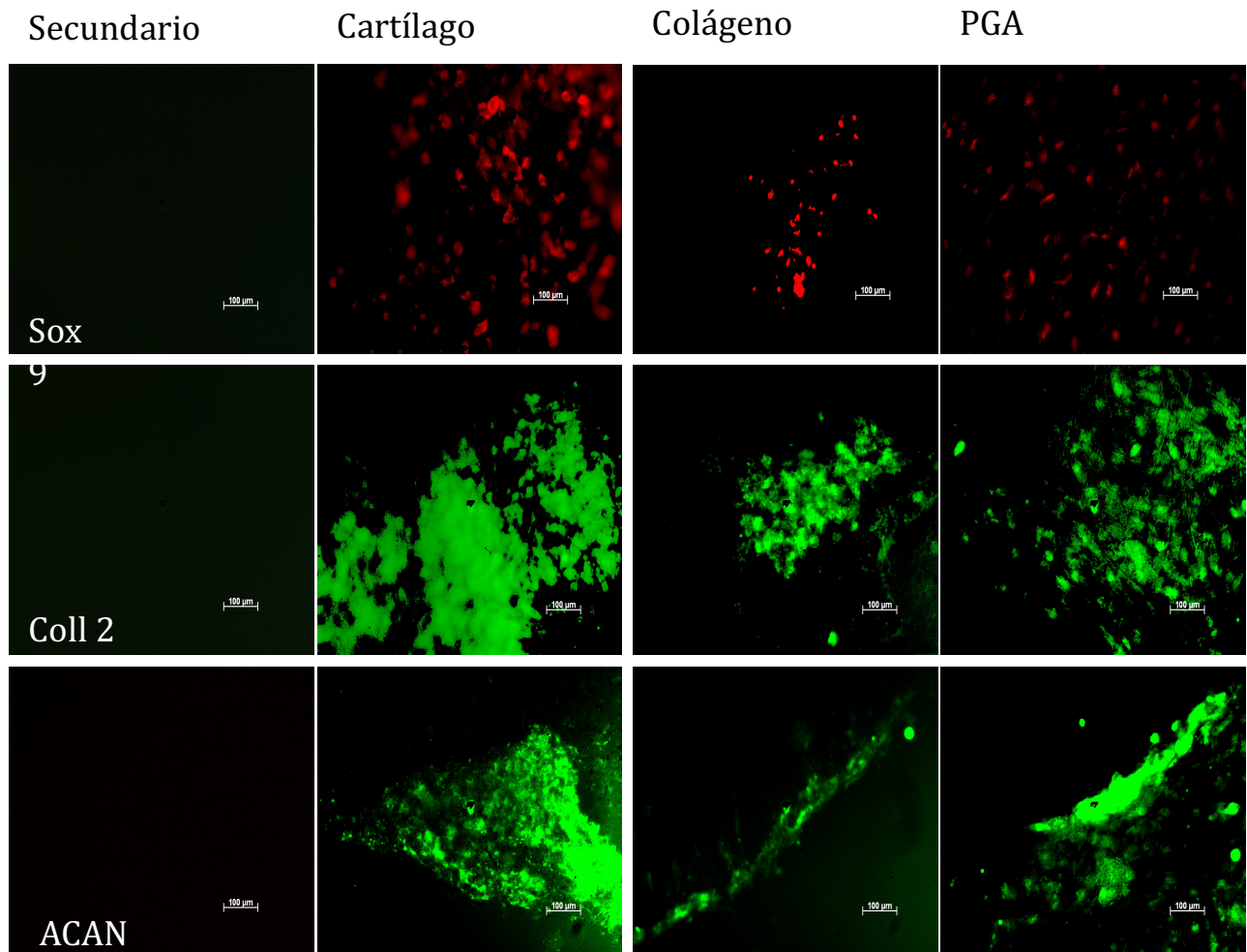
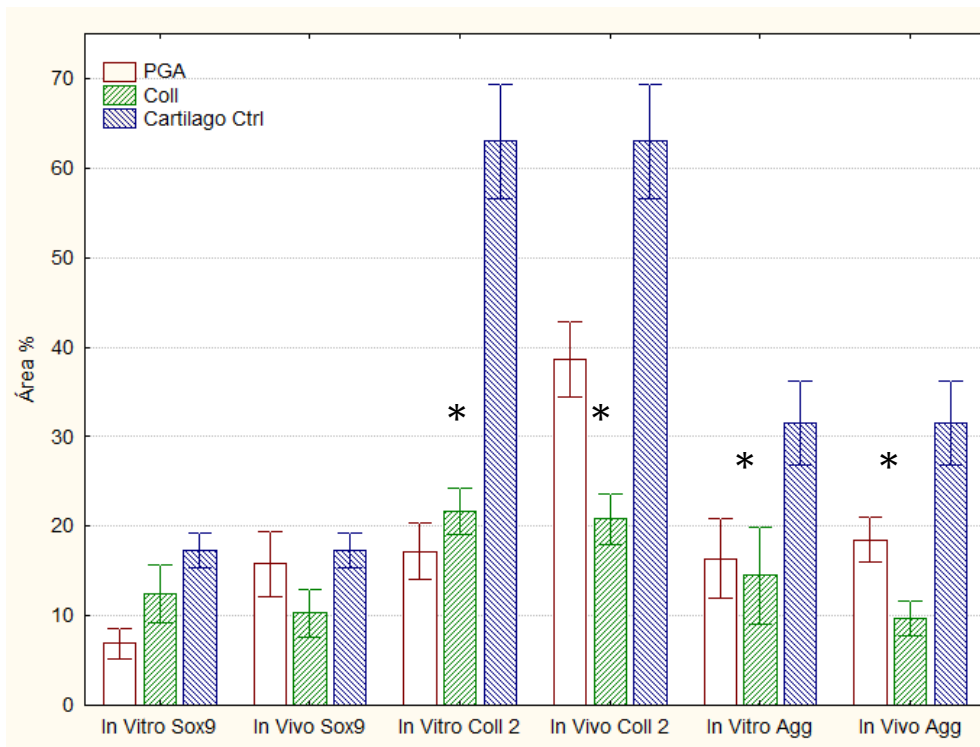


Figura 12. Se observan las fotografías de microscopía de fluorescencia en las cuales se compara la expresión de marcadores condrales en las construcciones generadas *in vivo* en comparación con los testigos positivos y negativos de cada experimental. Donde la columna de extrema izquierda representa los testigos negativos de los anticuerpos, la columna titulada “cartílago” muestra la expresión de los marcadores en el tejido hialino nativo. La columna titulada “colágeno y PGA” muestran la expresión de los marcadores en los polímeros cultivados *in vitro*.



Gráfica 3. En esta gráfica se cuantifica el porcentaje de área en los cortes histológicos con inmunoreactividad positiva a los marcadores de linaje condral presentes en las construcciones de PGA y colágena tanto *in vivo* como *in vitro* comparándolas con la expresión de los marcadores en el testigo de cartílago hialino. Las construcciones de colágena *in vitro* no presentan diferencia estadísticamente significativa con la expresión de Sox9 en el testigo de cartílago; y las construcciones de PGA *in vivo* (neotejido) no presentan diferencia estadísticamente significativa con la expresión de Sox9 en el testigo positivo de cartílago.

*Diferencia estadística, $p < 0.05$, prueba de Tukey HSD

Discusión

En este trabajo se demostró que es posible generar construcciones condrales a partir del cultivo *in vitro* de células troncales mesenquimales sobre andamios de ácido poliglicólico y que estas construcciones mantienen la expresión de marcadores de linaje condral al ser implantadas en un modelo de ratón atómico.

Las lesiones en cartílago articular son causa de discapacidad en caballos de alto rendimiento. Estas lesiones desencadenan la degeneración de la articulación y la incapacidad. En la actualidad existen diferentes estrategias médicas y quirúrgicas para el tratamiento de las lesiones traumáticas del cartílago en las articulaciones, pero ninguna de ellas genera tejido con las propiedades biomecánicas ni bioquímicas que posee el cartílago articular (85). El empleo de técnicas quirúrgicas experimentales o tradicionales permite el alivio temporal del dolor que es el signo principal de la patología, sin embargo, no existen hasta la fecha otras opciones que ofrezcan una regeneración a largo plazo (3).

Previamente Nixon et al. (86) reportó un trabajo sobre el uso de construcciones condrales elaboradas a partir del cultivo de condrocitos sobre andamios biológicos de colágeno tipo I/III; las cuales se implantaron en un modelo equino de lesión articular; Nixon el reporta la formación de un tejido similar al cartílago en una segunda vista artroscópica; sin evaluar la expresión de las células en el tejido de neoformación o reportar análisis *in vitro* previos. En otro trabajo publicado por Xie et al. (87) se reporta de la misma manera, la formación de construcciones condrales formadas a partir del cultivo de células troncales mesenquimales aisladas de médula osea sobre un andamio biológico de colágena tipo I, donde se documentó por medio de tinciones histológicas la producción de matriz extracelular en los neotejidos; sin embargo, es necesario evaluar también la presencia de marcadores condrales como Sox 9 colágeno II y agregano.

En este trabajo se demostró la presencia de matriz extracelular por medio de tinciones histológicas y se detectó la expresión de marcadores de linaje condral, Sox9, Colágena tipo II y Agrecano, por medio de técnicas de inmunofluorescencia, donde se observó un patrón de expresión idéntico a los testigos de cartílago en los neotejidos generados con ácido poliglicólico. (88-89)

Actualmente el desarrollo de polímeros biocompatibles con la finalidad de generar sustitutos biológicos es una línea de investigación muy importante; debido a que la composición de un polímero como ya se ha reportado previamente (90,91) puede inferir en la migración, proliferación y metabolismo de las células que se cultivan en él. El uso de andamios de origen biológico puede influir en el metabolismo de las células (92) promoviendo o inhibiendo la expresión de proteínas necesarias para el funcionamiento de los tejidos (56,57) tal es el caso del cartílago, donde sus características bioquímicas (55) son esenciales para la protección y distribución de carga.

Christensen et al., en un trabajo comparativo sobre construcciones condrales elaboradas por medio del cultivo de condrocitos maduros sobre dos tipos de andamios biocompatibles uno sintético (policaprolactona) y otro biológico (colágena I/III) reportaron que los marcadores condrales como agrecano y colágeno tipo II disminuyeron en las construcciones elaboradas con el andamio biológico, mientras que la expresión de los mismos marcadores en las construcciones elaboradas con el andamio sintético se mostraron similares al cartílago hialino nativo (93).

En otros estudios llevados a cabo por Niemeyer et al. en 2008 reportan que el 12.1% de los individuos tratados con el andamio de colágeno reincidieron en la lesión articular y tuvieron que ser operados dentro de los 20 primeros meses postquirúrgicos (94); así mismo Russlies et al. reportaron que el tejido de neoformación no es equiparable en sus características biomecánica con el cartílago hialino (95).

Otros andamios biológicos elaborados a partir de compuestos biocompatibles como el quitosan poseen gran cantidad de polisacáridos (glucosaminoglucanos) los cuales son muy útiles para la elaboración de sustitutos y cubiertas cutáneas (96) para su uso en pacientes diabéticos o con quemaduras debido a que pueden hidratarse y poseen flexibilidad; así mismo, pueden ser útiles en la generación de andamios inteligentes con actividad antiinflamatoria (65) o para la liberación de fármacos de manera gradual (66); sin embargo se muestran friables y de difícil manipulación quirúrgica lo que dificulta su uso en ortopedia.

Bernardini et al., reportaron que en construcciones elaboradas a partir del cultivo de condrocitos maduros sobre andamios de ácido poliglicólico se logra mantener el fenotipo y expresión de marcadores condrales como Sox9, colágena tipo II y agrecano, promoviendo la producción de matriz extracelular (89).

Así mismo Gómez et al. al realizar la comparación de dos andamios biocompatibles uno biológico (colágena I) y otro sintético (PGA) mediante el cultivo de células troncales mesenquimales aisladas de médula ósea equina, concluyeron que el polímero sintético promueve en el modelo *in vivo* el mantenimiento del fenotipo condral al comparar la producción de matriz extracelular y marcadores condrales (Sox9, Colágena tipo II y Agrecano) con los testigos de cartílago hialino (88).

El uso de células troncales mesenquimales para la generación de sustitutos biológicos es una línea de investigación en desarrollo y promueve la colaboración de grupos multidisciplinarios para concretar la aplicación clínica de diferentes materiales y fuentes celulares; actualmente las fuentes celulares de células troncales mesenquimales más utilizadas en estudios clínicos son las células aisladas de médula ósea principalmente, y las aisladas de tejido adiposo. Por otro lado, se documenta ya la estandarización del cultivo de células troncales obtenidas de distinto origen, como las células obtenidas de pulpa dentaria (97) o las células troncales obtenidas en muestras de sangre periférica (98) las cuales en un futuro pueden ser una opción más para su uso en la elaboración de sustitutos biológicos de manera eficiente.

En este trabajo el uso de células troncales mesenquimales se demostró por medio de la presencia de marcadores celulares evaluados utilizando citometría de flujo y pruebas de diferenciación celular en los cultivos *in vitro*. Para poder obtener las poblaciones celulares de células troncales mesenquimales, logramos aislar células mononucleares adherentes a las cajas de cultivo de 10 muestras de médula ósea equina por medio de la punción directa del esternón.

Las células obtenidas se analizaron por citometría de flujo, demostrando la presencia de marcadores de células troncales mesenquimales obteniendo inicialmente una población celular positiva al marcador CD105 de 0.438%, CD73 0.611% y CD90 0.355%; lo que confirma la información reportada en los trabajos de Koerner, Guest, Radcliffe, Pascuci y Ranera (99-101,92) la presencia de marcadores de células troncales mesenquimales en las poblaciones celulares aisladas de médula ósea equina.

En segundo término se planteó la evaluación de su capacidad de proliferación y manipulación por medio de cultivos en monocapa demostrando su capacidad para generar cultivos de células adherentes *in vitro*, al igual que lo reportado por Fortier (76) y Pascucci (101) que demuestran en sus trabajos la capacidad adherente de las células aisladas de médula ósea y tejido adiposo respectivamente.

Posterior a la fase de expansión *in vitro* se logró la purificación de las poblaciones celulares manteniendo los marcadores de superficie, obteniendo una población enriquecida de células con un porcentaje positivo a CD105 del 8.682%), CD73 19.455% y CD90 media 94.709%; con lo que se comprueba que una población de células se mantiene durante la fase de expansión expresando los marcadores de superficie reportados en células troncales mesenquimales.

Para evaluar la capacidad de diferenciación a los linajes mesenquimales se realizaron cultivos en monocapa para generar cultivos de células condrales, óseas y adiposas, lo cual se documentó mediante fotografías de tinciones en campo claro de Azul Alciano para las células estimuladas a linaje condral, Von Kossa para las células estimuladas a linaje óseo y Rojo Nilo para las células diferenciadas a linaje adiposo, posterior a la fase de diferenciación.

Por otro lado para detectar marcadores de linaje condral en los cultivos en monocapa se desarrolló un ensayo de inmunofluorescencia donde se tomaron fotos de las zonas en los cultivos con células con inmunoreactividad positiva a Sox 9, colágeno II y agregano para los cultivos diferenciados a linaje condral y fotos de las zonas en los cultivos con células con inmunoreactividad positiva a Runx 2 y osteocalcina, en concordancia con lo reportado por Koerner (102), Guest (99) y Xie al (87) los cuales lograron detectar marcadores de linajes mesenquimales al estimular células aisladas de médula ósea a los diferentes linajes condral, óseo y adiposo.

Posteriormente se evaluó la capacidad de proliferación y distribución sobre la superficie de los polímeros, mediante una prueba de viabilidad indirecta por fluorescencia donde se tomó en cuenta la cantidad de células en ambos polímeros biocompatibles a diferentes tiempos de cultivo (tiempo 0, siete días y 14 días), estos datos se compararon con la cantidad de células presentes en el cartílago hialino equino; las imágenes fueron analizadas utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health) documentando número de células.

Uno de los problemas iniciales de esta parte fue que el polímero sintético con el que se contaba acidificaba el medio de cultivo generando la muerte de las células; por lo cual se optó cambiar el lote del mismo por uno más reciente y almacenar nuestros polímeros en una cámara de desecación con humedad regulable. Así se pudo continuar con los siguientes experimentos almacenando nuestros polímeros debido a que son fácilmente degradados por la humedad ambiental.

Siguiendo con el análisis de proliferación, sobre los polímeros, se tomó en cuenta el número de células por área de superficie sobre cada polímero; sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los polímeros a los 14 días de cultivo al ser comparados con los testigos de cartílago hialino. Con esta parte del proyecto se comprobó que las células son capaces de proliferar y se corroboró que los polímeros son biocompatibles.

Para evaluar si las células sobre los polímeros eran capaces de expresar marcadores condrales, se cultivaron 3×10^6 células por polímero de 5x5x2 mm utilizando medio de cultivo condroestimulante por 14 días; posteriormente se comprobó que las construcciones fueron positivas a Safranina O y Azul Alciano. Se utilizaron 14 días dado que al continuar con los cultivos *in vitro*, por más de 21 días las tinciones resultaron negativas.

Finalmente, para sustentar que en las construcciones presentaban marcadores de linaje condral se repitió el ensayo de inmunofluorescencia en los cortes histológicos para detectar Sox9, Colágena tipo II y Agrecano; con este experimento se confirma lo reportado por Xie et al. (87) al diferenciar construcciones tridimensionales con células de médula ósea.

En esta parte del experimento aprendimos a utilizar el software ImageJ (NIH) para poder delimitar y cuantificar en una fotografía las zonas positivas a los marcadores; generando así una evaluación cuantitativa indirecta.

Al comparar la cantidad de zonas positivas a los marcadores condrales presentes en las construcciones con el control de cartilago equino, la cantidad de fluorescencia fue similar al patrón de expresión de las construcciones con el cartílago nativo, esto significa que es posible generar *in vitro* tejido condral con las características de cartílago utilizando cualquiera de los dos andamios; sin embargo, con la necesidad de discernir entre las capacidades condrogénicas de cada polímero, biológico o sintético se procedió a la evaluación *in vivo* de las construcciones en un modelo de ratón atómico.

Se elaboraron las construcciones con células troncales mesenquimales aisladas de médula ósea utilizando el protocolo previamente desarrollado *in vitro*; se realizó el modelo de implante en tejido subcutáneo y se dejó la construcción cartilaginosa durante 3 semanas; Se optó por que cada ratón fuera su control utilizando un fragmento de polímero sin células en un costado del ratón y otro del mismo tipo de polímero pero con células; posterior al tiempo de cultivo, se sacrificó a los individuos recuperando los neotejidos en los cuales se realizaron cortes histológicos los cuales se analizaron con tinciones de Safranina O y Azul Alciano, obteniendo reactividad positiva.

Así mismo se realizaron las pruebas de inmunofluorescencia para constatar la presencia de marcadores de tejido condral (Sox9, Colágena tipo II y Agrecano) y comparar con los testigos de cartílago hialino equino.

Con este trabajo se estandarizó una técnica novedosa para generar tejido condral *in vitro* utilizando células troncales mesenquimales de médula ósea sembradas en un polímero de PGA el cual representa el segundo paso en la ingeniería de cartílago articular y una mejor opción para los pacientes con lesiones condrales en articulaciones por lo cual es importante realizar un estudio clínico controlado en un modelo de lesión articular inducida.

Conclusiones

- I. Se demostró que es posible el aislamiento y cultivo de células troncales mesenquimales obtenidas a partir de punción esternal para utilizarlas en cultivos tridimensionales en dos polímeros uno biológico y otro sintético.
- II. Se generaron construcciones condrales con inmunoreactividad positiva a Sox 9, colágena tipo II y agregano en ambos tipos de polímeros.
- III. Se comprobó que las construcciones condrales generadas *in vitro* mantienen la expresión de los marcadores condrales.
- IV. Al implantar las construcciones condrales en un modelo de ratón atómico el polímero sintético se mantiene una expresión de marcadores condrales similar a los controles de cartílago hialino equino.

Prospectiva

En esta línea de investigación se pretende evaluar el polímero en un modelo de lesión condral de rodilla equina para evaluar la calidad del neotejido y expresión de marcadores de tejido condral hialino, realizando el implante de las construcciones condrales, así mismo se inició ya la evaluación de diferentes poblaciones de células troncales mesenquimales *in vitro*, para comparar la estructura y cantidad de marcadores condrales en construcciones tridimensionales utilizado el polímero de PGA, con la intención de discernir la fuente celular óptima para generar un fenotipo condral estable tanto en las pruebas *in vitro* como en su aplicación *in vivo*. El polímero de PGA y las células troncales mesenquimales de médula ósea son la mejor opción para ensayos clínicos controlados en un modelo equino de lesión condral.

Referencias.

1. Stockwell RA: The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat* 1967, 101(Pt 4):753-763.
2. Mujeeb A. and Ge Z. On the horizon from the ORS: bio- materials for cartilage regeneration. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 22, no. 9, pp. 1–3, 2014.
3. Grassel S. and Lorenz J. Tissue-engineering strategies to repair chondral and osteochondral tissue in osteoarthritis: use of mesenchymal stem cells. *Current Rheumatology Reports*, vol. 16, no. 10, p. 452, 2014.
4. Muir H: The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules*. *Bioessays* 1995, 17(12):1039-1048.
5. Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE: Differences between sub- populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res* 1988, 18(3):223-234.
6. McCarty DJ, Koopman WJ: *Arthritis and allied conditions*, 12th edn. Philadelphia, PA: Lea & Febiger; 1993.
7. Brower TD, Hsu WY: Normal articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1969, 64:9-17.
8. Aydelotte MB, Kuettner KE: Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect Tissue Res* 1988, 18(3):205-222.
9. Kobayashi K, Healey RM, Coutts RD, Amiel D: Changes in chondrocyte age in human knees. *49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society* 2003:566.
10. Weiss C, Rosenberg L, Helfet AJ: An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1968, 50(4):663-674.
11. Lane JM, Weiss C: Review of articular cartilage collagen research. *Arthritis Rheum* 1975, 18(6):553-562.
12. Minns RJ, Steven FS: The collagen fibril organization in human articular cartilage. *J Anat* 1977, 123(Pt 2):437-457.
13. Radin EL, Paul IL, Lowy M: A comparison of the dynamic force transmitting properties of subchondral bone and articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1970, 52(3):444-456.
14. Broom ND, Poole CA: A functional-morphological study of the tidemark region of articular cartilage maintained in a non-viable physiological condition. *J Anat* 1982, 135(Pt 1):65-82.

15. Redler I, Mow VC, Zimny ML, Mansell J: The ultrastructure and biomechanical significance of the tidemark of articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 1975(112):357-362.
16. Bonde HV, Talman ML, Kofoed H: The area of the tidemark in osteoarthritis-- a three-dimensional stereological study in 21 patients. *APMIS* 2005, 113(5):349-352.
17. Brower TD, Akahoski Y, Orlic PL: Diffusion of dyes through articular cartilage in vivo. *J Bone Joint Surg [Am]* 1962, 44:456-463.
18. Kuettner KE: Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992, 25(3):155-163.
19. Poole CA, Ayad S, Gilbert RT: Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci* 1992, 103 (Pt 4):1101-1110.
20. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW: Morphological and functional interrelationships of articular cartilage matrices. *J Anat* 1984, 138 (Pt 1):113- 138.
21. Poole CA, Glant TT, Schofield JR: Chondrons from articular cartilage. (IV). Immunolocalization of proteoglycan epitopes in isolated canine tibial chondrons. *Histochem Cytochem* 1991, 39(9):1175-1187.
22. Poole CA, Flint MH, Beaumont BW: Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages. *J Orthop Res* 1987, 5(4):509-522.
23. Ross JM, Sherwin AF, Poole CA: In vitro culture of enzymatically isolated chondrons: a possible model for the initiation of osteoarthritis. *J Anat* 2006, 209(6):793-806.
24. Freeman MAR: Adult articular cartilage, 2nd edn. Turnbridge Wells, England: Pitman Medical; 1979.
25. Eyre DR, Wu JJ, Woods PE: The cartilage collagens: structural and metabolic studies. *J Rheumatol Suppl* 1991, 27:49-51.
26. Eyre D: Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002, 4(1):30-35.
27. Hardingham TE, Muir H: Hyaluronic acid in cartilage and proteoglycan aggregation. *Biochem J* 1974, 139(3):565-581.
28. O'Hara BP, Urban JP, Maroudas A: Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1990, 49(7):536-539.
29. Kuettner KE: Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem* 1992, 25(3):155-163.

30. Browne JE, Branch TP: Surgical alternatives for treatment of articular cartilage lesions. *J Am Acad Orthop Surg* 2000, 8(3):180-189.
31. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG: Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997, 13(4):456-460.
32. Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE: Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front Biosci* 2006, 11:529-543.
33. Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schunke M: Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury. *Ann Anat* 2005, 187(5-6):473-485.
34. Nestic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P: Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2006, 58(2):300-322.
35. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002, 39(1-2):237-246.
36. Saklatvala J: Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986, 322(6079):547-549.
37. Borrelli J, Jr., Ricci WM: Acute effects of cartilage impact. *Clin Orthop Relat Res* 2004(423):33-39.
38. Martin JA, Buckwalter JA: Post-traumatic osteoarthritis: the role of stress induced chondrocyte damage. *Biorheology* 2006, 43(3-4):517-521.
39. Vrahas MS, Mithoefer K, Joseph D: The long-term effects of articular impaction. *Clin Orthop Relat Res* 2004(423):40-43.
40. Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 1998, 47:487-504.
41. Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M: Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 2002, 18(7):730-734.
42. Hunziker EB: Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002, 10(6):432-463.
43. Farnworth L: Osteochondral defects of the knee. *Orthopedics* 2000, 23(2):146-157; quiz 158-149.
44. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, et al. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* 2002;9:12-20

45. Breinan HA, et al. Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. *J Orthop Res* 2000;18:781-789.
46. Breinam H, et al. Autologous chondrocyte implantation in a canine model: change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res* 2001;19:482-492.
47. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, et al. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg* 1999;28:242-255.
48. Farmer JM, et al. . Chondral and osteochondral injuries. Diagnosis and management. *Clin Sports Med* 2001;20:299-319.
49. Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, et al. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2001:S337-348.
50. Masri M¹, Lombardero G, Velasquillo C, Martínez V, Neri R, Villegas H, Ibarra C. Matrix-encapsulation cell-seeding technique to prevent cell detachment during arthroscopic implantation of matrix-induced autologous chondrocytes. *Arthroscopy*. 2007 Aug;23(8):877-83.
51. Ibarra C, Izaguirre A, Villalobos E, Masri M, Lombardero G, Martinez V, Velasquillo C, Meza AO, Guevara V, Ibarra LG. Follow-up of a new arthroscopic technique for implantation of matrix-encapsulated autologous chondrocytes in the knee. *Arthroscopy*. 2014 Jun;30(6):715-23. doi: 10.1016/j.arthro.2014.02.032. Epub 2014 Apr 18.
52. Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In Search of the in vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 2008.
53. Rebelatto CK, Aguiar AM, Moretao MP, et al. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;233:901-913.
54. Hwang NS, Varghese S, Elisseff J. Controlled differentiation of stem cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:199-214.
55. Fan X, Liu T, Liu Y, et al. Optimization of primary culture condition for mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood with factorial design. *Biotechnol Prog* 2009;25:499-507.
56. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-2749.

57. Carpenter RS, Goodrich LR, Frisbie DD, et al. Osteoblastic differentiation of human and equine adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells when BMP-2 or BMP-7 homodimer genetic modification is compared to BMP-2/7 heterodimer genetic modification in the presence and absence of dexamethasone. *J Orthop Res*;28:1330-1337.
58. Chondrocytic differentiation of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells for future therapeutic applications in horses. Pineda Abraham¹, Masri María¹, Gómez Ricardo², Velasquillo Cristina, Ibarra Clemente². (Cartel) ICRS 2010 - 9th World Congress of the International Cartilage Repair Society' Septiembre 26 - 29, 2010 Sitges – Barcelona, España.
59. Isolation and characterization of bone marrow-derived equine mesenchymal stem cells for future therapeutic application in horses. Pineda Abraham, Masri María, Gómez Ricardo, Landa Carlos, Velasquillo Cristina, Ibarra Clemente. (Cartel) The TERMIS-EU 2010 Annual Conference & Exposition 13-17 de junio de 2010. Galway Irlanda.
60. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M: Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008, 14(2):199-215.
61. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A: Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol* 2005, 203(3):465-470.
62. Gillogly SD, Voight M, Blackburn T: Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998, 28(4):241-251.
63. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Houghton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B et al: The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 6):889- 897.
64. Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, D'Lima DD, Lotz MK: Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009, 11(3):R85.
65. R. Sánchez-Sánchez, E. Martínez-Arredondo, V. Martínez-López, Y. Melgarejo-Ramírez, A. Brena-Molina, H. Lugo-Martínez, R. Gómez-García, D. Garcíadieago-Cázares, P. Silva-Bermúdez, E. Márquez-Gutiérrez, C. Ibarra, and C. Velasquillo Development of Hydrogel with Anti-Inflammatory Properties Permissive for the Growth of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells *Journal of Nanomaterials* Volume 2016, Article ID 8654937, 8 pages
66. R. Serrato-Millán , L. Medina-Torres *, F. Calderas , B.L. España-Sánchez , M. Estevez , A.R. Hernandez-Martínez , M. Cruz-Soto , I.C. Sánchez , R. Gómez-García , I. Sánchez-Betancourt , M.C. Velasquillo-Martínez and G. Luna-Bársenas. Rheology and gel point of the enzymatic hydrolysis of urea in the presence of urease presence of urease Korea-Australia Rheology Journal, 29(1), 1-7 (February 2017)

67. Brittberg M: Autologous chondrocyte transplantation. Clin Orthop Relat Res 1999(367 Suppl):S147-155.
68. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 1994, 331(14):889-895.
69. Pei M, He F, Boyce BM, Kish VL: Repair of full-thickness femoral condyle cartilage defects using allogeneic synovial cell-engineered tissue constructs. Osteoarthritis Cartilage 2009, 17(6):714-722.
70. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999, 284(5411):143-147.
71. De Bari C, Dell'Accio F, Luyten FP: Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. Arthritis Rheum 2001, 44(1):85-95.
72. Deasy BM, Jankowski RJ, Huard J: Muscle-derived stem cells: characterization and potential for cell-mediated therapy. Blood Cells Mol Dis 2001, 27(5):924-933.
73. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng 2001, 7(2):211-228.
74. Pei M, He F, Kish VL, Vunjak-Novakovic G: Engineering of functional cartilage tissue using stem cells from synovial lining: a preliminary study. Clin Orthop Relat Res 2008, 466(8):1880-1889.
75. Pei M, He F, Vunjak-Novakovic G: Synovium-derived stem cell-based chondrogenesis. Differentiation 2008, 76(10):1044-1056.
76. Fortier LA¹, Nixon AJ, Williams J, Cable CS. Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Am J Vet Res. 1998 Sep;59(9):1182-7.
77. Nixon AJ¹, Brower-Toland BD, Bent SJ, Saxer RA, Wilke MJ, Robbins PD, Evans CH. Insulinlike growth factor-I gene therapy applications for cartilage repair. Clin Orthop Relat Res. 2000 Oct;(379 Suppl):S201-13.
78. Worster AA¹, Brower-Toland BD, Fortier LA, Bent SJ, Williams J, Nixon AJ. Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix. Orthop Res. 2001 Jul;19(4):738-49.

79. Saito S¹, Ugai H, Sawai K, Yamamoto Y, Minamihashi A, Kurosaka K, Kobayashi Y, Murata T, Obata Y, Yokoyama K. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. *FEBS Lett.* 2002 Nov 20;531(3):389-96.
80. Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet J.* 2003 Jan;35(1):99-102.
81. Hegewald AA¹, Ringe J, Bartel J, Krüger I, Notter M, Barnewitz D, Kaps C, Sittinger M. Hyaluronic acid and autologous synovial fluid induce chondrogenic differentiation of equine mesenchymal stem cells: a preliminary study. *Tissue Cell.* 2004 Dec;36(6):431-8.
82. Carstanjen B¹, Desbois C, Hekmati M, Behr L. Successful engraftment of cultured autologous mesenchymal stem cells in a surgically repaired soft palate defect in an adult horse. *Can J Vet Res.* 2006 Apr;70(2):143-7.
83. Dominici M¹, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7.
84. Martinez-Agosto JA¹, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev.* 2007 Dec 1;21(23):3044-60.
85. Roberto Berebichez-Fridman, Ricardo Gómez-García, Julio Granados-Montiel, Enrique Berebichez-Fastlicht, Anell Olivos-Meza, Julio Granados, Cristina Velasquillo, and Clemente Ibarra. The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells—Their Current Uses and Potential Applications. *Stem Cells International*, Volume 2017, Article ID 2638305, 14 pages
86. Nixon AJ¹, Rickey E², Butler TJ³, Scimeca MS², Moran N³, Matthews GL³. A chondrocyte infiltrated collagen type I/III membrane (MACI[®] implant) improves cartilage healing in the equine patellofemoral joint model. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015 Apr;23(4):648-60.
87. Xie L¹, Zhang N, Marsano A, Vunjak-Novakovic G, Zhang Y, Lopez MJ. In vitro mesenchymal trilineage differentiation and extracellular matrix production by adipose and bone marrow derived adult equine multipotent stromal cells on a collagen scaffold. *Stem Cell Rev.* 2013 Dec;9(6):858-72.
88. Gómez-García R, Berebichez-Fridman R, Martínez-López V, Masri M, Ibarra C. Evaluation of Cartilage Tissue Constructs Using Equine Mesenchymal Stem Cells Seeded on Biocompatible Scaffolds. *CATB-D-15-455957*
89. Bernardini G¹, Chellini F, Frediani B, Spreafico A, Santucci A. Human platelet releasates combined with polyglycolic acid scaffold promote chondrocyte differentiation and phenotypic maintenance. *J Biosci.* 2015 Mar;40(1):61-9.

90. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, Khan IM, Rooney P, Evans DJ, Houghton L, Bayram Z, Boyer S, Thomson B et al: The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 2004, 117(Pt 6):889- 897.
91. Grogan SP, Miyaki S, Asahara H, D'Lima DD, Lotz MK: Mesenchymal progenitor cell markers in human articular cartilage: normal distribution and changes in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009, 11(3):R85.
92. Ranera B¹, Lyahyai J, Romero A, Vázquez FJ, Remacha AR, Bernal ML, Zaragoza P, Rodellar C, Martín-Burriel I. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet Immunol Immunopathol*. 2011 Nov 15;144(1-2):147-54.
93. Christensen BB, Foldager CB, Hansen OM, Kristiansen AA, Le DQ, Nielsen AD, Nygaard JV, Bünger CE, Lind M. A novel nanostructured porous polycaprolactone scaffold improves hyaline cartilage repair in a rabbit model compared to a collagen type I/III scaffold: in vitro and in vivo studies. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012 Jun;20(6):1192-204. doi: 10.1007/s00167-011-1692-9. Epub 2011 Oct 5.
94. Niemeyer P, Pestka JM, Kreuz PC, Erggelet C, Schmal H, Suedkamp NP, Steinwachs M. Characteristic complications after autologous chondrocyte implantation for cartilage defects of the knee joint. *Am J Sports Med* 2008 36:2091–2099
95. Russlies M, Ruther P, Koller W, Stomberg P, Behrens P. Biomechanical properties of cartilage repair tissue after different cartilage repair procedures in sheep. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* (2003) 141:465–471
96. Sánchez-Sánchez R¹, Brena-Molina A, Martínez-López V, Melgarejo-Ramírez Y, Tamay de Dios L, Gómez-García R, Reyes-Frías Mde L, Rodríguez-Rodríguez L, Garcíadiago-Cázares D, Lugo-Martínez H, Ibarra C, Martínez-Pardo ME, Velasquillo-Martínez C. Generation of Two Biological Wound Dressings as a Potential Delivery System of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *ASAIO J*. 2015 Nov-Dec;61(6):718-25. doi: 10.1097/MAT.0000000000000277.
97. Nikolay I, Yaegaki K, Calenic B, et al. Deciduous and Permanent Dental Pulp Mesenchymal Cells Acquire Hepatic Morphologic and Functional Features In Vitro. *J Endod*. 2010;(October 2016). doi:10.1016/j.joen.2009.12.022.
98. Landa-Solís C, Granados-Montiel J, Olivos-Meza A, Ortega-Sánchez C, Cruz-Lemini M, Hernández-Flores C, Chang-González ME, García RG, Olivos-Díaz B, Velasquillo-Martínez MC, Pineda C, Ibarra C. Cryopreserved CD90+ cells obtained from mobilized peripheral blood in sheep: a new source of mesenchymal stem cells for preclinical applications. *Cell Tissue Bank*. 2016 Mar;17(1):137-45. doi: 10.1007/s10561-015-9526-5. Epub 2015 Jul 29.
99. Guest DJ¹, Ousey JC, Smith MR. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Cloning*. 2008 Nov 2;1:1-9.

100. Radcliffe CH¹, Flaminio MJ, Fortier LA. Temporal analysis of equine bone marrow aspirate during establishment of putative mesenchymal progenitor cell populations. *Stem Cells Dev.* 2010 Feb;19(2):269-82.
101. Pascucci L¹, Curina G, Mercati F, Marini C, Dall'Aglio C, Paternesi B, Ceccarelli P. Flow cytometric characterization of culture expanded multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from horse adipose tissue: towards the definition of minimal stemness criteria. *Vet Immunol Immunopathol.* 2011 Dec 15;144(3-4):499-506.
102. Koerner J¹, Nesic D, Romero JD, Brehm W, Mainil-Varlet P, Grogan SP. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2006 Jun;24(6):1613-9.

Anexos

Anexo 1 Procesamiento de muestras de médula ósea por gradiente de densidad.

1.- El procedimiento se debe relizar de manera estéril dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA).

2.- Se vierte la muestra en tubos de polipropileno para centrífuga con capacidad de 50 ml. Y se realiza una dilución 1:4 en solución salina fosfatada (PBS) [Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA].

3.- A si mismo tiempo se debe preparar en tubos nuevos de 50 ml (cat. CLS430829 Corning) Ficoll Paque^{MR} (GE, Healthcare)

4.- Se debe vertir la muestra diluida de sangre y PBS; en el tubo que tiene el ficoll cuidando que no se mezcle; posteriormente se centrifugar a 400 x g por 30 minutos.

5.- Después de la centrifugación se pueden observar 4 fracciones; en el fondo del tubo quedan los eritrocitos, la siguiente fracción es el Ficoll Paque, sigue la capa de células linfoides y el sobrenadante que consiste en un poco de suero con PBS.

6.- Se procede a eliminar el sobrenadante para recuperar las células que quedan en la interface linfoide de preferencia utilizar una micropipeta de 1000 μ l; se colocan en tubos nuevos.

7.- Ya que al obtener la interface celular se arrastra suero y Ficoll Paque es necesario diluir la suspensión celular en PBS para posteriormente centrifugarla a 200 x g por 10 minutos, para eliminar el sobrenadante. (repetir 3 veces este paso)

8.- Se procede al conteo celular (Cámara de Neubauer)



Anexo 2 Procedimiento de conteo con cámara de Neubauer.

El azul tripano (Invitrogen, Carlsbad, California) es un compuesto hidrofílico el cual 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 al colorante.

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

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

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

Anexo 3 Procedimiento para marcaje de células por citometría de flujo.

1.-De la muestra de suspensión celular, se toman 100 000 células las cuales se resuspenden en 200 uL de PBS utilizando tubos de poliestireno de 5 ml (Falcon, Becton Dickinson)

2.- Se añaden 10 uL de la suspensión de anticuerpos.

Nota: los anticuerpos utilizados en este proyecto fueron anticuerpos monoclonales dirigidos para los antígenos de superficie CD34, CD45, CD47, CD14, CD117, CD90, CD73 (BD Pharmingen™ wwwbdbiosciences.com).

3.- Las muestras se dejan incubando por 15 minutos en el refrigerador a 4°C.

4.- Los tubos se centrifugan para eliminar el exceso de anticuerpo 10 minutos a 300 g.

5.- Se resuspenden las muestras en Solución Salina Buferada a PH 7.4.

6.- Después de este período se procede a su lectura utilizando el software de análisis del Citómetro FACS Calibur.

En este proyecto los datos fueron analizados con el software Cell Quest PRO™ (Becton Dickinson). La emisión de fluoresceína (FITC) se midió en FL1, PE en FL2, APC en FL3, y 7-AAD en FL4. Una media de 75,000 eventos fueron analizados con una emisión de laser de 88nm. Este método analiza una región de la muestra (R1) representada por ejemplo por las células CD34+ seguida por las células CD90+ de la misma región (R2).

Anexo 4 Tablas para la interpretación de análisis estadísticos.

Anexo (Gráfica 1) Análisis estadístico de la expresión de antígenos de superficie durante la fase de expansión celular.

Tukey HSD test; variable **0-CD105** (%) (Bone Marrow Cells) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 22.896, df = 27.000

	Sample	{1}	{2}	{3}
1	Primary culture		0.186159	0.001927
2	Second Pass	0.186159		0.121028
3	Third Pass	0.001927	0.121028	

Cuadro1. Análisis de la expresión del marcador CD105 obtenido del marcaje de las células en cultivo primario, segundo pase y tercer pase. ($p < 0.05$).

Tukey HSD test; variable **0-CD73** (%) (Bone Marrow Cells) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 99.477, df = 27.000

	Sample	{1}	{2}	{3}
1	Primary culture		0.000127	0.000793
2	Second Pass	0.000127		0.000138
3	Third Pass	0.000793	0.000138	

Cuadro 2. Análisis de la expresión del marcador CD73 obtenido del marcaje de las células en cultivo primario, segundo pase y tercer pase. ($p < 0.05$).

Tukey HSD test; variable 0-**CD90** (%) (Bone Marrow Cells) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 9.7790, df = 27.000

	Sample	{1}	{2}	{3}
1	Primary culture		0.000127	0.000127
2	Second Pass	0.000127		0.000127
3	Third Pass	0.000127	0.000127	

Cuadro 3. Análisis de la expresión del marcador CD90 obtenido del marcaje de las células en cultivo primario, segundo pase y tercer pase. ($p < 0.05$).

Tukey HSD test; variable 0-**CD45** (%) (Bone Marrow Cells) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .13529, df = 27.000

	Sample	{1}	{2}	{3}
1	Primary culture		0.000127	0.000127
2	Second Pass	0.000127		0.990275
3	Third Pass	0.000127	0.990275	

Cuadro 4. Análisis de la expresión del marcador CD45 obtenido del marcaje de las células en cultivo primario, segundo pase y tercer pase. ($p < 0.05$).

Tukey HSD test; variable 0-**CD34** (%) (Bone Marrow Cells) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 2.0622, df = 27.000

	Sample	{1}	{2}	{3}
1	Primary culture		0.000127	0.705130
2	Second Pass	0.000127		0.000127
3	Third Pass	0.705130	0.000127	

Cuadro 5. Análisis de la expresión del marcador CD34 obtenido del marcaje de las células en cultivo primario, segundo pase y tercer pase. ($p < 0.05$).

Tukey HSD test; variable 0-**CD14** (%) (Bone Marrow Cells) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = .02655, df = 27.000

	Sample	{1}	{2}	{3}
1	Primary culture		0.482956	0.008734
2	Second Pass	0.482956		0.000536
3	Third Pass	0.008734	0.000536	

Cuadro 6. Análisis de la expresión del marcador CD14 obtenido del marcaje de las células en cultivo primario, segundo pase y tercer pase. ($p < 0.05$).

Tukey HSD test; variable Número de Células (Spreadsheet1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 53.190, df = 14.000

	Andamio	Cartilago	PGA día 0	PGA día 7	PGA día 14	Coll día 0	Coll día 7	Coll día 14
1	Cartilago		0.000174	0.000404	0.014927	0.000174	0.000174	0.995145
2	PGA día 0	0.000174		0.000174	0.000174	0.999842	0.000175	0.000174
3	PGA día 7	0.000404	0.000174		0.310625	0.000174	0.006033	0.000872
4	PGA día 14	0.014927	0.000174	0.310625		0.000174	0.000264	0.045341
5	Coll día 0	0.000174	0.999842	0.000174	0.000174		0.000174	0.000174
6	Coll día 7	0.000174	0.000175	0.006033	0.000264	0.000174		0.000174
7	Coll día 14	0.995145	0.000174	0.000872	0.045341	0.000174	0.000174	

Cuadro 7. Anexo Gráfica 2. Análisis de varianza del número de células sembradas sobre los polímeros a diferentes tiempos de cultivo. ($p < 0.05$).

Tukey HSD test; variable **PGA** (polimeros) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 12.915, df = 54.000

	Polimero	In Vitro Sox9	In Vivo Sox9	In Vitro Coll 2	In Vivo Coll 2	In Vitro Agg	In Vivo Agg
1	In Vitro Sox9		0.000148	0.000138	0.000138	0.000140	0.000138
2	In Vivo Sox9	0.000148		0.951829	0.000138	0.999055	0.550707
3	In Vitro Coll 2	0.000138	0.951829		0.000138	0.996115	0.964728
4	In Vivo Coll 2	0.000138	0.000138	0.000138		0.000138	0.000138
5	In Vitro Agg	0.000140	0.999055	0.996115	0.000138		0.780154
6	In Vivo Agg	0.000138	0.550707	0.964728	0.000138	0.780154	

Cuadro 8. Anexo Gráfica 3. Análisis de varianza donde se analiza la presencia de marcadores de tejido condral en las construcciones de PGA *in vitro* comparando la expresión con los neotejidos *in vivo*. ($p < 0.05$).

Tukey HSD test; variable **Coll** (polimeros) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 12.126, df = 54.000

	Polimero	In Vitro Sox9	In Vivo Sox9	In Vitro Coll 2	In Vivo Coll 2	In Vitro Agg	In Vivo Agg
1	In Vitro Sox9		0.756809	0.000140	0.000156	0.756809	0.516254
2	In Vivo Sox9	0.756809		0.000138	0.000138	0.092577	0.998886
3	In Vitro Coll 2	0.000140	0.000138		0.992133	0.000460	0.000138
4	In Vivo Coll 2	0.000156	0.000138	0.992133		0.002317	0.000138
5	In Vitro Agg	0.756809	0.092577	0.000460	0.002317		0.036203
6	In Vivo Agg	0.516254	0.998886	0.000138	0.000138	0.036203	

Cuadro 9. Anexo Gráfica 3. Análisis de varianza donde se analiza la presencia de marcadores de tejido condral en las construcciones de colágena *in vitro* comparando la expresión con los neotejidos *in vivo*. ($p < 0.05$).