



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”**

Aislamiento y Caracterización de Células Troncales
Mesenquimales Obtenidas a Partir de la Articulación de Rodilla
y Cadera, en Pacientes con Osteoartrosis: Estudio Piloto

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA
VÍCTOR HUGO CÁRDENAS SORIA**

**TUTOR PRINCIPAL
VÍCTOR MANUEL ILIZALITURRI SÁNCHEZ
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION “LUIS GUILLERMO
IBARRA IBARRA”**

**ASESORES
D. EN C. ANELL OLIVOS MEZA
D. EN C. CARLOS LANDA SOLIS
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACION “LUIS GUILLERMO
IBARRA IBARRA”**

CIUDAD DE MEXICO, FEBRERO DE 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.

TUTOR PINCIPAL

VO.BO DR. VÍCTOR MANUEL ILIZALITURRI SÁNCHEZ

Jefe de División

Médico Adscrito al Departamento de Cirugía Articular

Instituto Nacional de Rehabilitación

“Luis Guillermo Ibarra Ibarra”

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores, Nivel I

Vichip2002@yahoo.com.mx

COORDINADORA

**DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO DE LA UNAM Y
RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADEMICA**

VO.BO. DRA. MARGARITA VALDÉS FLORES

Médico Adscrito al Departamento de Genética, INR “LGII”

Doctora en Ciencias Médicas

Miembro del sistema Nacional de Investigadores Nivel I

mvaldes@inr.gob.mx

COLABORADORES

D. en C. CARLOS LANDA SOLÍS
Investigador en Ciencias Médicas “C”
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.
cls_73@hotmail.com

DRA. ANELL OLIVOS MEZA
Médico Adscrito Ortopedia del Deporte y Artroscopia
Doctora en Ciencias Médicas
Miembro del Sistema Nacional de Investigadores Nivel I
aolivos_meza@hotmail.com

DEDICATORIA

Dedicado a mi esposa María Rene y Familia con todo mi amor y esfuerzo. Gracias por todo su tiempo y apoyo

Agradecer a CONACYT por la beca de apoyo económico hacia mi persona durante los dos últimos años.

Lista de Abreviaturas viii

Agrecano	AGR.
Células Troncales Mesenquimales	CTM
Colágena I	COL I
Colágena II	COL II
Grados centígrados	°C
Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra	INR LGII
Líquido Sinovial	LS
Liproteína Lipasa	LPL
Medio de Eagle modificado por Dulbecco	DMEM
Médula ósea	MO
Microgramos	µg
Mililitros	ml
Nanogramos	ng
Osteoartritis	OA
Osteocalcina	OCN
Osteopontina	OPN
Solución amortiguadora de fosfatos	PBS
Unidad de ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa	UITTC
Factor estimulante de colonias de granulocitos	G-CGF
Factor de estimulación de colonias de granulocitos y monocitos	GM-CSF
Factor estimulante de colonias de granulocitos	G-CSF
Factor de estimulación de colonias de monocitos	M-CSF

CONTENIDO

	Página
Resumen	6
Antecedentes	7
Características del cartílago articular	8
Generalidades de las células troncales	9
Células troncales mesenquimales	11
Justificación	16
Planteamiento del problema	18
Pregunta de investigación	19
Hipótesis	20
Objetivos	20
Objetivo general	20
Objetivos específicos	20
Material y métodos	21
Diseño de estudio	21
Tamaño de la muestra	21
Instalaciones	21
Diseño experimental	21
Criterios de inclusión	22
Criterios de exclusión	22
Criterios de eliminación	22
Descripción de las variables de estudio	23
Descripción de la intervención	24
Obtención de la muestra de líquido sinovial	25
Preparado del medio de cultivo	25
Transporte de muestra a laboratorio	26
Determinación de fenotipo por citometría	27
Sembrado de la muestra de líquido sinovial	28
Control de proliferación celular	28
Diferenciación a las tres líneas celulares	29
Inmunofluorescencia	32
Análisis estadístico	32
Aspectos éticos	32
Resultados	36
Discusión	45
Conclusiones	48
Perspectivas	48
Referencias bibliográficas	49

Resumen

Introducción

Según la Organización Mundial de Salud la Osteoartritis OA es un problema de salud pública que podría llegar a ser la cuarta causa global de discapacidad para 2020. Aproximadamente el 50% de los pacientes con práctica deportiva desarrollan OA en un lapso de 5 a 15 años después de la lesión y no existen tratamientos farmacológicos que modifiquen el curso de la enfermedad. Por lo tanto, resulta de suma importancia generar nuevas estrategias de tratamiento de OA. El propósito del presente estudio fue aislar células troncales mesenquimales (CTMs) a partir de líquido sinovial (LS) de articulación de rodilla y cadera, para posteriormente en cultivo *in vitro* con medio condicionado, diferenciarlas a condrocitos.

Objetivo

Aislar y caracterizar células troncales mesenquimales obtenidas a partir de líquido sinovial de las articulaciones de rodilla y cadera de pacientes con osteoartrosis, cultivarlas y diferenciarlas *in vitro* a las tres líneas celulares, condrogénica, osteogénica y adipogénica.

Material y métodos

A partir de articulación de rodilla y cadera de 12 pacientes programados para procedimientos artroscópicos y artroplastia total de cadera, se obtuvieron muestras de líquido sinovial, posteriormente a ser sembradas en cajas de cultivo celular, en medio DMEM suplementado con 20% de suero antólogo humano, por 25 días y alcanzar confluencia superior al 80%, fueron diferenciadas a las tres líneas celulares condrogénica adipogénica, osteogénica, utilizando medio de cultivo condicionado. Finalmente se realizó tinciones celulares para condrocitos con azul alciano, para adipocitos con rojo oleoso O, y osteocitos con fosfatasa alcalina. Además de Inmunofluorescencia.

Resultados

De la muestra de líquido sinovial de articulación de cadera y rodilla, se obtuvieron 2.29×10^6 células (rango de 4.59×10^6 a 2.05×10^5), obteniéndose más células en el grupo de articulación de rodilla 2.48×10^6 (rango de 4.59×10^6 a 8×10^5), con viabilidad 61%, en relación a articulación de cadera 1.97×10^6 (rango de 2.6×10^6 a 2×10^5) con viabilidad del 49.7%. Se lograron diferenciar a la línea condral, esto evaluado mediante inmunofluorescencia para Agregano (AGR) Colágena tipo II (COLII), tejido óseo identificando RUNX2 y Osteopontina.

Conclusiones.

Es factible establecer un modelo preclínico de diferenciación *in vitro* de CTMs de LS a condrocitos, disminuyendo riesgos de administración medicamentosa previa.

I. Antecedentes

Los defectos osteocondrales pueden progresar a la osteoartritis (OA), causando dolor e incapacidad.(1) Se conoce que el 30% de la población adulta de los Estados Unidos de América se encuentra afectada por algún tipo de dolor articular. (2) La prevalencia de muchas de estas condiciones se incrementan de forma significativa con la edad, como con factores asociados como la obesidad o la falta de actividad física. (2)

Según la Organización Mundial de la Salud, la Osteoartritis (OA) es un problema creciente de salud pública que podría llegar a ser la cuarta causa global de discapacidad para 2020.(3)

Las lesiones de cartílago articular están presentes en más de 60% de los procedimientos artroscópicos, y se ha demostrado que estas lesiones afectan la calidad de vida. (4–6) (**Tabla. 1**)

La incidencia de OA secundaria ha aumentado por lesiones intra-articulares por práctica deportiva, así como por fracturas y reumatismos articulares en poblaciones de adultos jóvenes. Aproximadamente el 50% de estos pacientes desarrollan OA en un lapso de 5 a 15 años después de la lesión, actualmente no existen medicamentos que modifiquen el curso de la enfermedad. (7)

Las articulaciones sinoviales están compuestas por cartílago hialino que cubre cada extremo de los huesos largos, lo cual les permite tener una movilidad libre, así como una estructura y función altamente especializada. Sin embargo, este les hace susceptibles a múltiples patologías, particularmente enfermedades degenerativas como la OA. (5)

El manejo de la OA está encaminado a disminuir la inflamación y el dolor, mejorar la función articular y corregir quirúrgicamente las alteraciones de eje mecánico y/o inestabilidad, llegando al reemplazo articular protésico y hasta la artrodesis. (8)

Autor/País (#Artroscopias)	Curl USA (31,516)	Widuchowski Poland (25,124)	Hjelle Norway (1000)	Aröen Norway (993)	INR México (1309)
Prevalencia de defectos de cartílago (%)	63	60	61	65	61
Edad	43	-	39	36	37
1ra localización	CFM	PF	CFM	CFM	PF
2da localización	PF	CFM	PF	PF	CFM
1ra lesión asociada	Menisco	Menisco	Menisco	-	Menisco
2nd Lesión asociada	LCA	LCA	LCA	-	LCA
Candidatos para reparo biológico (%)	4	9	-	11	7

Tabla 1- Prevalencia de lesiones condrales en artroscopias de rodilla en diversos países, incluido México, en el Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”

I.I Características del cartílago articular

La integridad del cartílago es esencial para la adecuada función articular. La unidad funcional de cartílago articular son los “condrocitos” los cuales sólo son cerca del 2% del total del cartílago. Además, está compuesto por un matriz extracelular (MEC) compuesta de agua en un 75%, fibras de colágena en un 15% y proteoglicanos en un 10%.⁽⁹⁾

La habilidad de MEC para almacenar agua es debida a la carga negativa de los proteoglicanos con los cual atraen cationes de sodio (Na+) y por ende, moléculas de agua, hidratando la matriz del cartílago,⁽⁹⁾ además de que producen colágena tipo II que presenta una estructura de triple hélice y le confiere una gran capacidad de flexión y extensión, sin embargo también se encuentran fibras de colágena tipo VI, IX, XI, XII y XIV, ⁽¹⁰⁾ se ha detectado la expresión de colágena tipo I hasta 21 días de mantener en cultivo primario a condrocitos humanos. ⁽¹¹⁾

Estructuralmente presenta diferentes arreglos. A nivel microscópico se divide en tres zonas no mineralizadas y una mineralizada. La zona superficial donde hay una capa acelular la cual presenta gran contenido de proteoglicanos, por debajo de ésta hay otra capa con una alta densidad de condrocitos que son relativamente pequeños y alargados, donde casi no hay proteoglicanos y las fibras se encuentran posicionadas de manera paralela lo que impide el paso de grandes moléculas y células inflamatorias hacia los condrocitos. La zona de transición se caracteriza por presentar células alargadas y redondas, las fibras no presentan un arreglo especial y el contenido de glicosaminoglicanos es alto. En la zona profunda, las células son más largas, las fibras de colágena se arreglan de forma perpendicular y el contenido de agua es bajo. La zona calcificada, que es la última que compone al cartílago articular y es la que separa al cartílago del hueso subcondral. (9,10)

I.II Generalidades de las células troncales

Las células troncales son células indiferenciadas con capacidad de proliferación y auto-renovación. Por estas características, las células troncales son una excelente herramienta con gran potencial en la medida regenerativa. Las células troncales en diferentes etapas del desarrollo parecen tener diferentes capacidades de auto-renovación y diferenciación. A grandes rasgos existen dos tipos de células troncales: las células troncales embrionarias y las células troncales presentes en el tejido específico o somático en individuos adultos. Además, las células troncales se pueden clasificar de acuerdo con su plasticidad que se refiere a la capacidad de dicha célula de diferenciarse a diversas estirpes celulares. Se clasifican de la siguiente manera: totipotenciales, pluripotenciales multipotentes y en algunos textos se han definido como unipotenciales. (12)

Las células troncales totipotenciales son aquellas que son obtenidas en la etapa de preblastocisto en el desarrollo embrionario; son células indiferenciadas que pueden formar tanto las células que darán origen a un embrión como a las células que conforman al trofoblasto. Después de la

tercera división celular durante el desarrollo embrionario, las células comienzan a diferenciarse. La masa de células internas que forman al blastocisto son células pluripotenciales. (12)

Las células pluripotenciales son células que provienen del blastocisto, una etapa de pre-implantación durante el desarrollo embrionario. El blastocisto consiste en su interior en una masa de células internas, compuestas de 30 a 34 células, las cuales son pluripotentes. Tres factores de transcripción son conocidos por ser críticos para el mantenimiento de la pluripotencia, Oct-4, Nanog y Sox-2. Una de las limitaciones de estas células es que no pueden ser utilizadas en su estado indiferenciado directamente en los trasplantes celulares, ya que pueden producir teratomas. Otro problema es que su uso ha sido objetivo de controversias bioéticas al provenir de embriones de humano.

Con la obtención en el laboratorio de las células troncales pluripotenciales inducidas que son células somáticas como fibroblastos reprogramadas mediante la inducción de genes que contribuyen a la proliferación y mantenimiento de la pluripotencia (Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4). Estas células presentan un comportamiento similar a las células pluripotentes. Una de las limitaciones de estas células es que al ser reprogramadas pueden llegar a producir teratomas al ser implantadas en animales de experimentación en el laboratorio.(13)

Las células troncales presentes en tejidos específicos en individuos adultos se encuentran más restringidas en cuanto a su diferenciación hacia otras estirpes, por lo que se les denomina multipotentes;(12) sin embargo se ha reportado en la literatura que algunos tipos de células troncales adultas presentan factores críticos del mantenimiento de la pluripotencia como Oct3/4 y Sox2, por lo que se les puede denominar como pluripotentes.(14) Por otra parte las células unipotentes, a pesar de que son denominadas células troncales, no se les debería llamar así, ya que sólo cumplen con la condición de ser auto-renovables y, por lo tanto, no cumplen con los criterios mínimos para considerarse como células troncales.(12)

I.III Las células troncales mesenquimales.

En el siglo XIX, Tavassoli y Crosby,(15) demostraron el potencial osteogénico de la médula ósea (MO). Cohnheim, fue el primero que sugirió la presencia de las células no hematopoyéticas en la MO. Sin embargo, no fue hasta hace escasos 50 años que Friedenstein y cols,(16) lograron identificar dos tipos de células troncales.(13) Una de ellas y más abundante las denominaron células troncales hematopoyéticas y a la segunda población células troncales estromales, ya que se describieron como una unidad formadora de colonias fibroblásticas.(16) Después demostraron que dichas células eran capaces de generar células de hueso,(17) cartílago,(18) grasa y tejido conectivo fibroso.(16)(19,20) En 1991, Caplan denomina a estas células como células troncales mesenquimales (CTM).(18)

Las CTM no solo se encuentran en la MO también se han identificado en tejido adiposo,(21) sangre de cordón umbilical, sangre periférica movilizada,(22) líquido amniótico,(23) pulpa dentaria,(24) tendones,(25) vellosidades coriónicas,(26) membrana sinovial,(27) músculo esquelético,(28) entre otros. Las principales características de las CTM son las siguientes:(29)

1. Potencial de diferenciación a multilinaje en condiciones *in vitro* a diversos linajes celulares (hueso, cartílago, grasa, etc)
2. Disponibilidad en múltiples tejidos (MO, cordón umbilical, sangre periférica movilizada, placenta, tejido adiposo, etc.)
3. No causan reacción inmunológica. (30)

Fenotípicamente, las CTM expresan una serie de marcadores de superficie no específicos (CD73, CD90, CD105), que nos permiten diferenciar este tipo de células de otros tipos celulares por medio de citometría de flujo. Las CTM no expresan marcadores de superficie hematopoyéticos como: CD45, CD34,

CD14 o CD11. Tampoco expresan moléculas co-estimulantes como: CD80, CD86 o CD40. Se ha reportado que pueden existir diferencias mínimas en la expresión de ciertos marcadores entre las CTM humanas y de otra especie animal. (31)

Una de las propiedades de las CTM es la inmunosupresión, a pesar de que las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad humana (MHC-1) activan las células T, en ausencia de moléculas co-estimulantes, no se genera una respuesta secundaria y, por ende, las células T se encuentran anérgicas. (32) También se ha demostrado que las CTM tienen propiedades inmunomoduladoras que intervienen en la maduración y función de las células dendríticas. También se ha descrito que las CTM inhiben *in vitro* la proliferación de las células B, la diferenciación y quimiotaxis de las células inmunocompetentes.(33)

Una Célula Troncal Mesenquimal según el Comité de la Sociedad Internacional de Células Troncales Mesenquimales y Tejidos debe tener tres características indispensables: Adherencia y plasticidad (*in vitro*), expresar antígenos de superficie y una renovación continua. La adherencia y plasticidad se refiere a la condición que mantienen en el cultivo; los antígenos de superficie que deben tener son los positivos a: CD105, CD73, y CD90 y carecer o negativos a: CD45, CD34, CD11a y b, CD79 y HLA-DR, así como poder diferenciarse a: Osteoblastos, Condrioblastos y adipocitos de manera *in vitro*.(34)

I.IV Tratamiento de lesiones de cartílago articular.

Actualmente existen diferentes terapias para reparar el cartílago, entre las cuales se encuentra la micro-fractura, implantación de condrocitos autólogos, autoinjertos o aloinjertos osteocondrales. Pero ninguno de estos tratamientos ha demostrado restaurar la estructura natural y composición del cartílago. (1) Por ello desafortunadamente hasta nuestros días ningún tratamiento ha probado una adecuada estabilización, revertir lesiones, o prevenir el desarrollo de OA. (1)

En las últimas décadas, las células troncales mesenquimales (CTM) han demostrado ser muy útiles en la regeneración de tejido y en tratamiento de muchas enfermedades.(1)

Las CTM han sido identificadas en cartílago ya sea sano o patológico, se estudió su potencial regenerativo en cartílago en estudios *in vivo*.(1)

En la última década, el tejido sinovial y líquido sinovial han sido identificadas como fuente progenitora de células troncales mesenquimales. (CTM), que funcionalmente son distintas a las procedentes de médula ósea.(35–40)

Existen pruebas evidentes, de que estas células pueden ser utilizadas efectivamente para promover la reparación de tejido cartilaginoso.(35–41)

Las CTM provenientes de líquido sinovial se han reportado con un potencial condrogénico incrementado (12-13) comparadas a las CTM procedentes de médula ósea.

Evidencia de estudios realizados *in vivo* han demostrado en lesiones de cartílago articular de espesor parcial en conejos, se forma una capa de células que se extienden desde la membrana sinovial la que contribuye a la reparación del cartílago aun sin la presencia de inductores condrogenicos.(42,43)

Adicionalmente se ha demostrado que las CTM de membrana sinovial tienen la habilidad de vincularse directamente al cartílago en minutos, *ex vivo*, y son capaces de contribuir a la reparación de defectos en el cartílago. (43)

La terapia celular es una línea de investigación aún en desarrollo, es parte de la medicina regenerativa, por consecuencia es de reciente aparición, aunque este tipo de terapia ya se ha empezado a utilizar en la clínica. (44)

Para poder utilizar las células mesenquimales es necesario aislarlas del organismo y caracterizarlas; las técnicas descritas hasta ahora de punción de médula ósea como la que describe el doctor Verma es su artículo, son traumáticas para los pacientes y necesitan de estudios y logística para la manipulación de las muestras; de tal forma que un perfeccionamiento de la técnica representa un avance en el bienestar de los pacientes.(45)

Existen diversos métodos para obtener estas células, el procedimiento más común para la obtención de CTM es el aspirado de médula ósea, la técnica se puede llevar a cabo en los huesos. Planos (esternón, costillas, vertebras) y en huesos largos (fémur, humero). (46) Otra forma de aislamiento de las CTM puede hacerse en diferentes tejidos como:

- Periostio (34)
- Tejido Adiposo(34)
- Membrana Sinovial(34)
- Tejido musculo-esqueletico.(34)
- Pulmón.(34)
- Cordón Umbilical(34)
- Sangre Periférica(34)
- Piel(34)
- Orejas (34)
- Embrión (47)
- Gelatina de Wharton(47)
- Hígado fetal (47)

Lo complejo de estos procedimientos es que las CTM son una fracción muy pequeña del total de la población de células nucleadas. En investigaciones de la Dra. Fortier menciona que en (MO) del 0.001% al 0.01% de las células mononucleares aisladas son CTM. (48)

Existen, además, factores que estimulan la hematopoyesis, se mencionan cuatro factores de estimulación de colonias clásicas: Interleucina 3, Factor de estimulación de colonias de Granulocitos y monocitos (GM-CSF), Factor estimulante de Colonias de Granulocitos (G-CSF), Factor de Estimulación de Colonias de Monocitos (M-CSF o CSF-1). Estos son un grupo de glicoproteínas de bajo peso molecular y significativamente homólogo en las proteínas y en los niveles de nucleótidos. (49)

El factor de estimulación de colonias de granulocitos (G-CSF) es inducido de forma natural por la exposición a proteínas de paredes bacterianas,

endotoxinas y citosinas inflamatorias. El G-CSF lo podemos encontrar en dos presentaciones: endógeno y exógeno. (50)

El endógeno es producido por monocitos y macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células del estroma de la médula ósea. Y en G-CSF exógeno puede ser administrado vía intravenosa o subcutánea; su distribución principalmente es a médula ósea, glándulas adrenales, riñones e hígado. (50) Es un inmunomodulador que induce la proliferación y diferenciación de las células progenitoras de granulocitos, aumentando la producción de neutrófilos principalmente y acortando el tiempo que requieren los neutrófilos para madurar. (51)

II. Justificación

Las lesiones traumáticas del cartílago articular son muy incapacitantes y predisponen al desarrollo de OA temprana. La OA es en la actualidad un creciente problema de salud pública con un elevado costo económico para el paciente, su familia y con un gran impacto social, especialmente cuando afecta a pacientes en edad de trabajar, económicamente activos. En México en un estudio que se realizó en el servicio de Ortopedia del Deporte y Artroscopia del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”, encontramos una incidencia alta de lesiones condrales del 61%, durante 1309 artroscopias de rodilla consecutivas, que un 73% eran de grado severo III o IV del ICRS, en una población joven con una edad promedio de 37 años.(52) Es una patología que causa dolor crónico y puede llegar a provocar incapacidad funcional.(3)

En Estado Unidos se reporta que cerca de 46.4 millones de personas padecen OA. (7,53) Y se espera que el número de pacientes con OA pase de 2.9 millones (1991) a 6.5 millones (2030).(54)

Por esta razón, es importante generar estrategias que permitan la reparación de las lesiones del cartílago y evitar el progreso de la enfermedad articular.

El implante de condrocitos es una de las estrategias que actualmente se emplean para reparación del cartílago articular obtenido de biopsias de cartílago no dañado.(6) sin embargo este método se encuentra limitado por el tamaño de la lesión, que obliga al uso de abundantes condrocitos cuya expansión lleva a su desdiferenciación.

Las células troncales mesenquimales obtenidas para su uso en la terapéutica por medio de métodos menos invasivos, como es el empleo de factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos para la movilización de poblaciones celulares de médula ósea a sangre periférica; siendo este un método más sencillo y con menos riesgo para el paciente.(55)(49)(6)

La necesidad de obtener células mesenquimales para su uso en la terapéutica celular por medio de la generación de métodos menos invasivos, produce, la necesidad de explorar el uso de CTM procedentes de nuevas fuentes, líquido sinovial, siendo este un modelo más sencillo y con menos riesgos para el paciente. De modo que, al estandarizar un método más sencillo y menos invasivo, representa una mejora significativa en la terapia celular reduciendo el riesgo y complicaciones de la punción directa de la médula ósea, así como el uso del factor de crecimiento estimulante de colonias de granulocitos para la movilización de poblaciones celulares a sangre periférica.

III. Planteamiento de Problema

En años recientes la regeneración de cartílago se ha convertido en el “objetivo primordial” para la comunidad de la bioingeniería. Con el desarrollo de aproximaciones de ingeniería de tejidos se incluyen polímeros biodegradables y biocompatibles con hidrogeles o cerámicas entre otros andamios. Todos nichos apropiados para estimular la diferenciación condral de las CTM. El uso de CTM como alternativa celular promete la regeneración del tejido cartilaginoso dado que estas células pueden funcionar de dos maneras promoviendo la condrogénesis en una lesión condral; primeramente tiene la facultad de producir citocinas mediadoras de la respuesta inflamatoria reduciendo así la formación de tejido fibroso, en segundo lugar las CTM poseen la facultad de generar células condrales que produzcan matriz cartilaginosa, promoviendo la reparación de la superficie articular generando un tejido con propiedades biomecánicas equiparables a las del cartílago articular nativo

En el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INR-LGII), nuestra línea de investigación está enfocada en la regeneración del cartílago articular para evitar el proceso degenerativo de la osteoartritis. (56) El tratamiento de las lesiones condrales de la rodilla en pacientes jóvenes sobretodo, empleando condrocitos autólogos se ha convertido en una alternativa de tratamiento segura y beneficiosa en algunos países de Europa, Asia y Estados Unidos desde la década de los 90s. En México con apoyo de Conacyt nuestro grupo de investigación ha producido la técnica en ensayos clínicos controlados como parte de un estudio piloto para evaluar la Seguridad y Eficacia con resultados satisfactorios a corto y mediano plazo.

Sin embargo en este tratamiento se requieren la utilización de factor estimulante colonias de granulocitos, para movilizar CTM de médula ósea a

sangre periférica con los riesgos y limitaciones que conlleva. Como es evidente esta técnica aumenta el riesgo y el costo del tratamiento.

El propósito de este estudio es aislar CTM de líquido sinovial (LS), y caracterizarla a la línea celular condral, útil para la regeneración condral, como a las líneas celulares adipogénica, osteogénica.

Pregunta de Investigación

¿Será posible aislar y caracterizar Células Troncales Mesenquimales, que presenten características histológicas y bioquímicas similares al cartilago articular nativo, a partir de líquido sinovial de articulación de rodilla y cadera en pacientes con Osteoartrosis?

IV. Hipótesis

Las CTM humanas pueden ser obtenidas de líquido sinovial y ser diferenciadas a un fenotipo condral, manteniendo características histológicas y moleculares propias de condrocitos de cartílago articular en cultivo en monocapa.

V. Objetivos

A. General

Aislar células troncales mesenquimales obtenidas de líquido sinovial de articulación de rodilla y cadera, cultivarlas y diferenciarlas *in vitro* a un fenotipo condral, en pozos en monocapa, así como a línea osteogénica, y adipogénica, corroborando su morfología celular al término del proceso de diferenciación.

B. Específicos

- i. Determinar un método de toma de muestra, líquido sinovial, a partir de las articulaciones de rodilla y cadera de pacientes con osteoartrosis y aislamiento de células troncales.
- ii. Realizar citometría de flujo para caracterizar e identificar células troncales mesenquimales mediante la utilización de marcadores de superficie celular CD90, CD73, CD105.
- iii. Diferenciar *in vitro* las células troncales mesenquimales de articulaciones de rodilla y cadera obtenidas a partir de líquido sinovial y diferenciarlas a las tres líneas celulares (condrogénica, adipogénica, osteogénica)

VI. Material y Métodos

i. Diseño del estudio

Estudio Descriptivo, tipo piloto.

ii. Tamaño de la muestra

Al tratarse de un estudio preclínico piloto, no se considera de forma estricta estimar un tamaño específico de la muestra. Sin embargo de acuerdo a estudios similares dentro de la literatura, se han considerado un número de 12 muestras de líquido sinovial de pacientes entre 18 y 80 años de edad de los servicios de ortopedia del deporte y artroscopia y del servicio de Reconstrucción articular de cadera y rodilla(6) programados para procedimiento artroscópico o artroplastia total primaria de cadera, con el objetivo de valorar factibilidad y seguridad de los procedimientos a realizar.

iii. Instalaciones

Este proyecto de investigación se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología y Terapia Celular del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra”. (**Fig. 1**), con certificación ISO 900-2008, ubicada dentro del área blanca de quirófanos de la institución, a pocos metros del quirófano donde se realizaron los procedimientos de toma de muestra.

Además de los servicios de Ortopedia del Deporte y Artroscopia y Reconstrucción Articular de Cadera y Rodilla del adulto.

iv. Diseño Experimental

Estudio descriptivo, tipo piloto, se incluyeron 12 pacientes de ambos géneros con diagnóstico de OA, programados para cirugías de artroscopia de rodilla, y reemplazo articular total de cadera.

- Criterios de inclusión
 - Ambos géneros
 - Edad entre 18 a 80 años
 - Osteoartritis grados I a IV
 - Pacientes programados para artroscopia, artroplastia total de cadera.
- Criterios de exclusión
 - Enfermedades reumáticas
 - Artropatía por cristales
 - Artrosis generalizada
 - Artritis séptica
 - Proceso infeccioso general o localizado
 - Antecedentes de enfermedades o deficiencias del sistema hematopoyético.
- Criterios de eliminación
 - Contaminación de la muestra.
 - Muestras tomadas con derivados alcoholados o lidocaína
 - Coagulación de las muestras
 - Líquido sinovial con presencia de abundante sangre

v. Descripción de las variables de estudio

Variable	Definición de variable	Definición operativa	Tipo	Categoría
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento expresado en años	Tiempo de vida en años al momento del estudio registrado en el expediente.	Cuantitativa Continua	Años
Genero	Término biológico que denota al sexo	Características biológicas que definen mujer y hombre; registrado en el expediente.	Cualitativa Nominal Dicotómica	Masculino Femenino
Número de Células Aisladas	Unidad morfológica y funcional de todo ser vivo.	Número de células presentes en la muestra obtenida de líquido sinovial y médula ósea.	Cuantitativa Discreta	Numeral
Viabilidad Celular	Dinamismo de una persona o cosa que manifiesta cierta energía.	Ceúlas que se observen vivas en cama de Neubauer.	Cuantitativa continua	Expresao en porcentaje. De 0% a 100%

Presencia de marcadores de superficie. CD 90, CD 75, CD 103	Moléculas reconocen ciertos anticuerpos, usadas para la identificación del tipo de célula	Presencia de marcadores celulares	Cualitativo nominal Dicotómico	Positivo Negativo.
Osteoartritis	Enfermedad de las articulaciones o coyunturas que afecta principalmente al cartílago	Grado de severidad de lesión del cartílago articular en rodilla.	Cuantitativo discreto	I II II IV

vi. Descripción de la intervención.

Este estudio involucró a 4 cirujanos del servicio de Ortopedia del Deporte y Artroscopia y de tres cirujanos del servicio de Reconstrucción Articular de Cadera y Rodilla del Adulto del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” (INR.LGII) quienes realizaron las cirugías programadas. El presente estudio contó con la aprobación por parte del Comité de Ética e Investigación del I.N.R.L.G.I.I. con número de registro 80/17.

Después de la captación de los pacientes y previo consentimiento informado escrito y firmado (ver anexos). Los pacientes programados para procedimientos artroscópicos, como reconstrucción artroscópica de ligamento cruzado anterior, tratamiento de lesiones meniscales, así como programados para artroplastia total de cadera, los que se encontraban entre las edades de 18 a 80 años de edad,

fueron considerados para ser candidatos para este estudio. Quienes cumplieron los criterios de inclusión, criterios de exclusión.

Los pacientes firmaron el consentimiento informado antes de las cirugías. Los pacientes siguieron el protocolo preoperatorio convencional según hayan sido sometidos a procedimientos artroscópicos o artroplastia total de cadera y rodilla

vii. Obtención de la muestra de líquido sinovial.

Los pacientes incluidos en este estudio, fueron los que presentaron algún grado de OA, en las cirugías programadas en los servicios de artroscopia y reemplazos articulares y quienes previamente firmaron el consentimiento informado.

Los pacientes fueron sometidos a procedimiento anestésico espinal más bloqueo regional. Se procedió a lavado de extremidad pélvica con solución isodine, y posterior colocado de campos quirúrgicos. En los procedimientos artroscópicos se identificó área de artrocentesis, en la intersección de dos líneas la primera a 3 cm paralelo al borde superior de la patela, la segunda a 3 cm paralelo al borde lateral de la patela, en dirección a el fondo cuadrípital se realizó artrocentesis e infiltración de solución fisiológica en cantidad de 40 ml. Posteriormente se realizó apertura de portal antero lateral convencional, e introducción de camisa de artroscópico, y se procedió a coleccionar líquido sinovial mas solución fisiológica administrada.

En los pacientes sometidos a artroplastia de cadera, siguieron los procedimientos establecidos en cada caso, posteriormente a realizar la artrotomia se procedió a toma de muestra de líquido sinovial con jeringas de 10 ml.

viii. Preparado del medio de cultivo.

La generación del medio de cultivo enriquecido para la diferenciación condrogénica consta de los siguientes pasos:

- a. Fase 1.- Toma de suero autólogo: El paciente se citó en ayuno para toma de sangre total. Se puncionó la vena cefálica o basílica para obtención de sangre total (450 ml aproximadamente) y se obtuvo suero mediante procedimiento estandarizado de laboratorio. El suero se llevó

a laboratorio de biotecnología donde se inactiva a 56°C por 30 minutos, posteriormente filtrado (22µm), formando alícuotas y almacenado a -22°C.

- b. Fase 2.- Preparación del medio: se adicionó DMEM F-12 en 20% al suero del paciente y antibiótico y antimicótico al 1%. El medio preparado se administrará al cultivo de CTMs, además se formarán alícuotas y se conservarán a -22°C.

ix. Transporte de muestra a Laboratorio y conteo celular.

Obtenida la muestra de líquido sinovial, esta es transportada a la unidad Quirúrgica de Biotecnología y Terapia Celular, ubicada dentro del área blanca de quirófano. (**figura 1**) En jeringas de 20 ml estériles.



Figura 1 Unidad Quirúrgica de Biotecnología y Terapia Celular, ubicada dentro del área blanca de quirófano.

En campana de flujo se procede a vaciar la muestra de líquido sinovial de la jeringa de transporte a tubos de polipropileno tipo Falcon™ de 15 ml de capacidad. Para posteriormente realizar centrifugado de las muestras a 1500 rpm por 10 minutos, en centrifugador Sorvail Legend™ XT/XF (ThermoFisher). Posteriormente se realiza decantado de sobrenadante, y se adiciona medio de cultivo para completar volumen a 5 ml, para realizar resuspendido con vortex, por 15 segundos. Posteriormente se toma muestra de 10 µl para ser llevado a una caja de 96 pocillos

donde se adiciona 10 μ l de azul tripano, y posteriormente ser leído en el microscopio a 10 X en la cámara de Neubauer. Además, se tomó muestra de 500 μ l para posteriormente realizar la caracterización del linaje celular.

x. Determinación de fenotipo por citometria

Antes de sembrar las células se tomó 500 μ l de la muestra para determinar el fenotipo, para la evaluación de la presencia de marcadores celulares de CTM por citometría de flujo. El procedimiento de marcaje se realizó como sigue: Una vez que las células han sido separadas del sobrenadante y resuspendidas con medio de cultivo. Estas células fueron depositadas en tubos de poliestireno [Falcon; Becton-Dickinson (BD)] con 10 μ l del anticuerpo en suspensión para marcadores de superficie celular y se dejaron incubar por 30 minutos a 4°C. Los anticuerpos monoclonales (directamente conjugado) aplicados fueron: FITC-conjugado CD90, PerCP-Cy CD73, PE CD105. [BD Bioscience]. (ver figura 2)

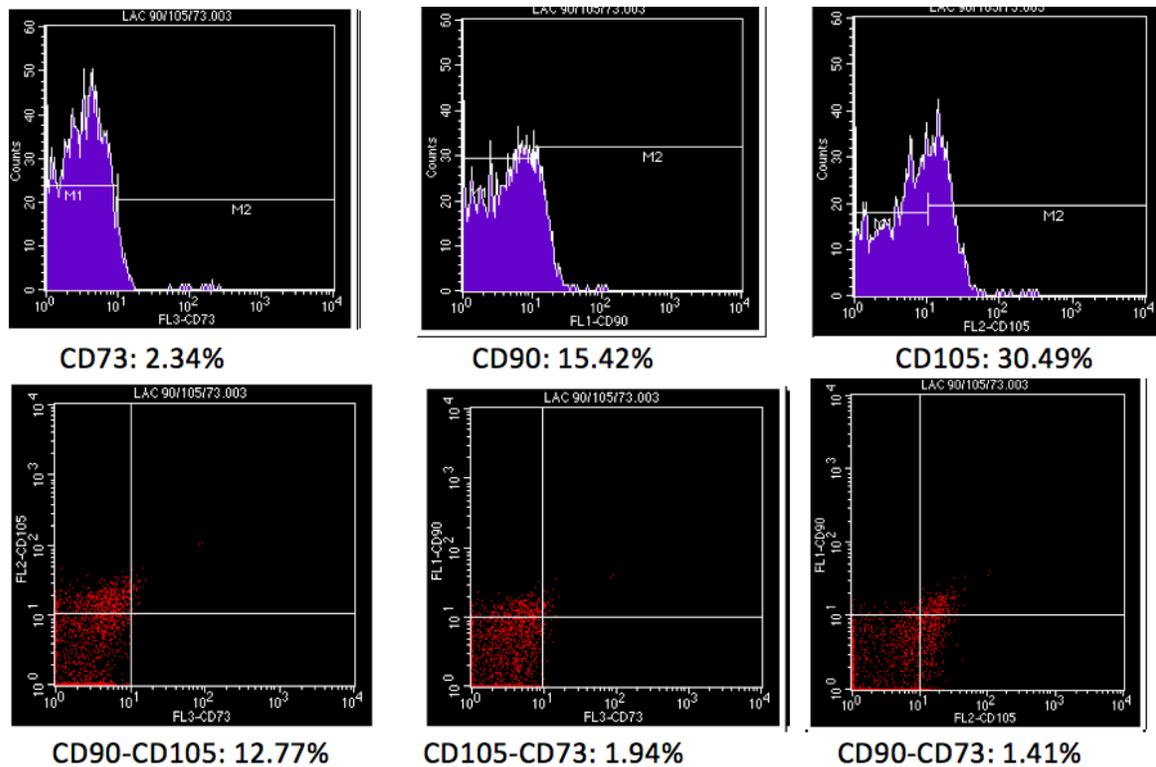


Figura 2. Citometria de flujo realizado en citómetro FacsCalibur, programa utilizado BcellQuest Pro. Se observa los tres marcadores de superficie celular CD73, CD90, CD105 (fila superior). Y células que comparten los marcadores de superficie celular CD90-CD105, CD105-CD73, CD90-CD73.

xi. Sembrado de la muestra de líquido sinovial

Del resuspendido celular se procede a sembrar la muestra en tres frascos para cultivo celular (T75 ThermoFisher SCIENTIFIC), con un volumen de 1.66 ml en cada frasco de cultivo, posteriormente se adicionó medio de cultivo para completar volumen a 2.5 ml. En cada frasco de cultivo. Para ser depositados en las incubadoras CO₂ compacta. A 37°C de temperatura y 5% de CO₂.

xii. Control de proliferación celular

A las 24 horas de cultivo celular se realizó lavado de cultivo con medio de cultivo la base del cual es Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) enriquecido con 20% de suero autólogo, con el objetivo de realizar lavado y retirar los glóbulos rojos restantes. Para posteriormente realizar control de proliferación en las cajas de cultivo celular cada 24 horas, hasta alcanzar, proliferación superior al 80%. **(ver figura 3)**

El cambio de medio de cultivo se realizó cada 72 horas.

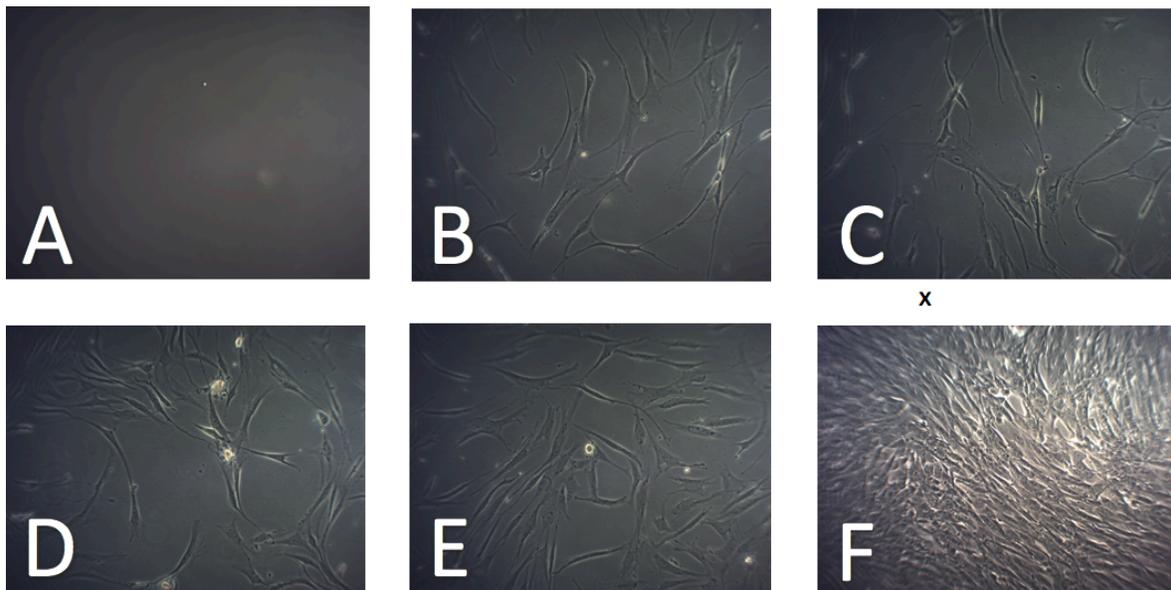


Figura 3 Fotografía de los controles de proliferación celular de las CTMs aisladas de líquido sinovial. De articulación de rodilla. Se cultivaron 50,000 células por caja de cultivo. Con medio DMEM, 20% de suero autólogo y 1% de antibiótico/antimicótico. Controles a los días: A. Día de siembra. B. Cinco días de cultivo C. Diez Días de cultivo. D. Quince días de cultivo E. Veinte días de cultivo E. Confluencia > 80% a los 30 días de cultivo.

xiii. Tripsinizado celular.

Alcanzada la proliferación celular superior al 80%, se procede a tripsinizado de células de las cajas de cultivo celular este procedimiento se llevó a cabo depositando Tripsina [BD Difco™ Trypsin] en las cajas de cultivo, y posteriormente se introduce la caja de cultivo en la incubadora de vibración orbital a 75 rpm por 10 minutos, con el objetivo de desprender las células de la caja de cultivo celular. Para posteriormente sembrar las células en tres pozos de cajas de cultivo de 12 pozos, sobre cubreobjetos circulares.

xiv. Diferenciación a las tres líneas celulares.

Una vez sembradas las células a razón de 5×10^5 se procedió a colocarlo de medio de diferenciación de la siguiente manera:

Para la línea adipogénica se utilizó medio de diferenciación de adipocitos [StemMACS AdipoDiff Media human 100 ml] que contiene DMEM, L-Glutamina, Suero fetal bovino, suplementos. (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements). Para la diferenciación a la línea condrogénica se utilizó: [StemMACS ChondroDiff Media human 100ml] que contiene: DMEM, L-Glutamina, Suero Fetal Bovino, suplementos [DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements]. Para la diferenciación a línea osteogénica se utilizó: [StemMACS OsteoDiff Media human 100ml] que contiene: DMEM, L-Glutamina, Suero Fetal Bovino, suplementos [DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements]. Los cultivos se mantuvieron por lapso de 14 días para la diferenciación osteocitos, y condrocitos, para los adipocitos se mantuvieron en cultivo por lapso de 21 días.

xv. Tinción para diferenciación celular.

En las tres líneas celulares, de cadera como de rodilla, se procedió a retirar los cubreobjetos, donde se sembraron las células, para su colocarlo en portarobjetos y realizar la tinción celular.

Tejido cartilaginoso: La diferenciación condrogénica de CTM en cajas de cultivo celular da como resultado la formación de cartílago con una matriz extracelular típica. Una molécula clave: además de colágeno tipo II dentro de esta matriz extracelular, es el proteoglicano agregano. El agregano puede utilizarse como indicador de la formación de cartílago y puede detectarse con Azul Aciano que es

un tinte que contiene color azul cobre oscuro.(57) Se procedió a realizar la tinción de la siguiente manera:

- Fijado de células con solución ácido acético al 3% por 3 minutos.
- Adición de azul alciano 1% (pH 2.5), teñido en cuarto oscuro por 20 minutos.
- Lavado con agua de llave por 5 minutos.
- Enjuagado con agua destilada.
- Adición de ácido periódico 0.5%, teñido en cuarto oscuro por 10 minutos.
- Lavado con agua de llave por 5 minutos.
- Adicionamos reactivo Schiff por 20 minutos.
- Lavamos con agua de llave.
- Enjuagado con agua destilada.
- Finalmente teñimos con hematoxilina eosina.

Y Posteriormente procedemos tomar fotografía con cámara microscópico CMEX 5 (DC5000C) (**figura 4**)

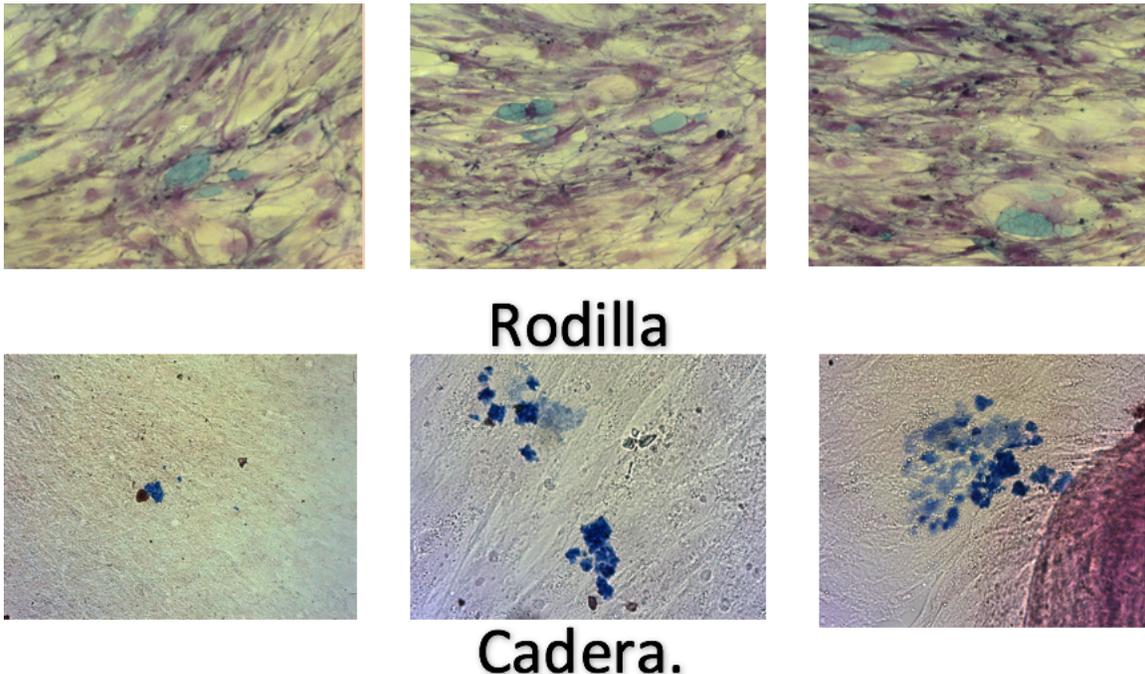


Figura 4 Tinción azul alciano en células diferenciadas de Rodilla como de cadera, donde resalta la presencia de agregano (color azul), indicador de la formación de cartílago.

Tejido Adiposo: Tinción rojo O oleosa es un ensayo que se realizó para detectar cultivos adipogénicos con tinción para detectar adipocitos maduros. (58)Esta tinción se llevó a cabo de la siguiente forma:

- Preparamos la solución con 300 mg de aceite rojo y agregándole 100 ml de isopropanol al 99%.
- En la campana de flujo mezclamos 3 partes (30ml) de la solución de aceite rojo O con 2 partes (20ml) de agua desionizada y dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. (Esta solución es estable durante no más de 2 horas por lo que se utilizó en el momento.
- Se fijaron las células con solución de formalina. Por 2 minutos
- Se enjuagó suavemente con 2 ml de agua estéril a cada pocillo.
- Agregamos 2 ml de isopropanol al 60% para cubrir la laminilla con células cultivadas. Y se dejó reposar por 2-5 minutos.
- Enjuague con solución de agua destilada.
- Agregamos 2 ml de la solución de aceite rojo O, para que las celdas queden totalmente cubiertas. Reposo por 5 minutos.

Tejido Osteogénico: Los osteoblastos son fibroblastos especializados que secretan y mineralizan la matriz ósea, se desarrollan a partir de los precursores mesenquimatosos, la matriz extracelular mineralizada está compuesta principalmente de colágeno tipo I y cantidades más pequeñas pero significativas de osteocalcina (OC), osteopontina (OPN) sialoproteína ósea (BSP), y mineral inorgánica hidroxapatita.

Los osteoblastos en fase de proliferación muestran actividad con tinción de fosfatasa alcalina (PA), estas células se observan de color azul violeta por la presencia de fosfatasa alcalina (PA)(59). Esta tinción se realizó de la siguiente manera:

- Disolvemos 2 gr de rojo alizarin s en 100 ml de agua destilada, se ajustó pH a 4.1 se filtra y guarda en cuarto oscuro.
- Lavado de células, se aspira el medio, con cuidado se lavó con solución PBS (Dulbecco's), sin romper la monocapa.
- Se fijó con solución neutral de formalina (10%) cubriendo la monocapa por completo por 30 minutos
- Lavado de monocapa celular con agua destilada.
- Se adicionó suficiente solución de rojo alizarin S hasta cubrir la monocapa, se reposos en cuarto oscuro por 45 minutos.

- Se lava la monocapa en 4 oportunidades con agua destilada, y se adiciona PBS para su visualización al microscopio.

xvi. Inmunofluorescencia

En las tres líneas celulares de cadera y rodilla se realizó inmunofluorescencia.

Línea osteoblástica se utilizó (Anti-RUNX2 antibody[ab23981]) y el Anti-Osteopontin antibody (ab8448).

Línea condrogénica se utilizó: Anti-Sox9 antibody (ab26414) y el Anti-Collagen II antibody (ab21291).

Línea adipogénica: se utilizó: Anti-Lipoprotein lipase antibody [LPL.A4](ab2135)

Se utilizó Perm wash (KIT- BD Cytotfix/Cytoperm- 554722) al 1X, se hizo tres lavados por 2 min cada muestra, posteriormente se agregó la solución Cytotfix/cytoperm al 1X hasta cubrir por 2 hrs, pasadas las 2 hrs se colocaron 5µl de los anticuerpos primarios en el botón hasta cubrir, se cubrieron y se dejaron a -4°C para evitar la desnaturalización, por 12 horas en la noche. Pasadas 24hrs se lavarón con Perm wash, se colocaron los anticuerpos secundarios durante 1 hrs 30 min, al terminar este tiempo se lavó con Perm wash una vez y se colocó el reactivo para teñir núcleos (Hoechst-33258) diluido en agua destilada al 1X por 10 min, se lavó nuevamente con Perm wash se retiró y se agregó Perm wash para su observación al microscopio. (se observó en cuarto oscuro para no perder la luminiscencia)

xvii. Análisis Estadístico

Los datos de este estudio fueron almacenados en base de datos de Excell (Microsoft Office para MAC®), procesados con el programa SPSS IBM (V.22.0). El Análisis se realizó por el principio de intentar a tratar, de acuerdo con el objetivo general y la presencia de variables que implican muestras paramétricas, se planeó la aplicación de la prueba estadística ANOVA de dos vías; considerándose que esta prueba estadística es de las más potentes. Teniendo, así como factor uno los grupos (rodilla, cadera) y el factor dos, las variables (Fenotipo, y expansión celular). Se tomarán como significativos los valores de p que sean menores a 0.05 ($p < 0.05$).

VII. Aspectos Éticos

Nos encargamos de realizar, una plática informativa con especialistas de Ortopedia en donde se les explico, previo a ofrecer el consentimiento informado, **(ver anexos)** en qué consistía en protocolo, con el fin de poder contar con una nueva fuente de CTMs, sin necesidad de administración medicamentosa previa. Con esta información a detalle, y habiéndoles explicado a los pacientes que, en caso de no aceptar participar, que sus lesiones en sus rodillas y caderas, motivo de programación quirúrgica, serán tratados como fueron programados desde la consulta externa, sin restricción alguna. Una vez que los pacientes aceptaron participar en este protocolo y firmaran el consentimiento informado, se procedió a explicarles, los beneficios futuros propios de este protocolo de investigación.

a. **Método que se utilizó para obtener el consentimiento informado**

Se realizó una charla explicativa donde participaron todas las áreas médicas del protocolo de estudio, usando un lenguaje coloquial, dirigido a los pacientes, en donde se les explico en qué consistía el protocolo, sus alcances, compromiso y expectativas en relación a su situación de salud. Al terminar dicha plática un médico ortopedista con especialidad en Artroscopia y Lesiones Deportivas integrante del equipo de investigadores de este proyecto, resolvió cualquier duda o inquietud que tuvieron los pacientes, les leyó el consentimiento informado, y les preguntó sobre su autorización o no a participar. Una vez teniendo la autorización del paciente para participar en el protocolo, se les dio un directorio de los médicos y servicios participantes en este protocolo, así como teléfonos de contacto con médicos responsables del proyecto a quienes pudieran recurrir en cualquier momento. **(Ver anexos)**.

b. **Riesgos físicos, sociales o legales a los que pudieron verse sometidos los pacientes.**

Los pacientes que aceptaron participar en este protocolo, por el hecho de tener una patología establecida en su articulación (rodilla, cadera),

y estar programados para procedimiento quirúrgico establecido, sin que la toma de la muestra, líquido sinovial, altere el procedimiento previamente planificado, tuvieron riesgos relativos propios de una cirugía en rodilla (artroscopia) y cadera (artroplastia total de cadera), como artrofibrosis, sinovitis, infección, entre otros, los cuales fueron explicados previo a la firma del consentimiento informado.

c. **Métodos utilizados para minimizar los riesgos principales.**

Todas las maniobras quirúrgicas de este protocolo, que son por definición las que podían conllevar un riesgo ya mencionado, fueron realizadas en el quirófano 6 y 7 y 2 de Ortopedia del Instituto Nacional de Rehabilitación “Luis Guillermo Ibarra Ibarra” el cual cuenta con certificación ISO-9000 y por parte de la secretaría de salud. Los médicos que realizaron las cirugías programadas son médicos adscritos al servicio de Ortopedia del Deporte y Artroscopia, así como al servicio de Reconstrucción Articular de Cadera y Rodilla del INR, con amplia experiencia en el manejo de estas patologías, asegurándose de contar en todos los casos con todo el equipo necesario para la realización de las cirugías, disminuyendo así al mínimo cualquier posibilidad de riesgo.

De todos modos, en caso de presentarse efectos adversos graves e inesperados o no descrito, o evidencia inequívoca del perjuicio del procedimiento de toma de muestra propia del presente proyecto, se consideraron estos como motivos para la interrupción prematura del estudio con aviso inmediato al comité de investigación del INR “LGII”.

d. **Beneficios potenciales que puedan obtener los participantes en el estudio.**

Los pacientes que aceptaron participar en este protocolo, recibieron atención médica integral por parte de un grupo multidisciplinario de

alta especialidad con profesionales del INR LGII que estuvieron atentos a su manejo y evolución durante el proceso que duró este estudio. Cabe mencionar, por último, que el paciente que aceptó participar en este proyecto y firmó una carta compromiso de apego al tratamiento, fue exento de cualquier tipo de pago extra por el desarrollo de la investigación.

El presente estudio tiene registro en el Comité de investigación del Instituto Nacional de Rehabilitación con número 80/17.

e. Presupuesto

Este es un proyecto que contó con un financiamiento asignado de 10000 \$ por parte del Hospital de Especialidades de Nueva York. Este fondo más el apoyo de infraestructura y recursos humanos dado por el Instituto Nacional de Rehabilitación LGII de la Secretaria de Salud, hizo posible que este estudio fuera autofinanciado y no implicara costo alguno para los pacientes que eligieron participar, dejando inversión en infraestructura en el hospital sede de este estudio.

VIII. Resultados

a. **Descripción demográfica** Se describe la población involucrada en este protocolo, donde se describieron todas las variables cuantitativas y cualitativas, se hicieron pruebas de normalidad y se compararon los valores de los marcadores de superficie celular de las CTMs al momento de toma de muestra, y una segunda lectura al lograr confluencia celular en los cultivos *in vitro*, superior al 80%. Con la descripción demográfica y las comparaciones a priori se demostró que las poblaciones no eran diferentes antes de la intervención realizada. **(Tabla 2)**

Los pacientes pertenecieron a ambos géneros en la población objetivo se observó dentro del género femenino a 8 (66.66%) y al género masculino 4 (33.33%), en el grupo de rodilla de un total de 7 pacientes (100%), en el género femenino 3 (42.85%), masculino 4 (57.14%). Para el grupo de cadera 5 pacientes del género femenino (100%). Con una edad media de 48.28 años una edad mínima de 23 años y máxima de 79 años. En el grupo de rodilla edad promedio de 40.66, edad máxima de 44 años, edad mínima de 23. En el grupo de cadera edad promedio de 63.28 (rango de 62 a 79).

Género	Rodilla	Cadera	Total
Femenino	3 (42.85%)	5 (100%)	8 (66.6%)
Masculino	4 (57.14%)	0 (0%)	4 (33.33%)
Edad	40.66 (23-44)	63.28 (62-63.38)	47.83 (23-79)

Tabla2 Datos demográficos, de la población involucrada en el presente estudio.

Para la clasificación de OA se utilizó la clasificación del ICRS obteniéndose en la población objetivo, grado IV 7 pacientes (58.33%), grado II 2 (16.6%), Grado I 3 (25%). Para el grupo de rodilla, grado IV 2 (28.5%). Grado II 2 (28.5%), Grado I 3 (42.85%). En el grupo de cadera 5 pacientes (100%) tenían grado IV OA según la clasificación del ICRS.

Con respecto al volumen inicial de muestra se obtuvo un volumen de 17.25 ml (rango de 45 a 1 ml). En el grupo de rodilla volumen inicial de 22.3 ml (rango de 45

a 3.5 ml). En el grupo de cadera se obtuvo volumen inicial de muestra de 2.8 (rango de 5 a 1 ml).

b. Obtención de medio de cultivo celular autólogo a partir de suero del paciente.

Se obtuvieron 450 ml de suero del paciente, los cuales fueron inactivados a 56°C por 30 minutos, posteriormente fueron filtrados con unidades de filtro estériles desechables con membrana de CN Nalgene™ Rapid-Flow. (ThermoScientific™ 450-0045) de 0.45µm de diámetro, se procedió a almacenar en alícuotas de 15ml en tubos de cultivo de 15ml. Se almacenaron a -80°C hasta el momento de su empleo en cultivo.

c. Aislamiento de células CTM a partir de líquido sinovial.

De los 17.25 ml, en promedio, de líquido sinovial obtenidos de articulación de cadera o rodilla de pacientes programados para procedimientos artroscópicos o artroplastias totales, se obtuvieron un promedio de 2,295,417 células vivas con viabilidad del 60%. Las cuales se sometieron a marcadores de superficie celular con anti-CD90, anti-CD73, anti-CD105, se obtuvieron la siguiente relación: CD73: 7.77%, CD90: 5.20%, CD105: 18.05, CD90-CD105: 2.29%, CD105-CD73: 9.68%, CD90-CD73: 1.48%, siendo el porcentaje de células que compartían los tres marcadores de superficie celular: 4.50%.

El conteo inicial de células fue de 2.29×10^6 (rango de 4.59×10^6 a 2.05×10^5)

El conteo en el grupo de rodilla fue de 2.48×10^6 (rango de 4.59×10^6 a 8×10^5)

En el grupo de cadera se obtuvo como conteo inicial 1.97×10^6 (rango de 2.6×10^6 a 2.05×10^5)

d. Viabilidad celular de muestra aislada de líquido sinovial.

Después del aislamiento, se determinó la viabilidad de la población celular obtenida a partir de líquido sinovial mediante la técnica de Azul Tripán y cámara de Neubauer. Se obtuvieron un global de 58% de viabilidad (rango de 90% a 10%) del total de células aisladas de líquido sinovial.

Para el grupo de rodilla se observó una viabilidad de 61% (rango de 90% a 33%). En el grupo de cadera se observó viabilidad de 49.71% (rango de 86.60% a 9.80%).

e. **Expansión en cultivo *in vitro* de las CTMs aisladas de líquido sinovial**

Las células aisladas de LS de rodilla y de cadera, después del seguimiento en cultivo primario mostraron una morfología alargada cuando se cultivaron con medio DMEM suplementado con 20% de suero autólogo. **(Figura 3)**

El conteo final de cultivo primario de células fue de 9.91×10^5 (rango de 2.98×10^6 a 2.9×10^5)

El conteo final de cultivo primario del grupo de rodilla fue de 7.30×10^5 (rango de 1.38×10^6 a 3.2×10^5)

En el grupo de cadera se obtuvo como conteo final de cultivo primario 1.25×10^6 (rango de 2.98×10^6 a 2.90×10^5)

f. **Viabilidad celular al final del cultivo primario.**

Después de realizar el cultivo primario se determinó la viabilidad celular global de 91.84% (rango de 97.09 a 80%), para el grupo de rodilla viabilidad del 93.45% (rango de 97.09% a 83.10%). En el grupo de cadera viabilidad de 89.76% (rango de 97% a 80%). Se realizó la comparación entre la viabilidad inicial y la de cultivo primario tomando como factor la articulación a partir de donde se tomó la muestra, se realizó análisis bivariado donde no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la viabilidad inicial (p 0.268) así como la viabilidad de cultivo primario (p 0.194) **(figura 9)**

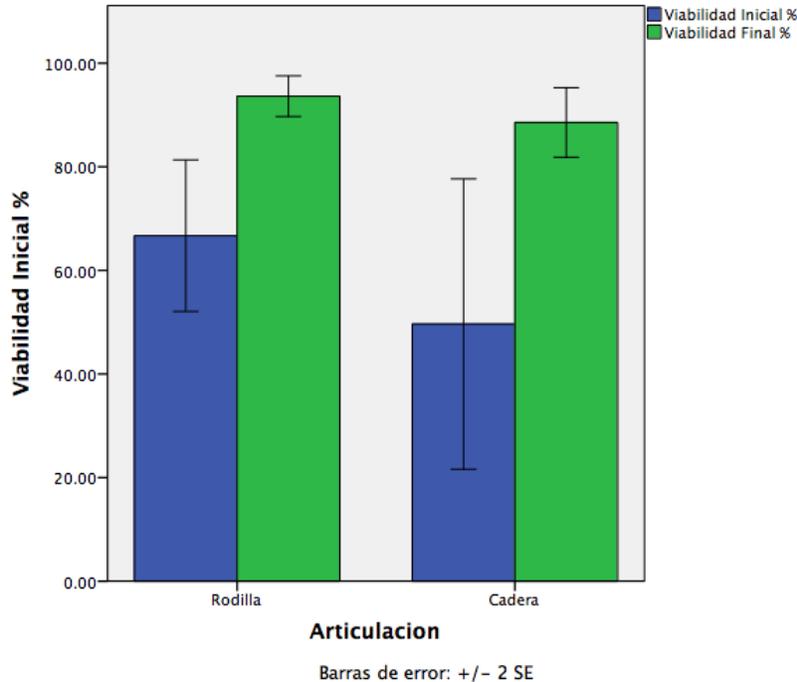


Figura 9. Valoración de viabilidad celular al inicio de cultivo y al final del cultivo primario, a partir de la articulación de la que fue aislada las CTM. No se observan diferencias estadísticamente significativas. $p > 0.05$.

g. Inmunofenotipo de las células CTMs después de ser aisladas de líquido sinovial.

Se logró establecer el inmunofenotipo de las células CTMs, aisladas de LS con el panel de anticuerpos para células troncales mesenquimales, CD90, CD73, CD105, CD90-CD105, CD105-CD73, CD90-CD73.

h. Inmunofenotipo de las células CTM después de ser aisladas de líquido sinovial de articulación de rodilla.

Estas células mostraron una morfología alargada. **(Figura 5)**

Después que se obtuvo la muestra de LS de la articulación de rodilla el marcador predominante fue el CD105 (20.5%), seguidas por CD73 (10.56%), y CD90 (5.19%). Cuando se realizó la lectura del porcentaje de células que compartían marcadores celulares se vio predominio de aquellos que compartían CD105-CD73 (3.09%). **(tabla 3)**

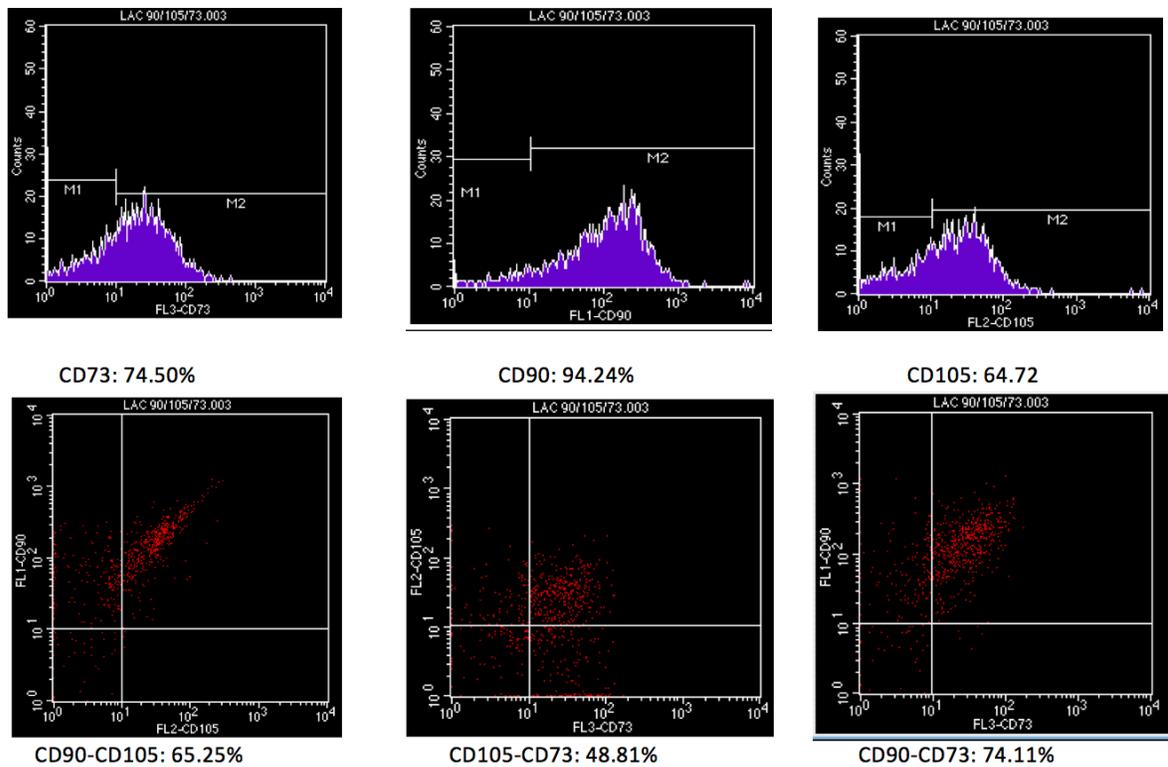


Figura 5 Citometría de flujo realizado en citómetro FACS Calibur, programa utilizado BcellQuest Pro. Tras cultivo primario (Confluencia mayor al 80%). Se observa los tres marcadores de superficie celular CD73, CD90, CD0105 (fila superior). Y células que comparten los marcadores

i. Inmunofenotipo de las células CTM después de ser aisladas de líquido sinovial de articulación de cadera.

Estas células mostraron una morfología alargada (**Figura 6**)

A partir de la muestra de LS se estableció que los marcadores evaluados (CD90, CD73, CD105, CD90-CD105, CD105-CD73, CD90-CD73) estaban por debajo del 10%. Mientras que los marcadores de CTM en conjunto disminuyeron por debajo del 5%. (**figura 6**) (**tabla 3**)

j. Inmunofenotipo de las células CTM aisladas de líquido sinovial de articulación de rodilla después del cultivo primario

Tras el cultivo de las células CTMs aisladas a partir de LS de articulación de rodilla, por un lapso de 25 días, llegaron a confluencias superiores al 80%, el marcador de superficie celular en mayor porcentaje fue el CD90, seguido del

marcador CD73 y por último del CD105, pero los tres en mayor porcentaje en relación a cuando fueron aisladas de la articulación. **(Figura 6) (tabla 3)**

<i>Marcador de superficie celular</i>	Rodilla	Cadera	Global
<i>CD 73 inicial</i>	10.56%	3.85%	7.77%
<i>CD 90 inicial</i>	5.19%	5.22%	5.20%
<i>CD 105 inicial</i>	20.17%	15.08%	18.05%
<i>CD90-CD105 inicial</i>	2.46%	2.05%	2.29%
<i>CD105-CD73 inicial</i>	3.09%	18.91%	9.68%
<i>CD90-CD73 inicial</i>	1.82%	1.00%	1.48%
<i>Comparten CD`s inicial</i>	2.49%	7.32%	4.50%
<i>CD 73 CP</i>	89.19%	88.81%	89.03%
<i>CD 90 CP</i>	91.38%	90.92%	91.19%
<i>CD 105 CP</i>	76.64%	77.09%	76.83%
<i>CD90-CD105 CP</i>	72.12%	72.79%	72.40%
<i>CD105-CD73 CP</i>	60.10%	67.57%	63.21%
<i>CD90-CD73 CP</i>	82.32%	82.45%	82.37%
<i>Comparten CD`s CP</i>	69.81%	75.50%	72.18%

Tabla 3. Inmunofenotipo de marcadores de superficie celular, tomando como factor la articulación de rodilla y cadera. y el global de ambas articulaciones. Se puede observar incremento en el porcentaje de marcadores celulares al final del cultivo primario (CP), en relación a los marcadores de superficie al inicio del cultivo.

k. Inmunofenotipo de las células CTM aisladas de líquido sinovial de articulación de cadera después del cultivo primario.

Tras el cultivo de las células CTMs aisladas a partir de LS de la articulación de cadera en un lapso de 25 días, para llegar a confluencias superiores al 80%, el marcador de superficie celular mayormente expresado fue CD90, seguido del CD73 y finalmente el CD105, todos con mayor expresión en relación a cuando fueron aislados de la articulación de cadera. **(figura 6) (tabla 3)**

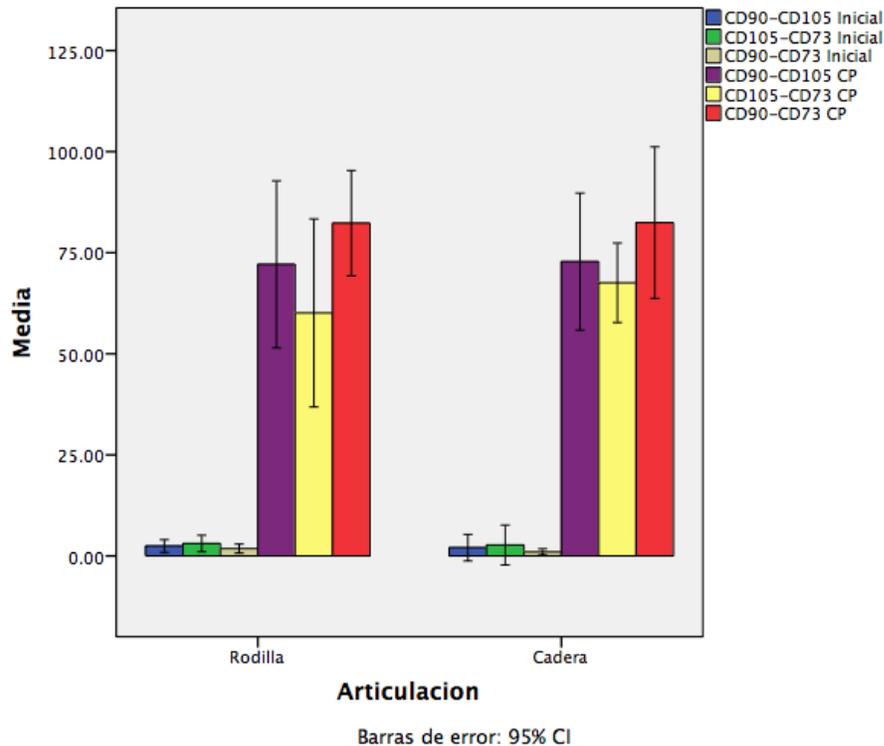


Figura 6 Inmunofenotipo de marcadores de superficie compartidos de las células aisladas de líquido sinovial, y tras cultivo primario, establecido por citometría de flujo de las muestras obtenidas de articulación de rodilla y cadera. Se realizó prueba de ANOVA (Kruskal-Wallis) entre los grupos sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Aisladas $p=0.8075$; cultivo primario $p=0.5698$.

Se realizó el contraste del porcentaje de las células que comparten los tres marcadores de superficie celular (CD90, CD73, CD105), al inicio del cultivo y al final del cultivo primario, tomando como factor de agrupación la articulación a partir de la cual fueron aisladas las muestras (Rodilla o Cadera), no se observaron diferencias estadísticamente significativas con la prueba estadística bivariada. Observándose una $p=0.578$ al inicio del cultivo, y una $p=0.580$ al final del cultivo primario. **(figura 10)**

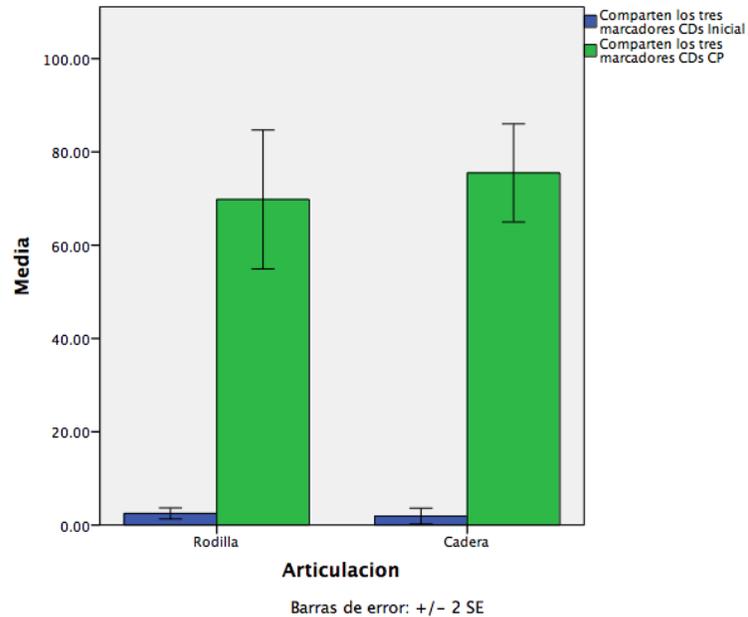


Figura 10. Inmunofenotipo del porcentaje de marcadores de superficie celular compartidos al inicio del cultivo y al final del cultivo primario, tomando como factor de agrupación la articulación a partir de donde fueron tomadas las muestras. (Rodilla y Cadera). No se observaron diferencias estadísticamente significativas. $p > 0.05$.

Además, se realizó, la comparación de marcadores de superficie celular compartidos al inicio del cultivo y al final del cultivo primario, tomando como factor de agrupación el grado de OA, en la articulación a partir de la cual se obtuvo la muestra. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, presentando los siguientes valores: CD90-CD105 inicial $p 0.699$, CD105-CD73 inicial $p 0.537$, CD90-CD73 inicial $p 0.700$. y en los cultivos primarios CD90-CD105 $p 0.168$, CD105-CD73 $p 0.287$, CD90-CD73 $p 0.364$. **(Figura 11)**

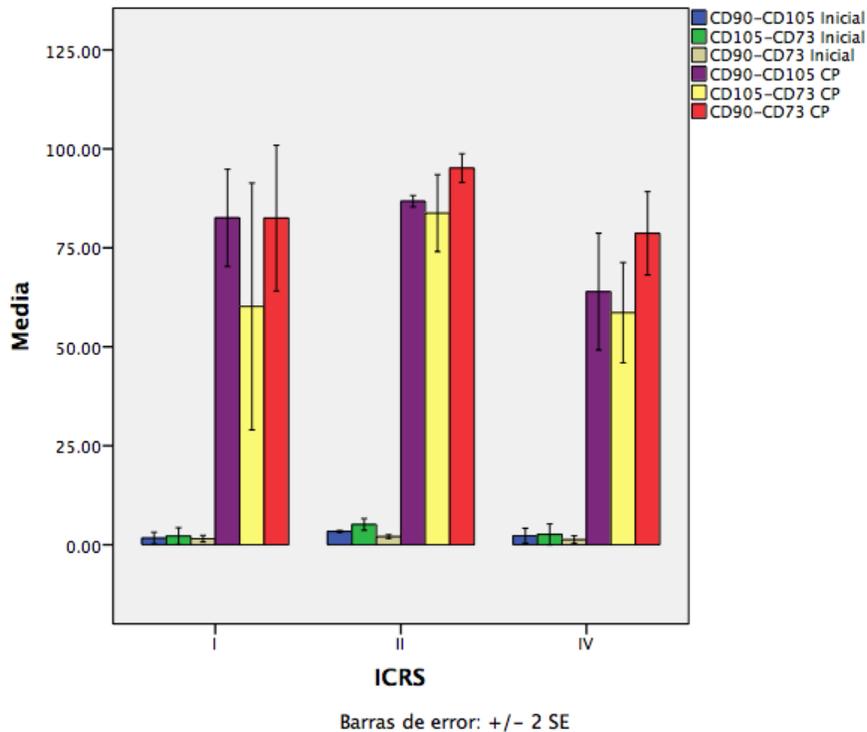


Figura 11 Inmunofenotipo de marcadores de superficie compartidos al inicio del cultivo y al final del cultivo primario, tomando como factor de agrupación el grado de OA según la clasificación del ICRS, realizando una prueba a de ANOVA bivariado. No encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre grupos $p > 0.05$.

Se procedió a valorar el número de células al momento de la siembra y al finalizar el cultivo primario, de acuerdo a los tres grados de OA, observándose diferencia estadísticamente significativa en la obtención del número inicial de células entre los grados de OA $p = 0.022$. Sin embargo, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa en el número final de células tras el cultivo primario $p = 0.491$. (**Figura 12**)

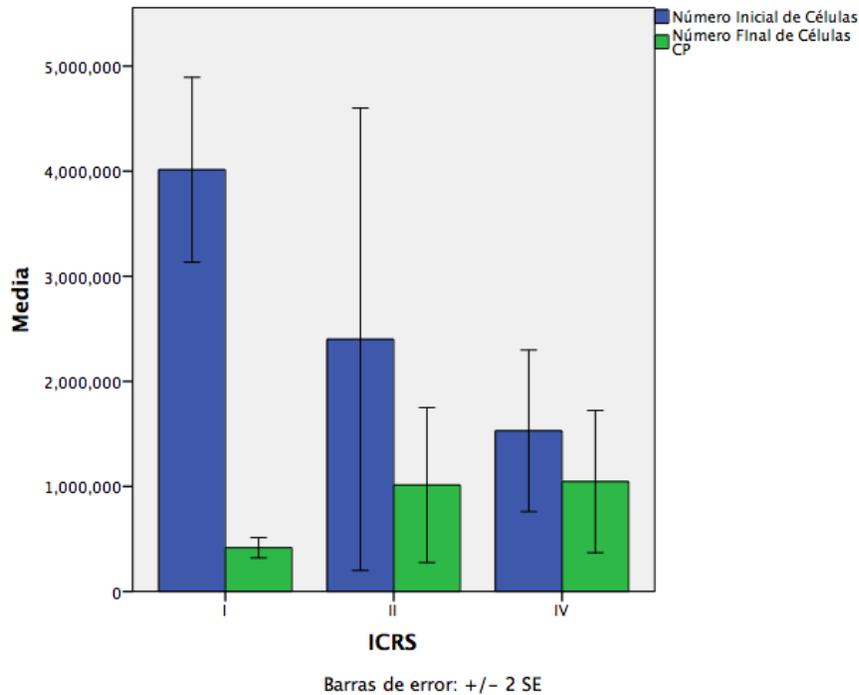


Figura 12 Número inicial de células contrastadas con el número de células al final del cultivo primario, tomando como factor de agrupación el grado de OA, observándose diferencias estadísticamente significativas entre el número inicial de células $p = 0.022$, y no se observó diferencia estadísticamente significativa entre el número final de células tras cultivo primario $p > 0.05$.

Como parte de los objetivos también se procedió a valorar la viabilidad celular inicial, al momento de la toma sembrar la muestra, y compararla con la viabilidad al final del cultivo primario. Utilizando como factor de agrupación el género de los pacientes. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para la viabilidad inicial $p = 0.822$; para la viabilidad al final de cultivo primario $p = 0.870$.

Figura 13.

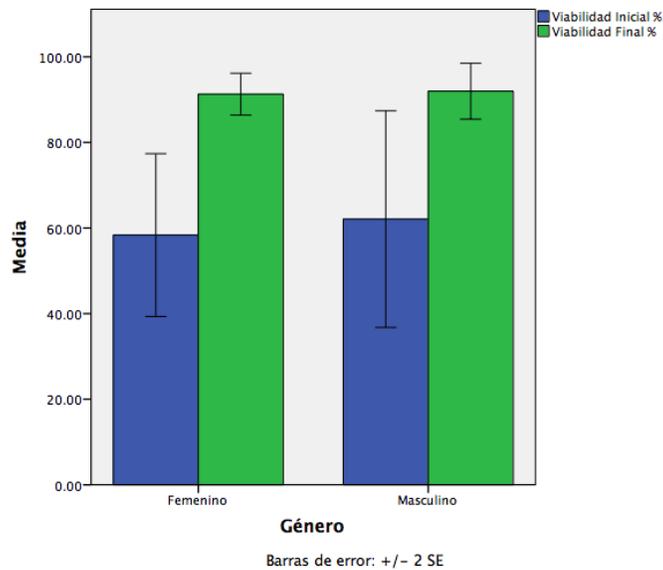


Figura 13. Viabilidad celular, agrupados por género, medida al inicio posterior a la siembra de la muestra, y al final del cultivo primario. No se observaron diferencias estadísticamente significativas, $p > 0.05$, para ambos grupos.

I. Diferenciación a un fenotipo condral de células CTMs aisladas de líquido sinovial de articulación de rodilla.

El propósito de este experimento fue corroborar lo descrito en la literatura en donde se han empleado varios compuestos químicos que pueden favorecer la diferenciación a un linaje condral. (26,59)(60).

Como resultado del seguimiento por 14 días de las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las células CTM-CD90+, CD73+, CD105+, aisladas de líquido sinovial de articulación de rodilla con previa inducción StemMACS ChondroDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements). Las células presentaron una morfología redondeada (**figura 7**). Semejantes a las de los condrocitos primarios.

Además, se observó la expresión de moléculas COL2A1 y AGR (**ver figura 8**). Para la condición de cultivo donde se empleó StemMACS ChondroDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements).

m. **Diferenciación a un fenotipo Osteogénico de células CTMs aisladas de líquido sinovial de articulación de rodilla**

Como resultado del seguimiento por 14 días de las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las CTMs CD90+, CD73+, CD105+, aisladas de articulación de rodilla con previa inducción StemMACS OsteoDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements). Las células presentaron morfología ligeramente alargado con prolongaciones citoplasmáticas escasas, semejantes a los osteocitos típicos. **(ver figura 7)**

Además, se observó la expresión de moléculas RUNX2 y Osteopontina **(ver figura 6)** Para la condición de cultivo donde se empleó StemMACS OsteoDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements).

n. **Diferenciación a un fenotipo Adipogénico de células CTMs aisladas de líquido sinovial de articulación de rodilla**

En esta estirpe celular se realizó cultivo por 21 días con las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las CTMs CD90+, CD73+, CD105+, aisladas de articulación de rodilla con previa inducción StemMACS AdipoDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements), estas células presentaron morfología redondeada semejantes a los adipocitos uniloculares típicos. **(ver figura 7)**

Además, se observó la expresión de moléculas Lipoproteinlipasa (LPL) **(ver figura 8)** para las condiciones de cultivo donde se empleó StemMACS AdipoDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements)

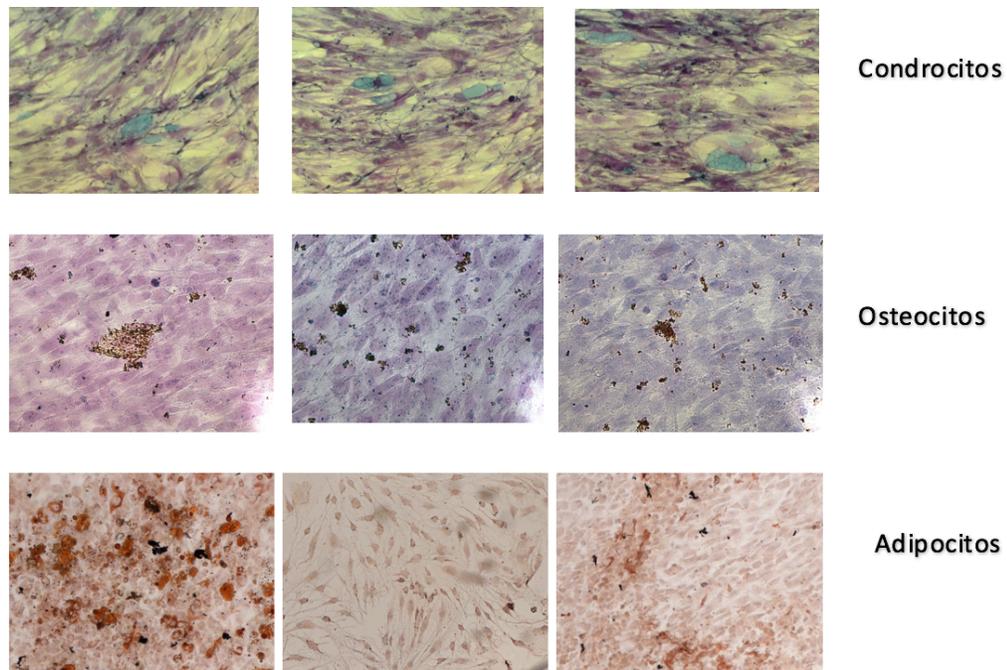


Fig. 7 Diferenciación de CTMs aisladas de líquido sinovial de articulación de rodilla, a las tres líneas celulares condrocitos con tinción azul alcian, osteocitos con tinción fosfatasa alcalina, adipocitos tinción rojo Oleoso. (Muestras del mismo paciente)

o. **Diferenciación a un fenotipo condral de células CTMs aisladas de líquido sinovial de articulación de cadera.**

El propósito de este experimento fue corroborar los descrito en la literatura en donde se han empleado varios compuestos químicos que pueden favorecer la diferenciación a un linaje condral. A partir de líquido sinovial obtenido de articulación de cadera.

Como resultado del seguimiento por 14 días de las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las células CTM-CD90+, CD73+, CD105+, aisladas de líquido sinovial de articulación de cadera con previa inducción StemMACS ChondroDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements). Las células presentaron una morfología redondeada (**ver figura 7.1**). Semejantes a las de los condrocitos primarios.

Además, se observó la expresión de moléculas COL2A1 y AGR (**ver figura 8**). Para la condición de cultivo donde se empleó StemMACS ChondroDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements).

p. **Diferenciación a un fenotipo Osteogénico de células CTMs aisladas de líquido sinovial de articulación de cadera**

Como resultado del seguimiento por 14 días de las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las CTMs CD90+, CD73+, CD105+, aisladas de articulación de rodilla con previa inducción StemMACS OsteoDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements). Las células presentaron morfología ligeramente alargado con prolongaciones citoplasmáticas escasas, semejantes a los osteocitos típicos. **(ver figura 7.1)**

Además, se observó la expresión de moléculas RUNX2 y Osteopontina **(ver figura 8)** Para la condición de cultivo donde se empleó StemMACS OsteoDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements).

q. **Diferenciación a un fenotipo Adipogénico de células CTMs aisladas de líquido sinovial de articulación de cadera**

En esta estirpe celular se realizó cultivo por 21 días con las condiciones experimentales a las que fueron sometidas las CTMs CD90+, CD73+, CD105+, aisladas de articulación de rodilla con previa inducción StemMACS AdipoDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements), estas células presentaron morfología redondeada semejantes a los adipocitos uniloculares típicos. **(ver figura 7.1).**

Además, se observó la expresión de moléculas Lipoproteína lipasa. Para la condición de cultivo donde se empleó StemMACS AdipoDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements).

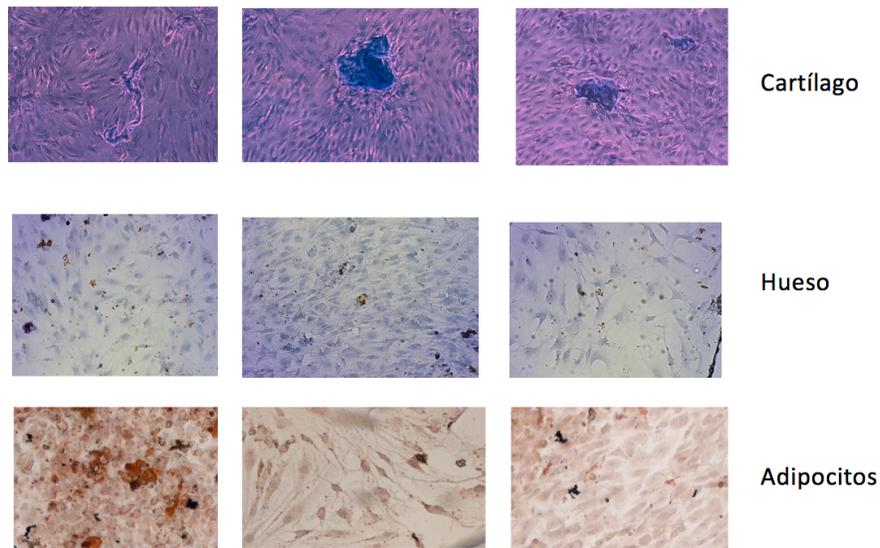


Fig. 7.1 Diferenciación de CTMs aisladas de líquido sinovial de articulación de cadera, a las tres líneas celulares condrocitos con tinción azul alcian, osteocitos con tinción fosfatasa alcalina, adipocitos tinción rojo Oleoso. (Muestras del mismo paciente)

r. **Evaluación del contenido de glucosaminoglicanos (GAGs) en tejido neoformado.**

Las características histológicas del tejido neoformado por células cultivadas fueron muy parecidas a las del cartílago hialino con células redondas frecuentemente rodeadas de matriz extracelular; contrario a fibrocartílago con presencia de células alargadas o elípticas. La estimación en el contenido de GAGs se realizó con tinciones de Azul Alciano, observándose una mayor tinción en intensidad y extensión del tejido formado por los cultivos diferenciados. **(ver figura 7)**

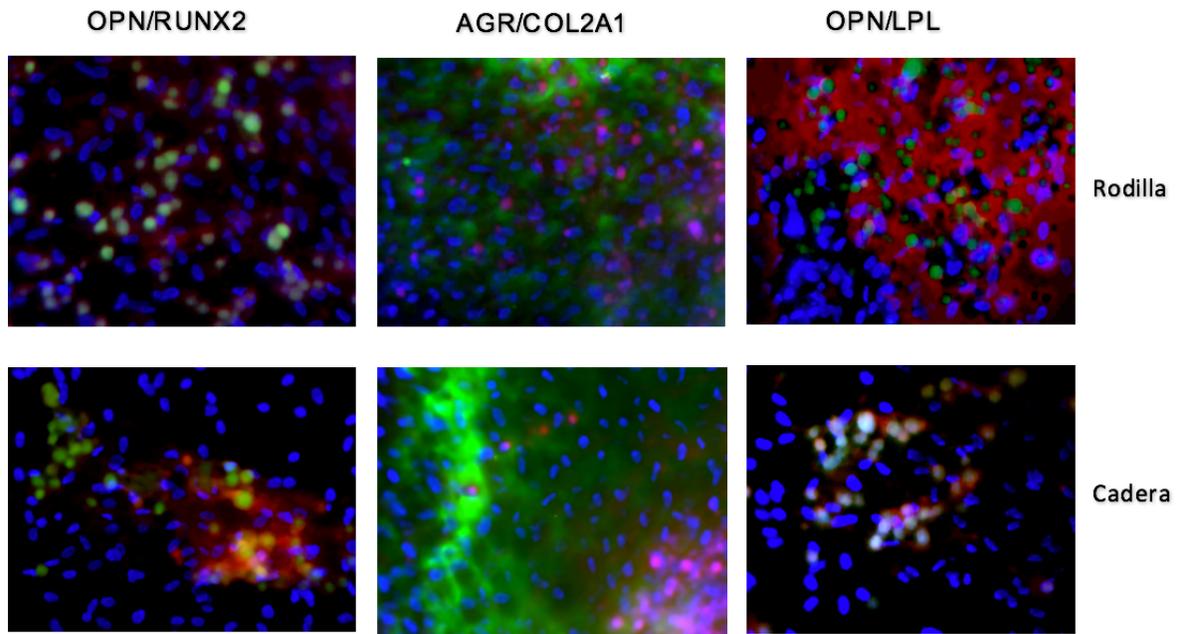


Figura 8 Inmunofluorescencia se estableció la expresión de colágeno $1\alpha 2$ (Col $1\alpha 2$ marcada con PercP de color rosa) y los núcleos se observan teñidos de color azul. En el tejido óseo cultivadas en monocapa por dos semanas, se aprecia la expresión de OPN en color verde y la expresión de RUNX (rojo), y los núcleos de color azul.

IX. Discusión

Este estudio describe el desarrollo de una fuente de CTMs y su diferenciación a la línea condral, en modelo *in vitro*, proporcionando las bases para el desarrollo de nuevas estrategias, para el tratamiento de lesiones condrales focalizadas en articulación de rodilla y cadera previniendo así el desarrollo de Osteoartritis temprana en pacientes jóvenes.

Recientemente, la CTMs han tomado auge en el área de la ingeniería tisular, siendo la médula ósea la fuente principal de esta línea celular, considerándose como el estándar de oro(61). Al igual que lo reportado en CTMs CD90+ aisladas de otros tejidos como líquido sinovial(62)

A pesar de las diferentes fuentes celulares consideradas para la obtención de CTMs, la obtención de estas células de MO continúa siendo la fuente de elección. Muchos de los estudios disponibles en la actualidad reportan la utilización de CTMs obtenidas de sangre periférica previa administración de factor estimulante colonias de los granulocitos. (G-CSF), como fuente de CTMs como opción terapéutica en la reparación de cartílago, con resultados buenos a largo plazo. Sin embargo, el uso de CTMs aisladas a partir de LS, ya sea de articulación de rodilla o cadera no ha sido reportado. La aplicación de esta estrategia podría cubrir muchas de las limitaciones para obtener CTMs, para la posterior diferenciación y reparación de las lesiones condrales mediante ingeniería tisular.

En este estudio, se demuestra la factibilidad para obtener CTMs viables, para posteriormente diferenciarlas a condrocitos, la toma de la muestra y el aislamiento celular. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de eliminar la necesidad de procedimientos más agresivos, tales como punción de MO, o la necesidad de administración de G-CSF, y además eliminando de esta manera la necesidad del doble procedimiento quirúrgico que implica el ACI y la toma de biopsia del mismo paciente, reduciendo la morbilidad, costos y tiempo.

Fue posible demostrar, mediante histología, la formación tejido con características muy cercanas a las del cartílago hialino en las células cultivadas

y diferenciadas., el tejido formado por las células cultivadas mostró predominantemente matriz fibrosa.

La expresión de agrecano (AGR) como de SOX9 se observó después de la inducción de CTMs de LS en medio de cultivo StemMACS ChondroDiff Media human 100mL (DMEM, L-Glutamine, Fetal Bovine Serum, Supplements). Obteniéndose un fenotipo de condrocito, lo que concuerda con lo reportado por Hwang y cols. (63)

Se demostró previamente que el LS de en articulaciones con OA contienen abundantes CTMs(64), pero se conoce con certeza si estas células están presentes en grados leves de OA. (36). En nuestro estudio se evidencio que la presencia de CTMs de LS tiene la misma presentación en grados severos de OS (IV ICRS) como en grados leves de OA (II ICRS) $p > 0.05$, como lo reportado que menciona que las CTMs se incrementan en grados tempranos de OA y esto puede derivarse del desprendimiento de fragmentos sinoviales. Esto es particularmente importante a sabiendas que las células de LS han sido propuestas que contribuye espontáneamente al reparo cartilaginoso.(42) y colonización de ligamentos en reconstrucción de LCA.(65). Estos hallazgos proveen los conocimientos para explorar el rol de las CTMs aisladas de LS y su capacidad condrogénica para la reparación de lesiones superficiales de cartílago articular. Se observó que el número inicial de células aislados de articulación de cadera superaron el número aislado de articulación de rodilla sin embargo esta no fue una diferencia estadísticamente significativa ($p=.0735$). Esta diferencia, aunque no significativa puede deberse al grado de osteoartrosis que presenta la cadera (IV ICRS) en relación a la rodilla como se demostró en el estudio de Jones EA y cols. (64) Estos datos se ven apoyados en el conteo final donde se observa mayor numero en los cultivos celulares de cadera en relación a la articulación de rodilla, sin embargo, esta diferencia no es estadísticamente significativa ($p=.4649$). Algunos estudios sobre el origen de las CTMs de LS refieren que estas células derivan localmente, ya sea del tejido sinovial (27)adyacente, o de las capas superficiales del cartílago articular. (66)

Los grados tempranos de OA se caracterizan por elevado número de CTMs aisladas a partir de LS, debido a que en las articulaciones de rodilla se procedió a la administración de solución fisiológica y su reaspirado, no obteniéndose la totalidad de células de LS, en contraste con la articulación de cadera donde se aspiró LS sin dilución, encontrándose diferencias estadísticamente significativas. (36).

Está bien aceptado que la destrucción tisular en la OA está íntimamente asociada con el proceso de reparación,(67) lo cual puede estar mediado en parte por el microambiente de la solución fisiológica. Al respecto los hallazgos en el presente estudio levantas preguntas acerca de la del rol reparativo potencial de las CTMs de LS en la OA. A pesar que estos datos no sean estadísticamente significativo en este estudio.

A pesar de que el presente estudio estuvo interesado principalmente en la exploración de CTMs de LS en articulaciones de cadera y rodilla en cultivos *in vitro*, podemos asegurar el potencial uso de LS de articulación de rodilla y cadera como fuente celular de CTMs para aplicaciones en ingeniería de tejidos para la reparación cartilaginosa. Actualmente el cultivo de condrocitos expandidos. (68,69). Sin embargo, la relativa inmadurez de las CTMs diferenciadas a condrocitos dio como resultado una acumulación más lenta de matriz extracelular.

X. Conclusiones

De las muestras de líquido sinovial es posible obtener CTMs, que presentaron características morfológicas correspondientes a CTMs, se observó adherencia a la placa de cultivo, y dichas células pudieron diferenciarse a los linajes condrogénico, adipogénico y osteogénico. Cumpliendo con criterios establecidos, comprobando de esta manera su Multipotencialidad. Las células diferenciadas a linaje condral expresaron marcadores moleculares típicos de cartílago.

Se comprueba que las CTMs aisladas de líquido sinovial obtenidas de rodilla y cadera cumplen con los criterios establecidos por la Sociedad Internacional de Investigación de células troncales (ISSCR). Por lo anterior, se confirma el potencial del líquido sinovial de rodilla y cadera como fuente alternativa de CTMs, para llevar a cabo inducción condrogénica que a su vez se podrían utilizar en ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

XI. Perspectivas

Las investigaciones que le den seguimiento a este trabajo estarán enfocadas en mantener el fenotipo de los condrocitos diferenciados, para posteriormente sembrarlos en andamios tridimensionales, y después ser injertados en un andamio en un ratón atímico por un periodo de al menos de 12 semanas para posteriormente valorar la viabilidad celular.

XII. Referencias Bibliográficas

1. de Sousa E, Casado P, Neto V, Duarte ME, Aguiar D. Synovial fluid and synovial membrane mesenchymal stem cells: latest discoveries and therapeutic perspectives. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2014;5(5):112. Available from: <http://stemcellres.com/content/5/5/112>
2. WOOLF, A. D.; PFLEGER B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bulletin of the World Health Organisation*. 2003;9(3):2003.
3. A. Woolf, T. Litovitz. Reporting of Adverse Events. *N Engl J*. 2003;Med. 3(3):1410–1.
4. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG, et al. Cartilage Injuries: A Review of 31 , 516 Knee Arthroscopies. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg* [Internet]. 1997;13(4):456–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9276052>
5. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: Study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee*. 2007;14(3):177–82.
6. Ibarra C, Izaguirre A, Villalobos E, Masri M, Lombardero G, Martinez V, et al. Follow-up of a new arthroscopic technique for implantation of matrix-encapsulated autologous chondrocytes in the knee. *Arthrosc - J Arthrosc Relat Surg* [Internet]. 2014;30(6):715–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2014.02.032>
7. Lotz MK, Kraus VB. New developments in osteoarthritis. Posttraumatic osteoarthritis: pathogenesis and pharmacological treatment options. *Arthritis Res Ther*. 2010;12:211.
8. Nordenvall R, Bahmanyar S, Adami J, Mattila VM, Felländer-Tsai L. Cruciate ligament reconstruction and risk of knee osteoarthritis: the association between cruciate ligament injury and post-traumatic osteoarthritis. a population based nationwide study in Sweden, 1987-2009. *PLoS One*. 2014;9(8):e104681.
9. Goodrich LR, Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - A review. *Vet J*. 2006;171(1):51–69.
10. Ashraf S, Ahn J, Cha BH, Kim J-S, Han I. RHEB: a potential regulator of chondrocyte phenotype for cartilage tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016;4(7):524–31.
11. Marlovits S, Hombauer M, Truppe M, Vécsei V, Schlegel W. Changes in the ratio of type-I and type-II collagen expression during monolayer culture of human chondrocytes. *J Bone Jt Surg* [Internet]. 2004;86(2):286–95. Available from: <http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/cgi/doi/10.1302/0301-620X.86B2.14918>
12. Robert JS. Model systems in stem cell biology. *BioEssays*. 2004;26(9):1005–12.
13. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663–76.
14. Sabapathy V, Kumar S. hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. *J Cell*

- Mol Med. 2016;20(8):1571–88.
15. Tavassoli M. Transplantation Marrow. 1968;161:7–9.
 16. Friedenstein AJCRKLKS. THE DEVELOPMENT O F FIBROBLAST COLONIES I N MARROW A N D SPLEEN CELLS. Cell Tissue Kinet. 1970;3:393–403.
 17. Kuznetsow EALEOJFFMA. Bone formation in organ cultures of bone marrow. Cell Tissue Res. 1987;248(2):449–54.
 18. Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells.pdf. J Orthop Res. 1991;9(9):641–50.
 19. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov U V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro vultivation and Transplantation in Diffusion Chambers. 1987;263–72.
 20. GARY L. PITTENGER P, RAYAZ A. MALIK, MD P, NICULINA BURCUS M, ANDREW J. BOULTON M, AARON I. VINIK, MD P. S p e c i f i c Fiber Deficits in Sensorimotor D i a b e t i c P o l y n e u r o p a t h y Correspond to of Sera From Patients With Diabetes. Diabetes Care. 1999;22(11):1839–44.
 21. Irfan-Maqsood M1, Matin MM1, Heirani-Tabasi A2, Bahrami M1, Naderi-Meshkin H2, Mirahmadi M2, Hassanzadeh H2, Sanjar Moussavi N3, Raza-Shah H4, Raeesolmohaddeseen M2, Bidkhorji H2 BA. Adipose derived mesenchymal stem cells express keratinocyte lineage markers in a co-culture model. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2016;30(62(5)):44–54.
 22. Fu W-L, Zhou C-Y, Yu J-K. A New Source of Mesenchymal Stem Cells for Articular Cartilage Repair. Am J Sports Med [Internet]. 2014;42(3):592–601. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0363546513512778>
 23. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod. 2004;19(6):1450–6.
 24. Shi S, Gronthos S. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. J BONE Miner Res. 2003;18(4):696–704.
 25. Bi Y, Ehrchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. Nat Med [Internet]. 2007;13(10):1219–27. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nm1630>
 26. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. Cytotherapy [Internet]. 2004;6(6):543–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240410005366-1>
 27. De Bari C, Dell ’accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent Mesenchymal Stem Cells From Adult Human Synovial Membrane. Arthritis Rheum. 2001;44(8):1928–42.
 28. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. Cell Stem Cell. 2008;3(3):301–13.
 29. Karimineko S, Movassaghpour A, Rahimzadeh A, Talebi M, Shamsasenjan K, Akbarzadeh A. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol [Internet]. 2016;44(3):749–57. Available from:

- <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2015.1129620>
30. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
 31. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells [Internet]*. 2007;25(11):2739–49. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0197>
 32. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol [Internet]*. 2002;30(1):42–8. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11823036
 33. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*. 2000;24(4):372–6.
 34. Lopez MJ, Daigle PR. Adult Multipotent Stromal Cell Technology for Bone Regeneration: A Review. *Vet Surg*. 2013;42(1):1–11.
 35. McGonagle D, Jones E. A potential role for synovial fluid mesenchymal stem cells in ligament regeneration. *Rheumatology*. 2008;47(8):1114–6.
 36. Jones EA, Crawford A, English A, Henshaw K, Mundy J, Corscadden D, et al. Synovial fluid mesenchymal stem cells in health and early osteoarthritis: Detection and functional evaluation at the single-cell level. *Arthritis Rheum*. 2008;58(6):1731–40.
 37. Horie M, Sekiya I, Muneta T, Ichinose S, Matsumoto K, Saito H, et al. Intra-articular Injected Synovial Stem Cells Differentiate into Meniscal Cells Directly and Promote Meniscal Regeneration Without Mobilization to Distant Organs in Rat Massive Meniscal Defect. *Stem Cells [Internet]*. 2009;27(4):878–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2008-0616>
 38. Morito T, Muneta T, Hara K, Ju YJ, Mochizuki T, Makino H, et al. Synovial fluid-derived mesenchymal stem cells increase after intra-articular ligament injury in humans. *Rheumatology*. 2008;47(8):1137–43.
 39. Koga H, Muneta T, Ju Y-J, Nagase T, Nimura A, Mochizuki T, et al. Synovial Stem Cells Are Regionally Specified According to Local Microenvironments After Implantation for Cartilage Regeneration. *Stem Cells [Internet]*. 2006;25(3):689–96. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2006-0281>
 40. Ando W, Tateishi K, Katakai D, Hart D a, Higuchi C, Nakata K, et al. In vitro generation of a scaffold-free tissue-engineered construct (TEC) derived from human synovial mesenchymal stem cells: biological and mechanical properties and further chondrogenic potential. *Tissue Eng Part A*. 2008;14(12):2041–9.
 41. Ando W, Tateishi K, Hart DA, Katakai D, Tanaka Y, Nakata K, et al. Cartilage repair using an in vitro generated scaffold-free tissue-engineered construct derived from porcine synovial mesenchymal stem cells. *Biomaterials*.

- 2007;28(36):5462–70.
42. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1996;78(5):721–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642029>
 43. Koga H, Shimaya M, Muneta T, Nimura A, Morito T, Hayashi M, et al. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2008;10(4):R84. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2575632&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 44. Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P. Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol*. 2009;10:29.
 45. Verma S, Younus J, Stys-Norman D, Haynes AE, Blackstein M. Dose-intensive chemotherapy with growth factor or autologous bone marrow/stem cell transplant support in first-line treatment of advanced or metastatic adult soft tissue sarcoma: A systematic review. *Cancer*. 2008;112(6):1197–205.
 46. Broxmeyer HE. *Biomolecule-Cell Interactions and the Regulation of Myelopoiesis*. 1986;5.
 47. TAYLOR SE, SMITH RKW, CLEGG PD. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction? *Equine Vet J* [Internet]. 2007;39(2):172–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2746/042516407X180868>
 48. Fortier LA, Travis AJ. Stem Cells in Veterinary Medicine. *Stem Cell Res Ther*. 2011;2(9):1–6.
 49. Platzer E. Human hemopoietic growth factors. *Eur J Haematol*. 1989;42(1):1–15.
 50. CARRANZA R. *VAM VADEMECUM ACADEMICO DE MEDICAMENTOS*, 5A.ED. 5a. ed.,. 2009.
 51. Jolles S, Sewell WAC, Misbah SA. Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2005;142(1):1–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2249.2005.02834.x>
 52. Villalobos EIP de LCIHAVM. Evaluación Clínica y por Imagen con Mapeo T2 por Resonancia Magnética del Trasplante de Condrocitos Autólogo vs Microfracturas para la reparación de Cartilago Articular en Rodilla Ensayo Clínico Controlado. Vol. 2. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
 53. Helmick CG, Felson DT, Lawrence RC, Gabriel S, Hirsch R, Kwoh CK, et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum*. 2008;58(1):15–25.
 54. Lin C-S, Lue TF. Defining Vascular Stem Cells. *Stem Cells Dev* [Internet]. 2013;22(7):1018–26. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/scd.2012.0504>
 55. Hatakeyama A, Uchida S, Utsunomiya H, Tsukamoto M, Nakashima H, Nakamura E, et al. Isolation and Characterization of Synovial Mesenchymal Stem Cell Derived from Hip Joints: A Comparative Analysis with a Matched

- Control Knee Group. *Stem Cells Int.* 2017;2017:8–10.
56. C. GGRI. Aislamiento y Cultivo de Células Troncales Mesenquimales en Caballos y Cerdos a Partir de Sangre Periferica y Tejido Adiposo. Universidad Nacional Autonoma de México; 2009.
 57. Lev R SS. Specific staining of sulfate groups with alcian blue at low pH. *J Histochem Cytochem.* 1964;12:309.
 58. Pittenger MF. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science* (80-) [Internet]. 1999;284(5411):143–7. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5411.143>
 59. Lian JB, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. *Iowa Orthop J* [Internet]. 1995;15:118–40. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2329080&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 60. Puetzer JL, Petite JN, Lobo EG. Comparative Review of Growth Factors for Induction of Three-Dimensional *In Vitro* Chondrogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Bone Marrow and Adipose Tissue. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2010;16(4):435–44. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.teb.2009.0705>
 61. Bieback, Karen | Kern, Susanne | Kocaömer, Asli | Ferlik, Kathrin | Bugert P. Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: Bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* [Internet]. 2008;18(1 suppl.):S71-6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18334717>
 62. Krawetz RJ, Wu YE, Martin L, Rattner JB, Matyas JR, Hart DA. Synovial Fluid Progenitors Expressing CD90+ from Normal but Not Osteoarthritic Joints Undergo Chondrogenic Differentiation without Micro-Mass Culture. *PLoS One.* 2012;7(8):1–10.
 63. Hwang NS, Im SG, Wu PB, Bichara DA, Zhao X, Randolph MA, et al. Chondrogenic priming adipose-mesenchymal stem cells for cartilage tissue regeneration. *Pharm Res.* 2011;28(6):1395–405.
 64. Jones EA, English A, Henshaw K, Kinsey SE, Markham AF, Emery P, et al. Enumeration and Phenotypic Characterization of Synovial Fluid Multipotential Mesenchymal Progenitor Cells in Inflammatory and Degenerative Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):817–27.
 65. Fujikawa K, Kobayashi T, Sasazaki Y, Matsumoto H, Seedhom BB. Anterior Cruciate Ligament Reconstruction with the Leeds-Keio Artificial Ligament. *J Long Term Eff Med Implants* [Internet]. 2000;10(4). Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/1bef42082d7a0fdf,258ad975056e0dd8,023050f23d0fef22.html>
 66. Dowthwaite GP. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* [Internet]. 2004;117(6):889–97. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00912>
 67. Luyten FP, Lories RJU, Verschueren P, de Vlam K, Westhovens R. Contemporary concepts of inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20(5):829–48.
 68. Schmidt TA, Schumacher BL, Klein TJ, Voegtline MS, Sah RL. Synthesis of

proteoglycan 4 by chondrocyte subpopulations in cartilage explants, monolayer cultures, and resurfaced cartilage cultures. *Arthritis Rheum.* 2004;50(9):2849–57.

69. Kafienah W, Mistry S, Dickinson SC, Sims TJ, Learmonth I, Hollander AP. Three-dimensional cartilage tissue engineering using adult stem cells from osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.* 2007;56(1):177–87.

Anexos

Consentimiento informado

INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA.

Calzada México Xochimilco No. 289. Col. Arenal de Guadalupe. Delegación Tlalpan. México,
Distrito Federal. C.P 14389.

CARTA DE CONSENTIMIENTO BAJO AUTORIZACION CONSIDERADO PARA LA INVESTIGACION: "Aislamiento y Caracterización de Células Troncales Mesenquimales Obtenidas a Partir de Líquido Sinovial de articulación de rodilla y cadera en Pacientes con osteoartritis: Investigación Piloto"

Iniciales del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en esta investigación médica. A realizarse en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, en el servicio de Ortopedia del Deporte y Artroscopia, en conjunto con la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido la investigación y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, del cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN: Aproximadamente uno de cada seis adultos mayores en México es afectados por enfermedades articulares degenerativas (osteoartritis), sin dejar de mencionar el elevado número de pacientes jóvenes con lesiones de cartílago secundarias a accidentes o traumatismos. En la actualidad, no existe aún ningún método científicamente comprobado que regenere apropiadamente la estructura y función del cartílago articular nativo. Para la ciencia y la medicina, es de considerable importancia desarrollar técnicas seguras y efectivas para eliminar el dolor y las limitaciones funcionales a los que están sometidos los pacientes con lesiones articulares.

Una de las líneas actuales que nos permite formar cartílago es a partir del **cultivo celular**. En el caso del cultivo de condrocitos se requiere una biopsia (muestra) proveniente de una zona sana de la rodilla; sin embargo, el número de células (condrocitos) obtenidas en esa pequeña muestra es muy escaso para reparar una lesión. Ante esto se podría decir que "se quita tejido de una zona sana para pasarlo a una zona lesionada" pero a través de 2 procedimientos quirúrgicos: toma de biopsia e implante de las células cultivadas en el laboratorio. Una opción viable y sin necesidad de requerir 2 cirugías es la utilización de células troncales mesenquimales (células madre). Generalmente estas células han sido extraídas de la médula ósea de la cresta iliaca (hueso de "la cadera"), lo cual involucra un

procedimiento quirúrgico con los riesgos (anestesia, sangrado, infección, etc.) y gastos que lo conllevan. Estas circunstancias hacen a esta técnica poco eficaz y segura para el donador. Una fuente alternativa de obtención de "células madre", sin necesidad de otra cirugía son las **células troncales movilizadas** de sangre periférica; la cual se considera una opción técnicamente más sencilla, con menor costo y sobre todo con menor riesgo para el donador. Este procedimiento implica la administración intramuscular de factores de crecimiento (sustancias que estimulan movilización de las células troncales de los órganos que las producen hacia el torrente sanguíneo). Días después de la administración de los factores de crecimiento, se extrae una cantidad de sangre por la vena como si fuera a donar un paquete globular. Dicha sangre contendrá un elevado contenido de células madre que pueden dar origen a las células del cartílago y de esta forma reducir la necesidad de tomar la biopsia de una zona sana para pasarlo a otra zona enferma.

El objetivo principal de esta investigación es obtener **células troncales mesenquimales** y posteriormente diferenciarlas a condrocitos (cartílago) a partir de muestras de líquido sinovial y médula ósea. Para el caso de artroscopias se obtendrá la muestra previa a la realización de portales artroscópicos realizando artrocentesis e infiltrando 20 mililitros de solución fisiológica y al momento de realizar el portal antero lateral se procederá a toma de muestra. En caso de artroplastia total de rodilla se tomará la muestra de líquido sinovial al realizar la artrotomía, y la muestra de médula ósea se realizará al realizar los cortes para colocación de componentes tanto femoral como tibial. (muestras que usualmente son desechos biológicos) A partir de estas muestras, se procede a cultivo de las células Troncales Mesenquimales y su diferenciación a las tres líneas celulares (condrocitos, adipocitos, hueso), una vez diferenciadas las células de la línea de condrocitos, estos permanecerán congelados para su conservación, para fines investigativos y valorar viabilidad de las mismas.

BENEFICIOS DE LA INVESTIGACIÓN. Todos los pacientes que autoricen participar en esta investigación recibirán asesoría y apoyo médico continuo. Este protocolo forma parte de una investigación amplia. En el cual se intentará trasladar en un futuro los resultados preclínicos a la clínica con el objetivo de: aliviar el dolor, mejorar la movilidad de la articulación, retorno a actividades deportivas y prevenir la progresión a osteoartritis (OA).

PROCEDIMIENTOS DE LA INVESTIGACIÓN. En caso de aceptar participar en la investigación se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos. No se le administrará ningún medicamento. Usted será preparado para su cirugía: artroscopia de rodilla, o reemplazo articular total de rodilla (prótesis), de forma rutinaria, una vez en quirófano se realizara el procedimiento anestésico correspondiente, y se procederá, con la cirugía, con los pasos ya establecidos, en caso de Artroscopia de rodilla, se infiltrara la rodilla con solución fisiológica como es de rutina en los procedimientos artroscópicos, al realizar en portal antero lateral, se procederá en forma inmediata a la recolección de líquido que sale a través de dicho portal (herida), en un contenedor plástico estéril; normalmente este líquido se desecha como residuo biológico. En las prótesis de Rodilla, se realiza el procedimiento de rutina, al abordar la capsula articular y realizar su corte con ayuda de una jeringa estéril se procede a coleccionar liquido sinovial; tejido que normalmente se desecha como residuo biológico, y una vez realizado la osteotomía (corte de hueso) en tibia y fémur,

pasos rutinarios en el procedimiento quirúrgico se tomara muestra de medula ósea con una nueva jeringa estéril.

La muestra de líquido sinovial como de médula ósea serán colectadas y llevadas a la unidad de UQB, situada dentro del área que quirófano. Y se procederá a al cultivo de células madre mesenquimales.

RIESGOS ASOCIADOS CON LA INVESTIGACIÓN. Este protocolo se considera como una investigación con riesgo mayor al mínimo al tratarse de una investigación para obtener muestra de líquido sinovial, y médula ósea (material que regularmente se desecha como residuo biológico) aprovechando los pasos establecidos de la cirugía programada, al realizar un procedimiento quirúrgico según la Ley General de Salud en Materia de Investigación. No existen efectos adversos propios de la toma de muestra tanto para líquido sinovial como para médula ósea. Por otro lado, si existen los riesgos de la cirugía que son: infección, lesiones nerviosas y vasculares en la rodilla afectada, y eventos adversos relacionados con la anestesia y medicamentos como hipersensibilidad. Complicaciones que serán asumidas por el médico tratante.

ACLARACIONES:

- Su decisión de participar en la investigación es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted si no acepta la invitación, ello no demeritará de ninguna manera en la calidad de atención que reciba en el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra.
- Si decide participar en la investigación puede retirarse en el momento que lo desee, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gastos extras durante la investigación, ni recibirá pago por su participación; el costo de los factores de crecimiento, cultivo celular, **NO TENDRAN NINGUN COSTO PARA USTED.**
- Tenga la seguridad de que no se revelara su identidad, y se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa a este documento.
- En caso de sufrir daños directamente causados por la investigación (Toma de muestras de líquido sinovial y medula ósea; material considerado como desechos biológicos), se pondría a disponibilidad tratamiento médico y la indemnización a que legalmente tendría derecho por parte del INR, según Art. 21, fracción X, RLGSMIS.

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

He leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en la investigación pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en esta investigación. Recibiré un ejemplar firmada y fechada de esta forma de consentimiento. Asimismo, por mi propio derecho, en pleno uso de mis facultades y por mi

libre decisión, otorgo la más amplia autorización al Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra, a efecto de que se lleve a cabo la conservación de tejidos y células, para propósitos científicos y de enseñanza.

Finalmente, autorizo la toma de fotografías y/o videos en el transcurso de mi tratamiento con el propósito de utilizarlos en la enseñanza y/o publicaciones de tipo médico conservando la confidencialidad.

Estoy consciente que los procedimientos, pruebas y tratamientos realizados serán para el beneficio de los pacientes con lesiones del cartílago articular; tendiendo como objetivos reducir el dolor, mejorar la movilidad articular y la calidad de vida de los pacientes afectados.

Es de mi conocimiento que seré libre de retirarme de la presente investigación, en el momento que yo así lo desee y que puedo solicitar información adicional acerca de los riesgos y beneficios de mi participación en la investigación. En caso de que decidiera retirarme, la atención que, como paciente recibo, no se verá afectada.

_____ Nombre del Paciente o Representante Legal	_____ Firma
---	-----------------------

_____ Nombre del Testigo 1 Relación con el paciente	_____ Firma
---	-----------------------

_____ Nombre del Testigo 2 Relación con el paciente	_____ Firma
---	-----------------------

TESTIGO 1

Dirección: _____
Delegación: _____ CP _____ Ciudad: _____
Teléfono casa: _____ Celular: _____
Correo electrónico: _____

TESTIGO 2

Dirección: _____
Delegación: _____ CP _____ Ciudad: _____
Teléfono casa: _____ Celular: _____
Correo electrónico: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al participante la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. A través de una cita en la que se explica con el apoyo de medios audiovisuales y en lenguaje sencillo. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre del Investigador Responsable

Firma

México DF. a ____ de _____ de 2017

Ante cualquier eventualidad o duda puede contactar a los investigadores:

Telefono: 55-99-10-00, Ext. 19607

Dra. Anell Olivos Meza

Dr. Víctor Hugo Cárdenas Soria

Telefono: 5514314192

Ortopedia del Deporte y Artroscopia

5to piso de la torre de hospitalización de Ortopedia

Instituto Nacional de Rehabilitación LGII