



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DEL  
CARTÍLAGO ARTICULAR EN UN CONSTRUCTO A 6 MESES  
DE SER IMPLANTADO EN UN MODELO EXPERIMENTAL  
OVINO.**

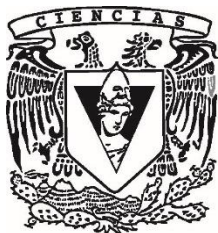
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

**ANDREA SALINAS ROJAS**



**DIRECTOR DE TESIS:  
D. EN C. CARLOS LANDA SOLÍS  
Ciudad de México, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## Hoja de datos

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Carrera  
Número de cuenta

Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
310165343

2. Datos del tutor  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

2. Datos del tutor  
Dr.  
Carlos  
Landa  
Solís

3. Datos del sinodal 1  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Ricardo  
Gómez  
García

4. Datos del sinodal 2  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
Luis Felipe  
Jiménez  
García

5. Datos del sinodal 3  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3  
Dra.  
Anell  
Olivos  
Meza

6. Datos del sinodal 4  
Grado  
Nombre(s)  
Apellido paterno  
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4  
M en C  
Víctor Hugo  
Cárdenas  
Soria

7. Datos del trabajo escrito.

7. Datos del trabajo escrito.

Título

Análisis de la expresión de proteínas del  
cartílago articular en un constructo a 6 meses  
de ser implantado en un modelo experimental  
ovino.

Número de páginas  
Año

52 p.  
2019

## **Agradecimientos**

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México mi alma máter.

Al M. en C Jose Luis Silencio Barrita. Por ser mi mentor, darme la oportunidad de adentrarme al ámbito científico. Gracias por confiar en mi, darme su apoyo incondicional, comprensión y cariño que siempre serán invaluable para mi.†

Al Dr. Carlos Landa Solís por enseñarme a avanzar de forma autosuficiente, a dar mis propios pasos y cimentar las bases para mi desarrollo académico. Gracias por su enorme paciencia, comprensión y amistad. Realmente me ha ayudado a ser una mejor estudiante y profesionista.

Agradezco el apoyo incondicional de Azur; quien a pesar de no poder leer estas líneas, estuvo siempre a mi lado cuando lo necesité.

Agradezco al comité sinodal por el tiempo dedicado al entendimiento y análisis de mi trabajo.

A las dos personas de mi vida, por lo que pude aprender, sus aportaciones y animos para avanzar por mi cuenta. Gracias por el apoyo y la paciencia que me brindaron durante esta trayectoria.

## **Dedicatoria**

Sin la intención de enaltecer mi ego, dedico este trabajo a mi persona; el apoyo externo es importante; el esfuerzo es fundamental, más que un elogio narcisista, este escrito representa el triunfo sobre las adversidades, luchas constantes, lagrimas e incluso sentimientos encontrados, nunca imagine llegar tan lejos, tampoco creí que lo lograría, y eso es algo que debe ser reconocido por uno mismo antes que los demás.

A mi madre, quien me facilito lo necesario para realizar los estudios concernientes a este trabajo que hoy concreto.

"Y una vez que la tormenta haya terminado, no sabrás cómo sobreviviste. Ni siquiera estarás seguro si la tormenta ha terminado realmente. Pero una cosa es segura. Cuando salgas de esa tormenta, no serás la misma persona que entró en ella. De eso se trata la vida."

H. Murakami 2006. Kafka en la orilla

# Contenido

|   |    |
|---|----|
| Abreviaturas .....  | 3  |
| Resumen .....   | 4  |
| Marco teórico.....  | 6  |
| La célula .....   | 6  |
| Células troncales.....  | 7  |
| Células Troncales Mesenquimales.....  | 8  |
| Diferenciación de células troncales mesenquimales a Cartílago.....  | 9  |
| Características del cartílago articular.....  | 10 |
| Andamios elaborados con biomateriales, para sostén de células troncales mesenquimales diferenciadas a cartílago ..... | 11 |
| Antecedentes de la tesis.....   | 12 |
| Justificación .....   | 14 |
| Hipótesis.....  | 14 |
| Objetivo general .....  | 15 |
| Objetivos particulares.....   | 15 |
| Materiales y métodos .....  | 16 |
| Medio de encastración para cortes por ultra congelación.....  | 16 |
| Cortes de ultra congelación en criostato a -30 °C.....  | 16 |
| Histología .....  | 16 |
| Tinción con hematoxilina y eosina.....  | 16 |
| Tinción azul alciano .....  | 16 |
| Inmunofluorescencias .....  | 17 |
| Captura y análisis de las imágenes .....  | 18 |
| Microscopio Axio.....   | 18 |
| Análisis de las imágenes.....   | 19 |
| Capturas de pantalla desde la apertura del software .....   | 19 |
| Presentación de los datos .....   | 21 |
| Análisis estadístico .....  | 21 |
| RESULTADOS.....   | 22 |
| Análisis de la expresión de fluorescencia .....   | 23 |
| Discusión .....   | 32 |
| Conclusión.....   | 35 |
| Bibliografía .....  | 36 |
| Anexos .....  | 42 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Anexo. 1 Blast protein secuencia de proteínas de humano y comparación para cada uno de los marcadores.....</b> | <b>42</b> |
| <b>Anexo 2. Pruebas de Kolmogorov-Smirnov.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>Anexo. 3 Tabla de tinciones H&amp;E.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>Anexo. 4 Análisis estadístico prueba T para muestras independientes.....</b>                                   | <b>45</b> |

## Abreviaturas

| Abreviatura             | Descripción   |
|-------------------------|---|
| MO                      | Medula ósea   |
| CTMs                    | Células troncales mesenquimales                               |
| PLA                     | Ácido poliláctico   |
| MEC                     | Matriz extracelular   |
| COL2A1                  | Colágena 2 alfa 1   |
| AGR                     | Agrecano  |
| SOX 9                   | Gen SOX 9   |
| TIMPs                   | Metaloproteinasas inhibidoras de tejido                       |
| MMPs                    | Metaloproteinasas   |
| MPa                     | Mega pascuales  |
| Hz                      | Hertz   |
| CT                      | Células troncales   |
| CTE                     | Células troncales embrionarias                                |
| SSC                     | Tejido específico o somáticas                                 |
| ESC                     | Células internas formadoras del blastocito                    |
| CFU-Fs                  | Unidad formadora de colonias<br>fibroblásticas                |
| TGF- $\beta$            | Factor de crecimiento transformante beta                      |
| (CD73, CD90<br>y CD105) | Marcadores de superficie                                      |
| MHC-1                   | Moléculas del sistema mayor de<br>histocompatibilidad humana. |



## Resumen

En la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de las lesiones focales del cartílago articular se ha propuesto el uso de constructos o biomateriales, los cuales son matrices bioabsorbibles para restituir la superficie articular como soporte.

Este trabajo surgió de un proyecto previo donde Landa y colaboradores obtuvieron células troncales mesenquimales (CTMs) de sangre periférica de dos borregos de la raza Suffolk. Posteriormente separaron las células hematopoyéticas por selección negativa, las diferenciaron a cartílago, las mantuvieron en cultivo, se implantaron en constructos de ácido poliláctico (PLA) y se injertaron en los borregos. Los constructos se mantuvieron por 3 y 6 meses dentro de los borregos, y pasado ese tiempo cada constructo fue extraído y almacenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

El presente proyecto consistió en la realización de cortes histológicos de cartílago de los constructos previamente almacenados, para posteriormente describir las características histológicas e identificar las proteínas características del cartílago articular. Después se realizaron inmunofluorescencias utilizando los marcadores SOX9, COL2A1 y Agrecano, que son proteínas características del cartílago articular. Asimismo, se cuantificó la fluorescencia y se observó la similitud que había entre el cartílago nativo y el injerto implantado.

Con base en los resultados, se puede decir que los injertos podrían mejorar la estructura del cartílago y esto por su parte puede ser prometedor en un tiempo para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas de las lesiones focales del cartílago articular.

## **Abstract**

In the search of new alternatives for the treatment of focal lesions of articular cartilage, the use of constructs or biomaterials has been proposed, which are bioabsorbable matrices to restore the articular surface as a support.

The project arose from previous work by Landa and collaborators who obtained mesenchymal stem cells (MSCs) from peripheral blood of two Suffolk sheep. Then they isolated hematopoietic cells by negative selection, differentiated them to cartilage, withheld them in culture, implanted them in polylactic acid (PLA) constructs, and subsequently grafted them into two sheep. The constructs were maintained for 3 and 6 months inside the sheep, and after that time each construct was extracted and stored at -80 ° C.

The present project consisted in the realization of cartilage sections of the previously stored constructs, to later describe the histological characteristics and identify the characteristic proteins of the articular cartilage after being implanted. Further, immunofluorescences were performed using SOX9, COL2A1 and Aggrecan markers, which are characteristic proteins of the articular cartilage. The fluorescence was then quantified and the similarity between the native cartilage and the implanted graft was observed.

Based on the results, it can be said that the grafts could improve the structure of the cartilage and this in turn may be promising in the near future for the development of new therapeutic strategies for focal lesions of the articular cartilage.

## **Marco teórico**

### *La célula*

Las células se dividen en dos clases principales, inicialmente definidas según contengan o no núcleo. Las células procariotas carecen de envoltura nuclear; las células eucariotas presentan un núcleo donde el material genético está separado del citoplasma. Las células procariotas generalmente son más pequeñas y simples que las células eucariotas; además de la ausencia de núcleo, sus genomas son menos complejos y no contienen orgánulos citoplasmáticos. Al margen de estas diferencias, los mismos mecanismos moleculares gobiernan las vidas de procariotas y eucariotas, indicando que todas las células presentes hoy descienden de un ancestro primordial único.

Por esta razón la idea de que la célula es el componente básico de los organismos, surgió antes de 1838 cuando Matthias Jakob Schleiden y Theodor Schwann afirmaron que "las partes elementales de todos los tejidos están formadas por células" y que "existe un principio universal de desarrollo para las partes elementales de los organismos y este principio está en la formación de células."<sup>1</sup> Así mismo, todas las funciones vitales emanan de la maquinaria celular y de la interacción de células adyacentes; además, la tendencia de la información genética, que es base de la herencia, en su ADN permite la transmisión de esta información de generación en generación.<sup>2</sup>

Las células suelen poseer en promedio un tamaño de 10µm y una masa de 1ng, aunque existen células con espesor mayor; los elementos constituyentes de los seres vivos como los átomos y moléculas, se encuentran unidos por medio de enlaces que estabilizan estas uniones llevando un orden en la estructura molecular y formar precursores muy simples bajo peso molecular, los cuales por medio de reacciones químicas, se convierten en moléculas intermediarias, que a su vez se unen y forman moléculas de mayor peso molecular, estas moléculas evolucionan y alcanzan cierto grado de especialización.

El cuerpo humano, por ejemplo, está compuesto por más de 200 tipos de células diferentes, consideradas generalmente como componentes de los cinco tipos principales de tejidos: tejido epitelial, tejido conectivo, sangre, tejido nervioso y tejido muscular.

la vida se caracteriza por una jerarquía de estructuras y de controles funcionales que comprenden una escala que va desde las mas diminutas interacciones atómicas y moleculares.<sup>3</sup>

Su organización está basada en el orden y su estabilidad dinámica lo que constituyen las características de los fenómenos vitales y de su regularización para asociarse entre sí en forma de colonias; esta asociación se acentúa más a través de la evolución creándose con esto una diferenciación que lleva en primera instancia la formación de tejidos, que constituirán a su vez órganos y estos en cooperación con otros formarán aparatos y sistemas, que en conjunto darán origen a los organismos.

De esta forma los niveles de organización de la célula representan diferentes etapas evolutivas.

### ***Células troncales***

Así mismo a las células troncales (*CT*) que son células indiferenciadas con capacidad de proliferación y auto-renovación. Por estas características, las *CT* son una excelente herramienta con gran potencial en la medida regenerativa. Las *CT* en diferentes etapas del desarrollo parecen tener diferentes capacidades de auto-renovación y diferenciación. A grandes rasgos existen dos tipos de *CT*: las células troncales embrionarias (*CTE*) y las células troncales del adulto, tejido específico o somáticas (*SSC* por sus siglas en ingles). Además, las *CT* 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.<sup>4</sup>

Las *CT* totipotenciales son aquellas que son obtenidas en la etapa de pre-blastocisto 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 el blastocito (*ESC*, por sus siglas en inglés) son células pluripotentes<sup>4</sup>

Las *ESC* 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.

Las *SSC* se encuentran más restringidas en cuanto a su diferenciación hacia otras estirpes, por lo que se les denomina multipotentes;<sup>4</sup> sin embargo, se ha reportado en la literatura que algunos tipos de *SSC* presentan factores críticos del mantenimiento de la pluripotencia como *Oct3/4* y *Sox2*, por lo que se les puede denominar como pluripotentes.<sup>5</sup> Por otra parte las células unipotentes, a pesar de que son denominadas *SC*, no se les debería llamar así, ya que sólo cumplen con la condición de ser auto-renovables y, por lo tanto, no cumplen con de las criterios mínimos para considerarse como *CT*.<sup>4</sup>

### ***Células Troncales Mesenquimales***

Tavassoli y Crosby demostraron el potencial osteogénico de la médula ósea (*MO*). Cohenheim fue el primero que sugirió la presencia de las células hematopoyéticas en la *MO*. Sin embargo, no fue hasta hace apenas 50 años que Friedenstein y colaboradores lograron identificar dos tipos de *CT* en la *MO*.<sup>6</sup> Una de ellas y más abundante a denominaron células troncales hematopoyéticas y a la segunda población células troncales de la *MO* estromales, ya que formaban una unidad formadora de colonias fibroblástica (*CFU-Fs*, por sus siglas en inglés).<sup>7</sup> Después, demostraron que dichas células eran capaces de generar células de hueso,<sup>8</sup> cartílago,<sup>9</sup> grasa y tejido conectivo fibroso.<sup>10,11</sup> En 1991, Caplan denominó a estas células como células troncales mesenquimales (*CTM*).<sup>9</sup>

Las *CTM* no solo se encuentran en la *MO*, también se han identificado en tejido adiposo,<sup>12</sup> sangre de cordón umbilical, sangre periférica movilizada,<sup>13</sup> líquido amniótico,<sup>14</sup> pulpa dentaria,<sup>15</sup> tendones,<sup>16</sup> vellosidades coriónicas,<sup>17</sup> membrana sinovial,<sup>18</sup> y músculo esquelético,<sup>19</sup> entre otros. Las principales características de las *CTM* son las siguientes:<sup>20</sup>

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

Fenotípicamente, las *CTM* expresan una serie de marcadores de superficie no específicos (*CD73*, *CD90* y *CD105*), que nos permiten diferenciar este tipo celular 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 u otra especie animal.<sup>21</sup>

Una de las propiedades de las *CTM* es la inmunosupresión, a pesar de que las moléculas del sistema mayor de histocompatibilidad humana (*MHC-I*) 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.<sup>22</sup>

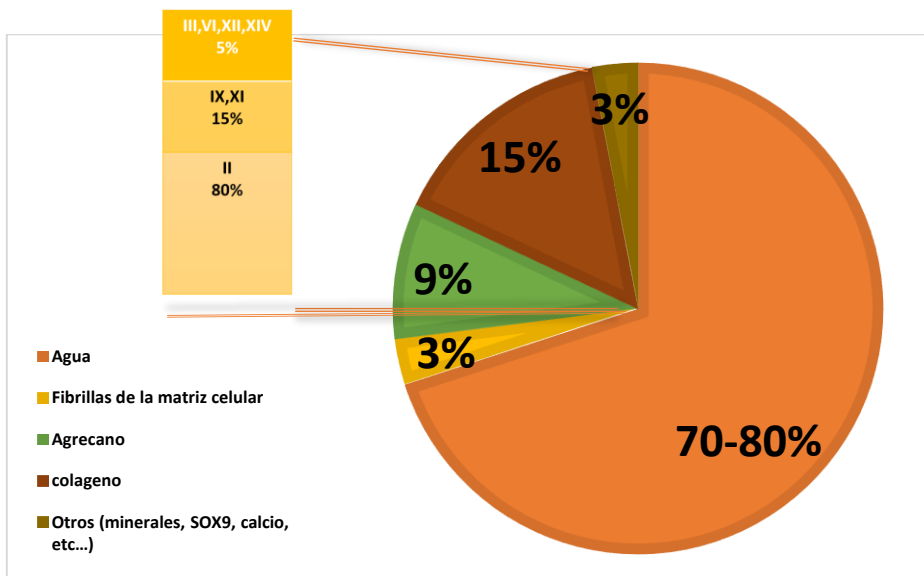
### ***Diferenciación de células troncales mesenquimales a Cartílago***

La diferenciación de las *CTM* hacia cartílago puede ser obtenida *in vitro* modificando las condiciones de los cultivos mediante el uso de factores de crecimiento durante su proliferación, los mejores candidatos que proveen las señales para inducir la condrogénesis son los miembros de la familia del factor de crecimiento transformante beta (*TGF-β*) incluyendo  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$  junto con la activación del factor transcripcional *SOX9*.<sup>23</sup> El factor transcripcional *SOX9* codifica para varios grupos de dominios de unión a DNA y ha sido identificado como un factor de transcripción crítico para la diferenciación y el mantenimiento del fenotipo condral. La expresión de colágena tipo II el mayor componente de la matriz extracelular condral está regulada por *SOX9* dada por la unión de *SOX9* al gen *Col2A*,<sup>24</sup> *SMAD3* estimula primero la condrogénesis y modula la asociación entre *SOX9* y *p300*. *SOX9* específicamente se une al intrón de *Col2a1* y regula su transcripción.<sup>25</sup> Se ha descrito que los miembros de la familia del *TGF-β* también

estimulan la vía de *MAPK* durante la condrogénesis.<sup>26</sup> Así *MAPK* estimula la expresión de *Col2a1* y *SOX9* y estas dos vías son importantes para la expresión del gen que codifica a la expresión de agregano el mayor proteoglicano en el cartílago.<sup>27</sup> En modelos animales se ha descrito la diferenciación de *CTM* que fueron movilizadas a cartílago en pequeñas especies como el conejo.<sup>13</sup>

### ***Características del cartílago articular***

La integridad del cartílago es esencial para la adecuada función articular, con frecuencia resulta lesionado por traumatismos o por condiciones de degeneración que pueden ocasionar osteoartritis; esto es particularmente frecuente en articulaciones sometidas a carga tanto en animales cuadrúpedos como en humanos. La unidad funcional de cartílago articular condrocitos los cuales sólo son cerca del 2% del total del tejido, además está compuesto por una matriz extracelular (*MEC*) compuesta de agua en un 75- 80 %, fibras de colágena en un 15% y proteoglicanos en un 9-10%.<sup>28</sup>



**Fig. 1 Componentes de cartílago, imagen modificada del artículo *Aigner et al.*<sup>29</sup>**

## *Andamios elaborados con biomateriales, para sostén de células troncales mesenquimales diferenciadas a cartílago*

Las terapias actualmente utilizadas para el tratamiento de las lesiones en el tejido articular no son satisfactorias, pues que se basan en el uso de prótesis metálicas que le brindan soporte a la articulación pero que tienen un funcionamiento limitado dada la ausencia de un tejido con actividad similar a la fisiológica. Por el contrario, la ingeniería de tejidos es una herramienta que plantea una perspectiva prometedora mediante el empleo de células y materiales biocompatibles que permiten la recuperación del tejido de manera similar a las condiciones nativas.<sup>30,31</sup>

Los componentes clave para una exitosa ingeniería de tejidos en cartílago son las células y la matriz extracelular o andamio.<sup>32,33</sup> Los andamios permiten la infiltración celular, la proliferación y la subsecuente diferenciación como respuesta a diversas moléculas de señalización, por lo que son comúnmente utilizados en los implantes con el objetivo de regenerar el cartílago articular. El andamio a elección debe contar con características similares al tejido a reemplazar; como primera cuestión, es vital que la matriz a elegir sea capaz de dar soporte y de promover el crecimiento de los condrocitos que serán implantados en ella; debe evitar a toda costa reacciones de tipo inflamatorio o desencadenar una respuesta inmune, por leve que parezca. Los materiales utilizados para un andamio incluyen proteínas tales como la colágena, la queratina y el fibrinógeno; así mismo, el uso de polisacáridos como el quitosán, el hialuronato y el alginato, además de poliésteres como el polihidroxibutirato, que son utilizados solos o en combinación.

Estos materiales, una vez procesados en su forma final, deben proveer una adecuada arquitectura y tener una estructura tridimensional que forme una cadena de poros interconectada entre sí; además de que deben ser biocompatibles y biodegradables, capaces de proveer de fuerza mecánica al constructo, dar un soporte a las células, promover su adhesión y su crecimiento uniforme, y conservar el fenotipo y las características funcionales de las células trasplantadas.<sup>34</sup>

Finalmente, la función química, así como la respuesta al medio ambiente respecto al pH, al estrés y/o la temperatura son consideradas básicas. Es importante resaltar que todos los



andamios deben contar con un mecanismo de biodegradación y metabolismo que afecte en lo mínimo la supervivencia del injerto; además, deben conferirle mayor protección y resistencia al tejido sustituido.<sup>34</sup>

## **Antecedentes de la tesis**

Una alternativa para regular y reparar el cartílago articular que se daña a lo largo de la vida, es el diseño de constructos o biomateriales. Para poder llevar a cabo una aplicación a futuro se ha implementado una técnica de creación de implantes biocompatibles, fabricados con materiales ya sea metálicos, cerámicos, poliméricos o materiales compuestos, y una medicina regenerativa que fomenta la capacidad del cuerpo de curarse a sí mismo en los que se cultivan células cartilaginosas y funcionan como matrices bioabsorbibles para que puedan ser reinplantadas en una lesión de cartílago articular, mediante el empleo de implantes (constructos) en los que las células, troncales mesenquimales, constituyen el elemento fundamental.<sup>35</sup>

Se ha demostrado que la implantación de condrocitos articulares, restaura los defectos del cartílago articular en articulaciones normales. Los condrocitos construyen el marco macromolecular de la matriz extracelular a partir de tres clases distintas de macromoléculas: colágenos, proteoglicanos y proteínas no colágenas. De los colágenos presentes en el cartílago articular, los colágenos tipo II, forman una malla fibrilar que proporciona rigidez y resistencia a la tracción del cartílago.<sup>36</sup>

La diversidad molecular de proteoglicanos y colágenos proporciona una base estructural para un sinnúmero de funciones biológicas. Por ejemplo, el agregano en el cartílago genera elasticidad y una alta resistencia biomecánica a la presión.<sup>37</sup> Los proteoglicano y colágenos son factores importantes en la regulación de condrocitos, entre ellos también se encuentra el gen *SOX9* que activa la expresión de colágeno tipo II, se une al promotor *COL2A1* y activa la expresión de *COL2A1*; este evento juega un papel en la diferenciación de condrocitos y es importante para el desarrollo esquelético normal.<sup>1</sup> Además de estas proteínas, la matriz extracelular rodea a los condrocitos y los protege de las tensiones biomecánicas que surgen

durante el movimiento normal de las articulaciones, determina los tipos y concentraciones de moléculas que alcanzan las células y ayuda a mantener el fenotipo de condrocitos.

Landa y colaboradores, obtuvieron las células troncales mesenquimales (*CTMs*) por selección negativa, eliminaron células hematopoyéticas maduras y las mantuvieron separadas, la diferenciación se hizo in vitro en tejidos mesenquimatosos donde cultivaron las células en placas de seis pocillos a una densidad de placa de 1, 69103 células / cm<sup>2</sup>, se utilizó un cultivo subconfluyente al 70% de células troncales mesenquimales movilizadas de pase 2.

Para la diferenciación a cartílago, se incubaron las *CTMs* durante 15 días en medio condrogénico, que contenía: *DMEM*, medio *b-FGF* suplementado (10 ng / ml), kartogenina (10 IM) y ácido ascórbico (50 lg / ml). Los medios se cambiaron cada tres días y después se observaron para saber si eran positivos a cartílago.

Para el cultivo se diseñó un constructo de ácido poliláctico (*PLA*) elaborado en una impresora en 3D de marca REGEMAT. Las dimensiones del constructo fueron de 950µm y espesor de capa de 350µm a una velocidad de flujo I, un ángulo de 90° y una base sólida, para que las células pudieran crecer y desarrollarse dentro.

Después de que las *CTMs* se diferenciaron a cartílago y fueron cultivadas, se les realizaron pruebas de viabilidad y adhesión celular. Se implantaron de forma sub-dérmica en la cara lateral de la articulación de rodilla en 2 borregos de la raza *Suffolk*, hembras de entre 1 y 2 años de edad de aproximadamente, de 67 a 80 kg de peso, los cuales fueron transportados a las instalaciones del bioterio del INR LGII, en donde su manejo y mantenimiento se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-1999) para el uso de animales de laboratorio. El proyecto fue aprobado por el comité de investigación del INR LGII, con el número 17/13. Los constructos se mantuvieron por 3 y 6 meses, y pasado ese tiempo cada constructo fue extraído y se almacenado a -80°C.

## **Justificación**

Debido a la velocidad con la que avanza el descubrimiento de nuevas técnicas para tratamiento de las lesiones de la superficie de cartílago articular, es importante determinar en un modelo experimental en ovinos, la factibilidad de analizar la expresión de macromoléculas, como colágenos y proteoglicanos, empleando la técnica de impresión robotizada en 3D, como una base estructural para un sin número de funciones biológicas que se encargan de regular y reparar el cartílago articular. Considerando la similitud anatómica de la articulación entre humanos y ovinos, los resultados serán más fáciles de trasladar en un futuro tratamiento clínico.

## **Hipótesis**

La expresión de las proteínas *SOX9*, *COL2A1* y Agrecano es similar entre los injertos elaborados con células troncales mesenquimales en un andamio impreso en 3D en comparación con el cartílago nativo hasta 3 y 6 meses de ser implantado en un modelo ovino.

## **Objetivo general**

Analizar la expresión de las proteínas características del cartílago articular en un constructo a 3 y 6 meses en modelo experimental ovino.

### ***Objetivos particulares***

Realizar cortes histológicos de 5µm, de injertos que se mantuvieron a 3 y 6 meses, para posteriormente llevar a cabo inmunofluorescencias de cada corte y observar la expresión de Col2A1, Sox 9 y Agrecano.

Con base en lo anterior comparar la expresión de las proteínas características del cartílago entre los injertos y el cartílago nativo.

## **Materiales y métodos**

### ***Medio de encastración para cortes por ultra congelación.***

Se utilizaron los constructos previamente almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el ultra congelador obtenidos de los ovinos, los cuales se colocaron en un molde metálico antes de la congelación y se encastraron con *Tissue tek O.C.T. (Sakura Finetek USA, Inc., CA 90501 Compound, 4583)* el cual es un medio líquido a temperatura ambiente al colocar la muestra, pero es sólido al corte.

### ***Cortes de ultra congelación en criostato a $-30^{\circ}\text{C}$***

Para la realización de los cortes se tuvo un criostato (modelo *CM1520*, marca *LEICA*), a temperatura de  $-30^{\circ}\text{C}$ , en el cual se colocó el molde solido encastrado de cada muestra, lo que permitió realizar cortes de  $5\mu\text{m}$ , las secciones que se obtuvieron se adhieren por contacto a un portaobjetos con tepsa, las cuales estuvieron listas para ser procesadas.

## **Histología**

### ***Tinción con hematoxilina y eosina***

Se hidrataron la muestras y se sumergieron en baños sucesivos de xilol y etanol en concentraciones descendentes desde los 100 a 70% y para finalizar en agua, al finalizar este punto se sumergió la muestra en hematoxilina (*VECTOR HEMATOXYLIN QS- H – 3404*) durante 10 minutos, se realizaron algunos lavados con agua y alcohol para eliminar el exceso de hematoxilina y se tiñó durante 30 segundos en eosina pasados estos 30 segundos, se realizaron baños en alcoholes de concentraciones crecientes (100 a 70%), para deshidratar la muestra de nuevo y permitir que se fijará previamente para la observación de la muestra en el microscopio.

*Vector Laboratories INC. Burlingame, C.A. 94010, HEMATOXYLIN QS 100ml, H – 3404. Lot #X0916.*

### ***Tinción azul alciano***

Se lavó con PBS la muestra, se retiró el PBS, posteriormente se agregó ácido acético al 3X durante 3 min, pasados esos minutos se agregó con un filtro 1 ml de azul alciano (*A5268 SIGMA- Alcian Blue 8GX*) por muestra y se dejó por 20 min, al pasar los 20 min se lavó con agua de la llave y se dejaron por 10 min, al pasar los 10 min se volvió a lavar con agua destilada y se dejó por 10 min, se retiró y con agua destilada se lavó por 2 min. Posteriormente se le agregaron hematoxilina (*VECTOR Hematoxylin- H – 3404*) por 50 segundos, se lavó con agua destilada y al finalizar se observó al microscopio (Marca *ZEISS, AXIO Imager. A1, Software Axio Vs 40X64 V 4.9.0.0*) para tomar fotografías.

### **Inmunofluorescencias**

Para la realización de las inmunofluorescencias se utilizaron los siguientes anticuerpos

| Anticuerpos primarios  | Anticuerpos secundarios  |
|--|--|
| AGRECANO NB100-7435F, PAB Anti <i>Agrecan Neopitope (F/TC)</i> | Incluido en el AGRECANO NB100-7435F, PAB Anti <i>Agrecan Neopitope (F/TC)</i>                  |
| SOX 9 (P-20) SC-17340 – Lot# K0411, <i>Goat polyclonal IgG</i> | <i>Anti IgG Hecho goat FITC SC - 2356</i>  |
| COL2 (C-19), SC- 7763 Lot#F2912 <i>goat polyclonal IgG</i>     | <i>Anti IgG Hecho goat FITC SC - 2356</i>  |
| Para observar núcleos se utilizo                               | <i>Hoechst 33258 solution 1mg/ml in H2O, 98% (HPLC) LOT# BCBS5389V, 94403-1ML marca SIGMA.</i> |

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados**

En la tabla número 1 se muestra el orden de los anticuerpos primario y secundario de acuerdo a como se fue utilizando para la realización de las inmunofluorescencias.

Se colocaron las muestras en la cámara húmeda para realizar las inmunofluorescencias primero utilizó *Perm wash* para la fijación y permeabilización de las células (KIT- BD Cytotfix/Cytoperm- 554722) al 1X, se hicieron tres lavados por 2 min para cada muestra, posteriormente se agregó la solución Cytitofix/cytoperm al 10X hasta cubrir por 2 hrs, pasadas las 2 hrs se colocaron 5 µl de los anticuerpos primarios en el botón hasta cubrir, se taparon y se dejaron a 4°C para que no se desnaturalizaran las proteínas presentes en las muestras toda la noche.

Pasadas 24hrs se limpiaron con *Perm wash*, se colocaron los anticuerpos secundarios y se dejaron 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*) dilución en agua destilada al 1X por 10 min, se volvió a lavar con *Perm wash* se retiró y posteriormente se volvió a agregar *Perm wash* (este no se retiró) y se observó al microscopio (se observaron en el cuarto oscuro para no perder la luminiscencia)).

## **Captura y análisis de las imágenes**

### ***Microscopio Axio***

Para la captura se utilizó el microscopio de la marca *ZEISS, AXIO Imager. AI*, se encendió el microscopio en el botón lateral izquierdo, para utilizar la fluorescencia se encendió la lámpara de mercurio 15 min antes de observar las muestras, pasados los 15 minutos se montaron las muestras, primero se presionó el botón TL y se reguló la luminosidad, para poder observar el contraste de fases o la epi – fluorescencia, se colocó la rueda de filtros en posición 1 y el condensador ya sea en posición 2 para fluorescencia azul o 3 para verde.

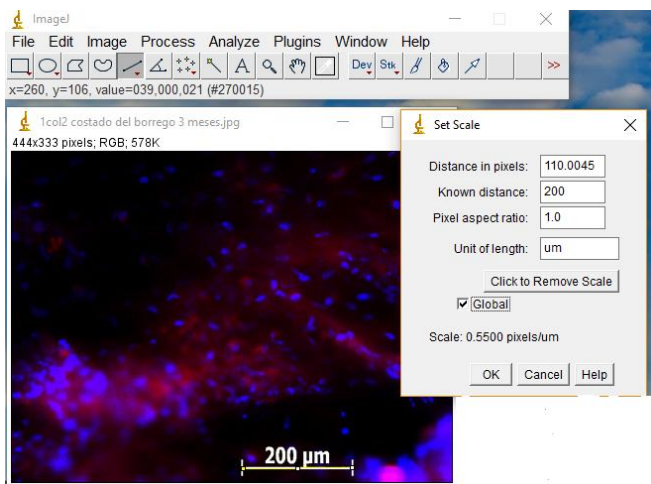
Para la toma de fotografías se utilizó el programa *Axio Vision AC* (rel con versión de Software *Axio Vs 40X64 V.*).

## Análisis de las imágenes

### *Capturas de pantalla desde la apertura del software*

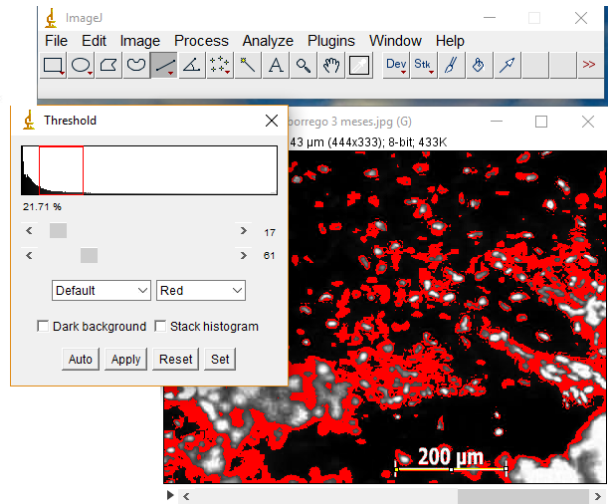
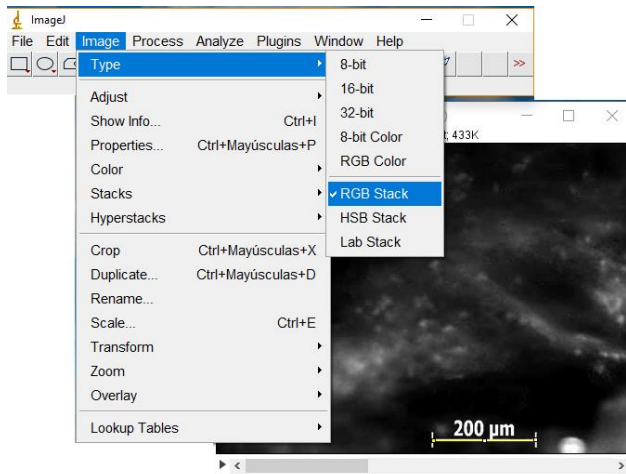
Para el análisis de las imágenes se utilizó el programa *Image J* con el cual se cuantificaron los núcleos y marca por separado, posteriormente se hizo la combinación de ambas cuantificaciones para tener un dato más exactos.

Se abrió la barra de tareas, se presionó el botón *straight*, se seleccionó la escala de la fotografía tomada y se abrió la ventana *set scale* del menú *analyze* para tener la muestra y cambiarlo de pixeles a micras.



Posteriormente se cuantificaron los pixeles activando la opción *RGB stack* del submenú *type* del menú *imagen* los cuales se dividieron en 3 colores azul, rojo y verde, primero se tomó el porcentaje total y luego se obtuvo solo la marca positiva de los núcleos para cada color y se seleccionó el total y así para la marca.

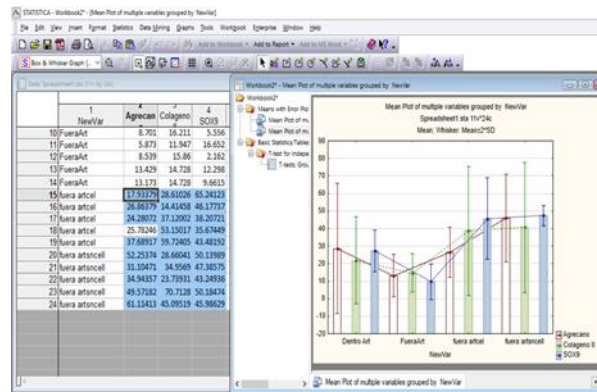
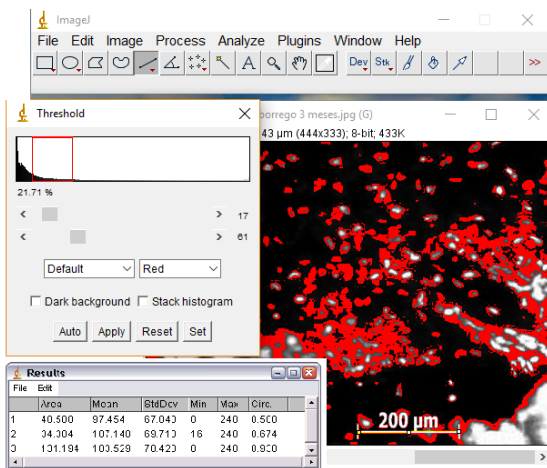




En seguida se realizó el análisis con el programa, el cual arroja una tabla que muestra el % total, *área*, *sd*, *circ*, *valores min y max*. Posteriormente, se obtuvo la marca total de fluorescencia en porcentaje con la formula

$$\text{marca total de fluorescencia} = \frac{(\text{total de núcleos})}{\text{marca sin núcleos}} 100\%,$$

después de sacar el porcentaje total para cada muestra, se pasaron los datos al programa *STATISTICA* y se hizo el análisis estadístico solo tomando el porcentaje del área analizada.



## **Presentación de los datos**

Los datos se ordenaron por medio de tablas que contienen la siguiente información: tiempo, tipo de implantes, técnica, imagen y descripción.

### ***Análisis estadístico***

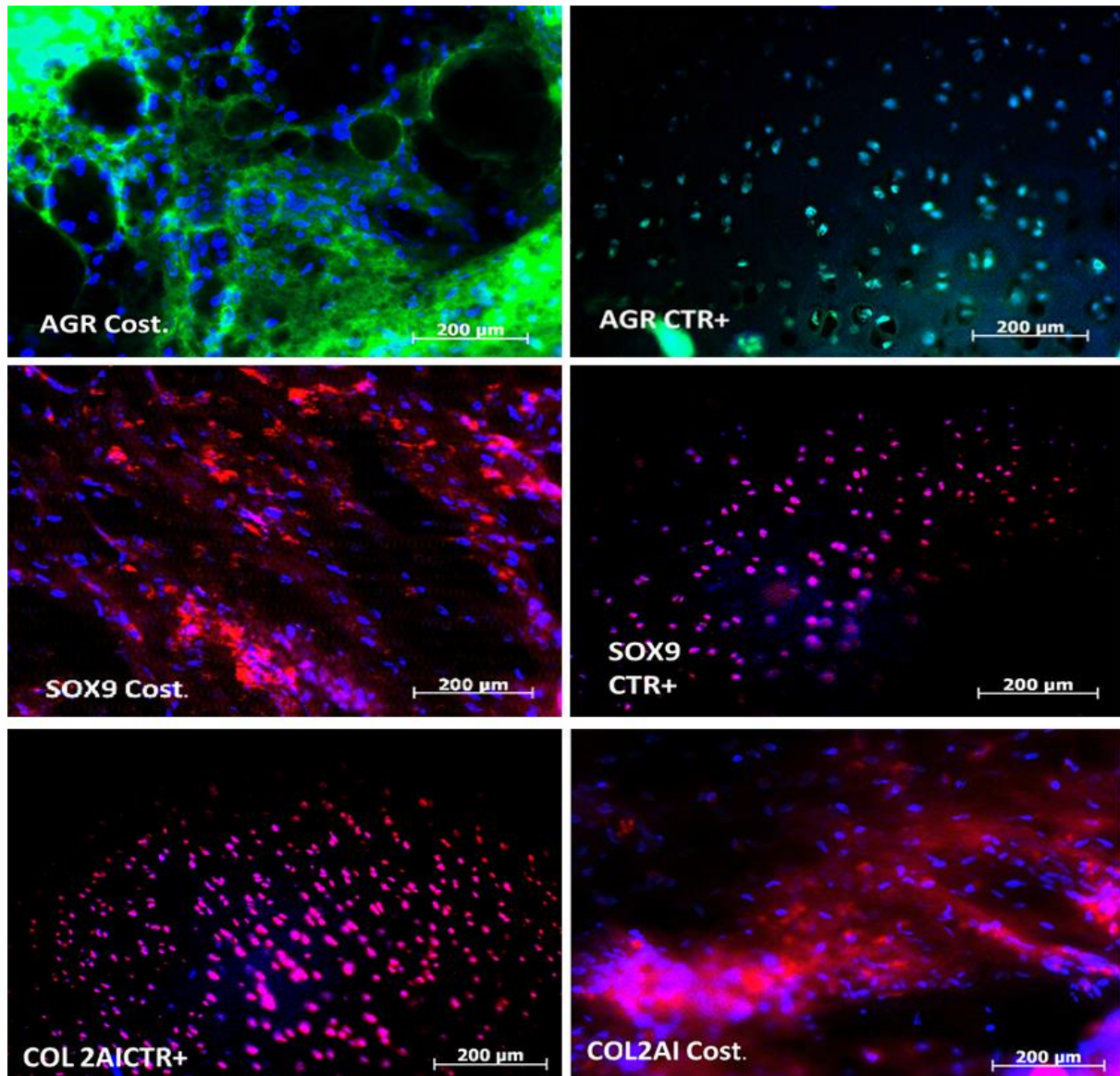
Se hizo la prueba de *Kolmogorov-Smirnov* con lo que se estableció que las poblaciones se comportaban de manera normal, y así decidimos utilizar la prueba de T para dos muestras independientes donde se hizo una comparación pareada.

Los datos de este estudio fueron almacenados en base de datos de Excel (Microsoft Office para PC), y procesados con el programa *STATISTICA.ver10*.

El Análisis se realizó de acuerdo al objetivo general, se utilizó la prueba estadística T para grupos independientes, teniendo, como factor los constructos de cartílago y las variables (Fenotipo y expresión).

## RESULTADOS

En los resultados se presentan por tablas cada una de las inmunofluorescencias realizadas y su control positivo, además de que también se presenta su análisis estadístico posterior a las tablas en cada uno se muestra la prueba realizada y la expresión para cada uno utilizando una  $p < 0.05$  para cada uno de los injertos. A continuación, se presenta la tabla de inmunofluorescencias realizadas a los injertos.

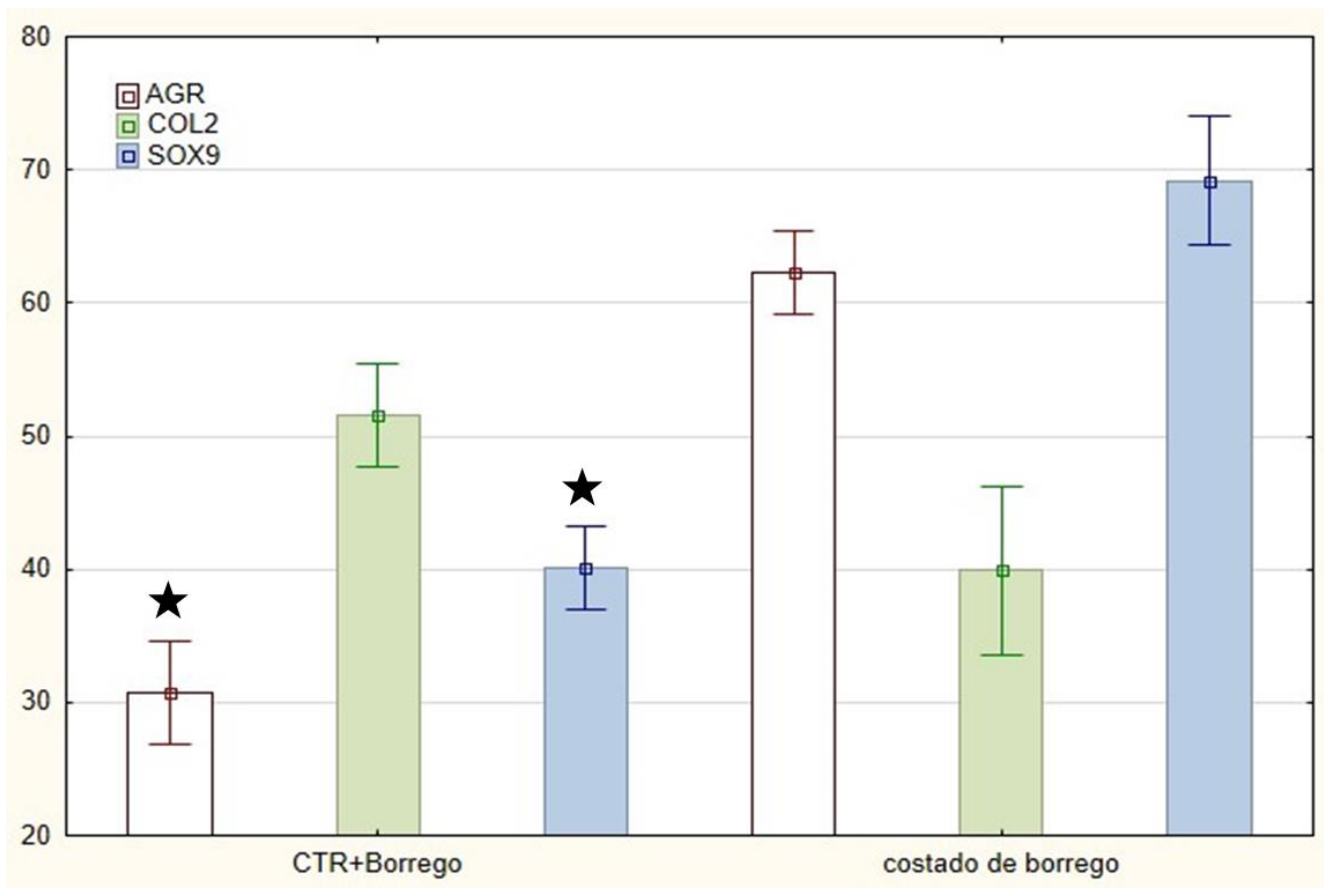


**Fig.1** Tabla de inmunofluorescencias costados de Borrego a 3 meses.

Se observa distribuido en columnas el injerto implantado a tres meses en el costado del borrego y la respuesta a los anticuerpos COL2A, Agrecano y SOX9, así como la comparación con el control positivo el cual fue un fragmento de cartílago de un ovino marcado con los mismos anticuerpos (COL2A, Agrecano y SOX9).

## Análisis de la expresión de fluorescencia

Para el injerto a 3 meses costado de borrego en el análisis estadístico



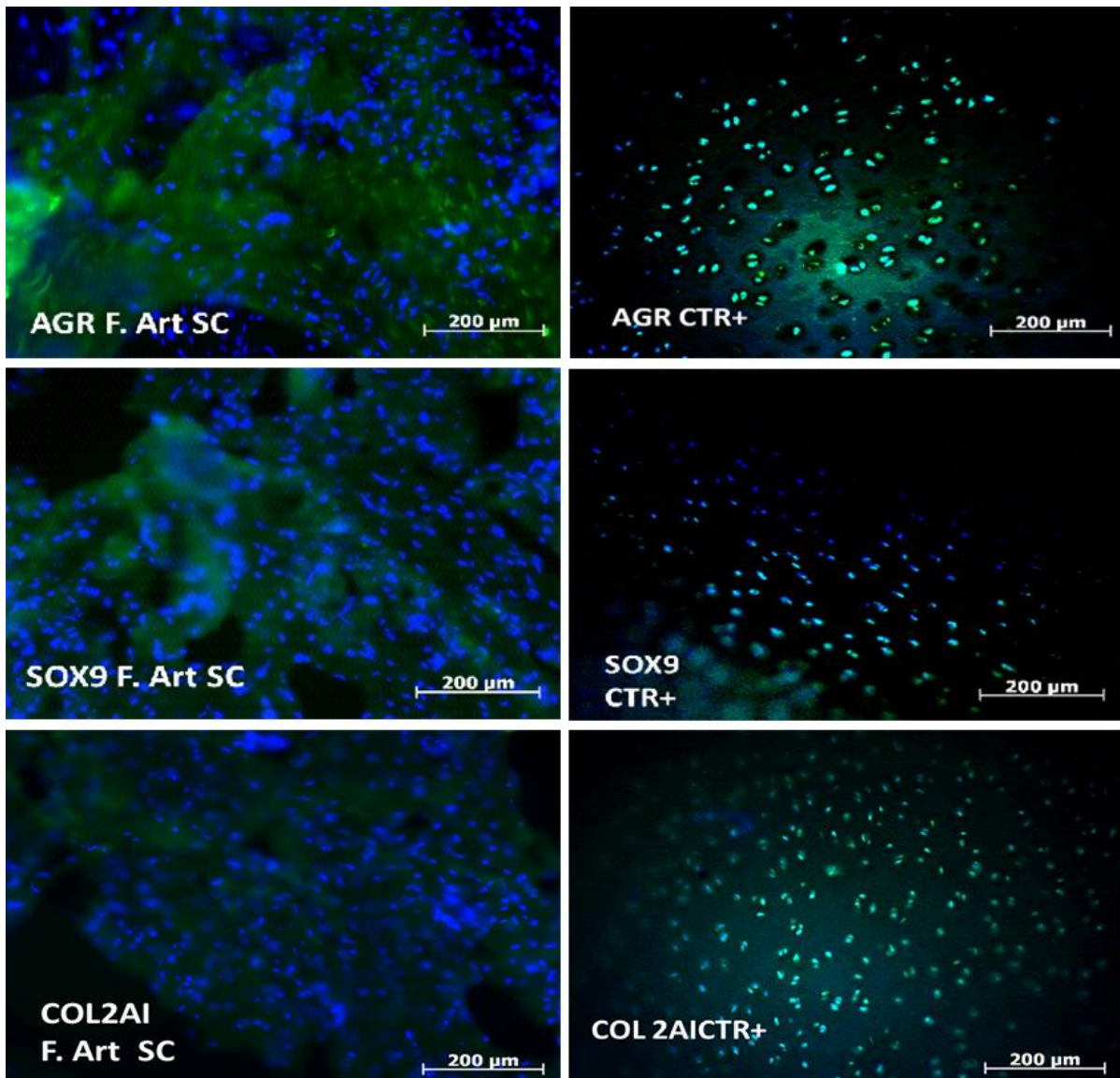
**Fig. 2 Análisis estadístico del costado del borrego.**

En la figura se observa que al realizar el análisis estadístico hay una diferencia significativa marcada con una estrella color negro, en la expresión del Agrecano y el SOX9 con respecto al control positivo. El aumento de Agrecano ( $p=0.0018$ ) fue de 2.03 % más comparado con el del control positivo y para el SOX9 ( $p=0.0032$ ) aumentó 1.72% más que lo expresado en el control positivo, para el análisis de COL2A1( $p=0.15$ ) 0.77 % no se muestra una diferencia estadísticamente significativa.

★ Diferencia estadísticamente significativa,  $P < 0.05$ , prueba T para muestras independientes.



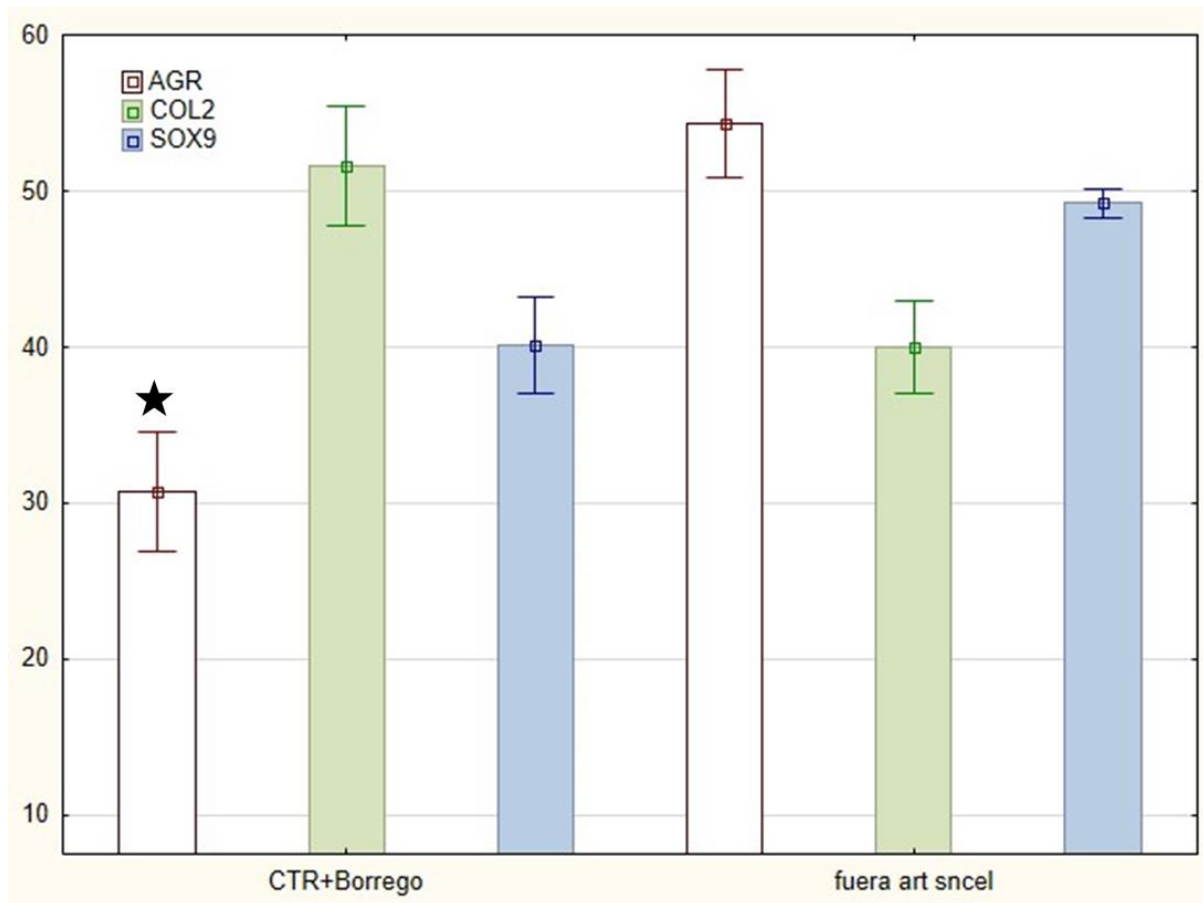
Imágenes de las inmunofluorescencias, mostrando los marcadores (COL2AI, AGR, SOX9) utilizados en el injerto extra articular sin células condrales a 6 meses.



**Fig. 3** Tabla de inmunofluorescencias del injerto extra articular sin células condrales a 6 meses.

En la figura 3 se observa distribuido en columnas el implante de seis meses en el injerto extra articular del borrego, además de la respuesta a los anticuerpos COL2A, Agrecano y SOX9, así como la comparación del control positivo utilizando los mismos anticuerpos (COL2A, Agrecano y SOX9) todos los injertos son sin células condrales.

## Análisis estadístico de la expresión de fluorescencia para el injerto extra articular sin células condrales a 6 meses fuera de la articulación.

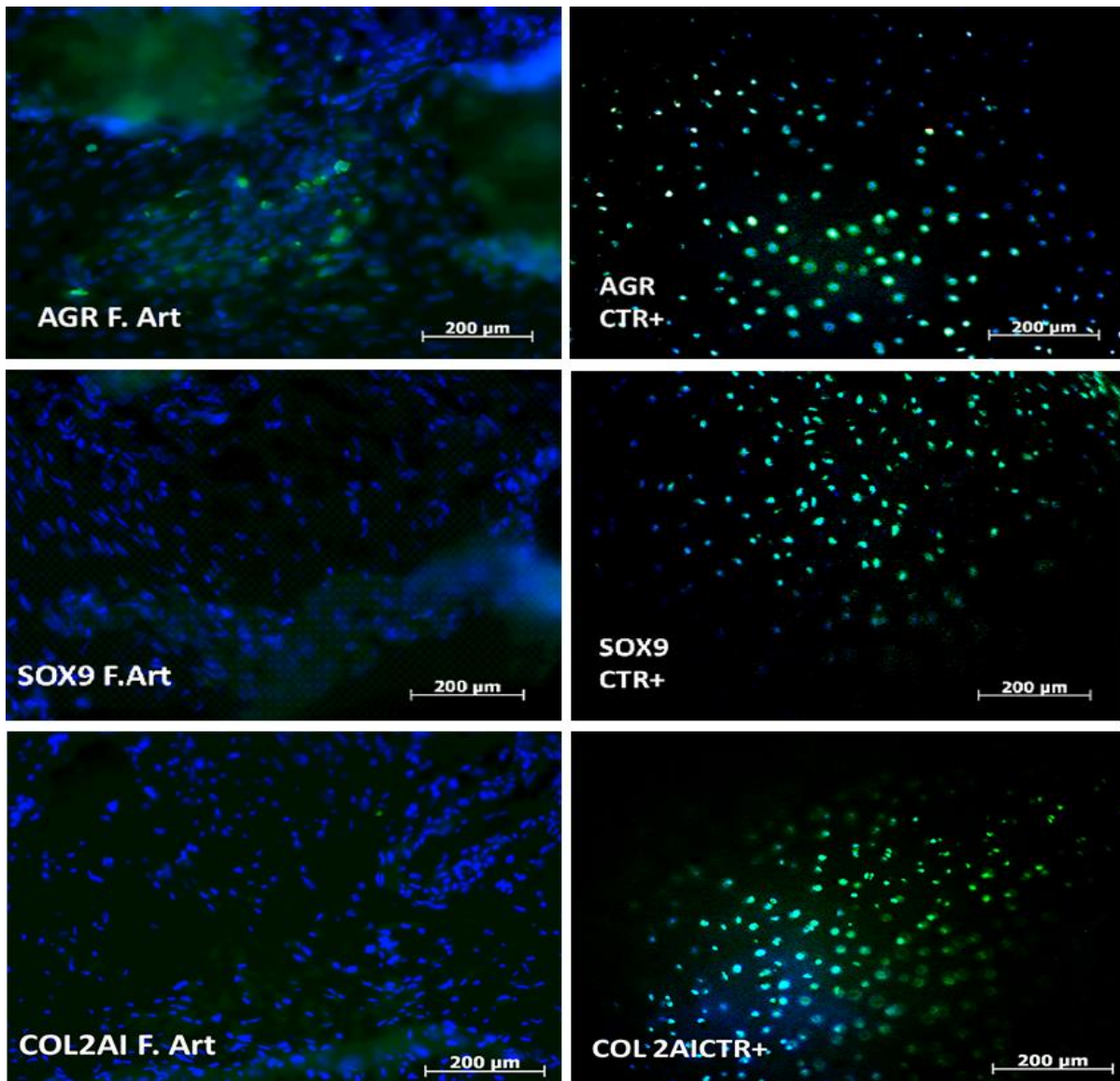


**Fig.4 Análisis estadístico del injerto sin células condrales a 6 meses fuera de la articulación.**

El control positivo vs injerto fuera de la articulación sin células condrales en esta gráfica, se observa que solamente el Agrecano tiene una diferencia significativa ( $p=0.0072$ ), se observa que tiene 1.76% más con respecto al control positivo, aunque el SOX9 ( $p=0.076$ ) tiene un aumento del 1.22% sin embargo también se ve expresado, aunque no significativamente con respecto a su control positivo, al igual que la COL2A1( $p=0.060$ ) la cual tiene una expresión del 0.77% con respecto al control positivo de borrego.

★ Diferencia estadísticamente significativa,  $P < 0.05$ , prueba T para muestras independientes.

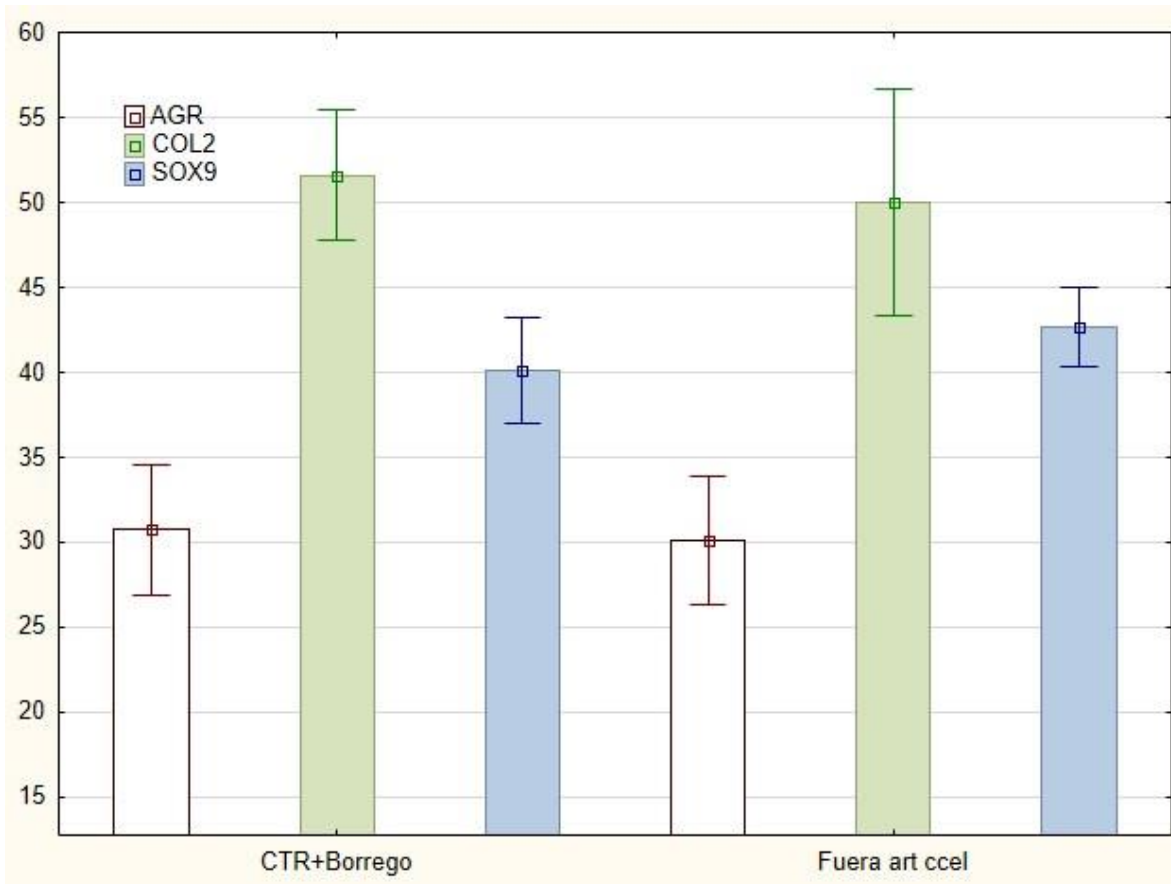
Imágenes de las inmunofluorescencias, mostrando los marcadores (COL2AI, AGR, SOX9) utilizados en el injerto extra articular con células condrales a 6 meses.



**Fig. 5** Tabla de inmunofluorescencias del injerto extra articular con células condrales a 6 meses.

En la figura 5 se observa distribuido en columnas el implante de seis meses en el injerto extra articular del borrego además de la respuesta a los anticuerpos COL2A, Agrecano y SOX9, así como la comparación del control positivo de borrego utilizando los mismos anticuerpos (COL2A, Agrecano y SOX9) todos los injertos son con células condrales.

## Análisis estadístico de la expresión de fluorescencia para el injerto extra articular con células condrales a 6 meses fuera de la articulación.



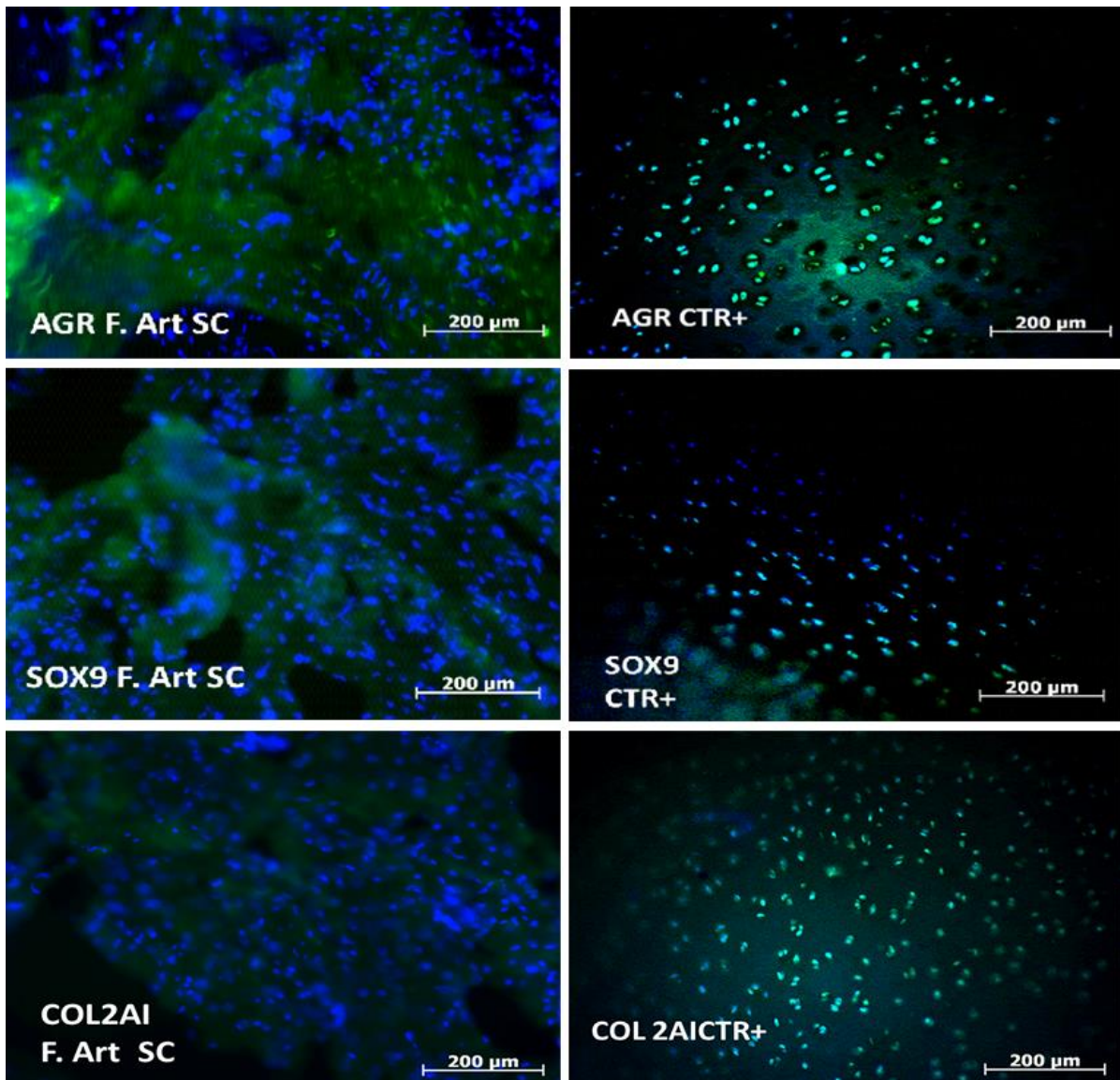
**Fig. 6 Injerto extra articular con células condrales a 6 meses fuera de la articulación**

En la figura 6 se observa que al realizar el análisis estadístico no se muestra una diferencia estadísticamente significativa para ninguno de los anticuerpos utilizados en los injertos, sin embargo, no quiere decir que no haya expresión en el injerto solo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el análisis que se está realizando. En el injerto de Agrecano ( $p=0.91$ ) hay un 0.97% de expresión con respecto al control positivo, COL2A1 ( $p=0.83$ ) hay una expresión del 0.96% y para el SOX9 ( $p=0.15$ ) hay 1.06 % con respecto al control positivo de borrego.

★Diferencia estadísticamente significativa,  $P < 0.05$ , prueba T para muestras independientes.



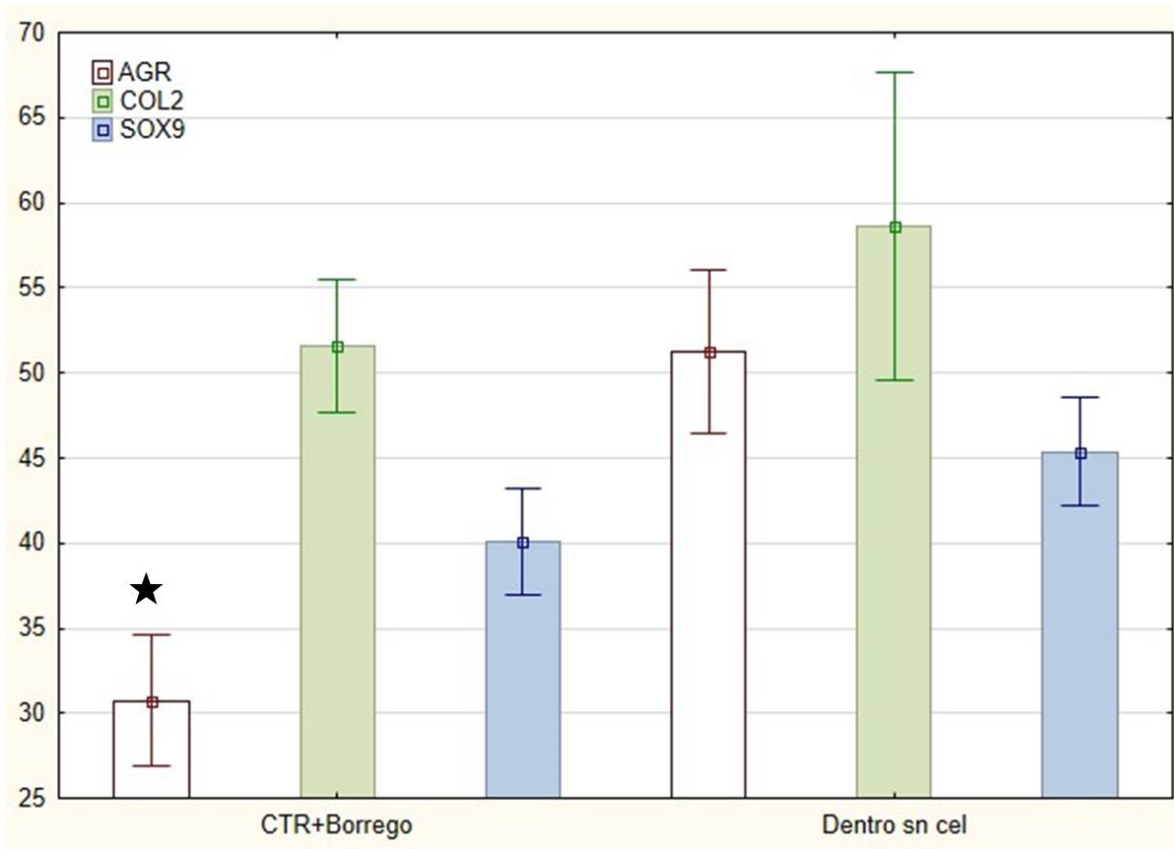
Imágenes de las inmunofluorescencias, mostrando los marcadores (COL2AI, AGR, SOX9) utilizados en el injerto intra articular sin células condrales a 6 meses.



**Fig. 7** Tabla de inmunofluorescencias del injerto intra articular sin células condrales a 6 meses.

En la figura 7 se observa distribuido en dos columnas el implante de seis meses en el injerto intra articular del borrego además de la respuesta a los anticuerpos COL2A, Agrecano y SOX9, así como la comparación del control positivo de borrego utilizando los mismos anticuerpos (COL2A, Agrecano y SOX9) todos los injertos son sin células condrales.

## Análisis estadístico de la expresión de fluorescencia para el injerto intra articular sin células condrales a 6 meses.

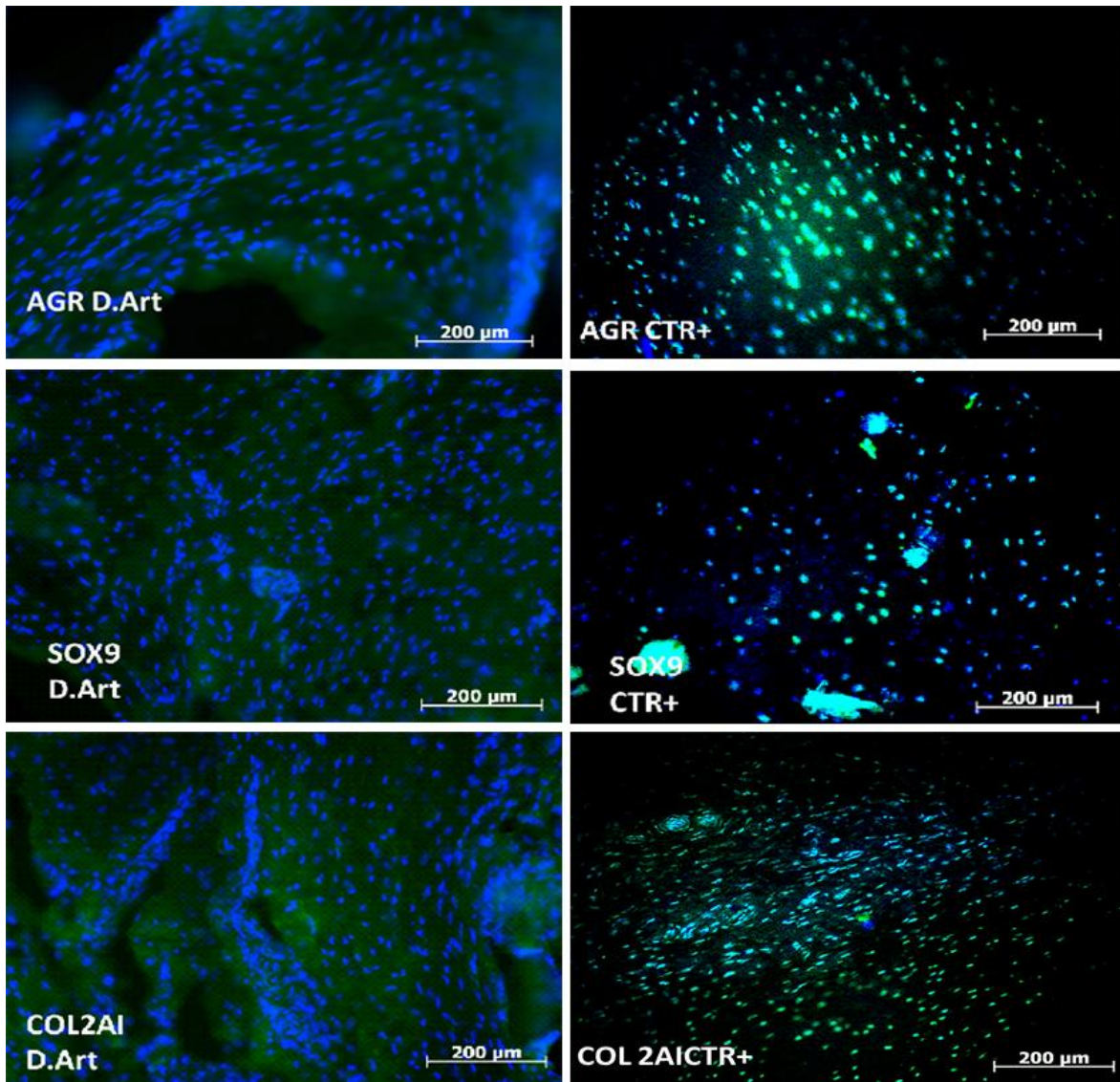


**Fig. 8 Injerto intra articular sin células condrales a 6 meses dentro de la articulación**

En esta gráfica podemos observar un aumento estadísticamente significativo en la expresión del implante dentro de la articulación sin células de Agrecano ( $p=0.0029$ ) de 1.66% más con respecto al control positivo, aunque al realizar la prueba estadística T no se observa una diferencia significativa en el injerto de COL2A1 ( $p=0.39$ ) hay una expresión del 1.13% y para SOX9 ( $p=0.17$ ) es de 1.13% los cuales no son significativos, pero si tienen una expresión con respecto al control positivo de borrego.

★Diferencia estadísticamente significativa,  $P < 0.05$ , prueba T para muestras independientes.

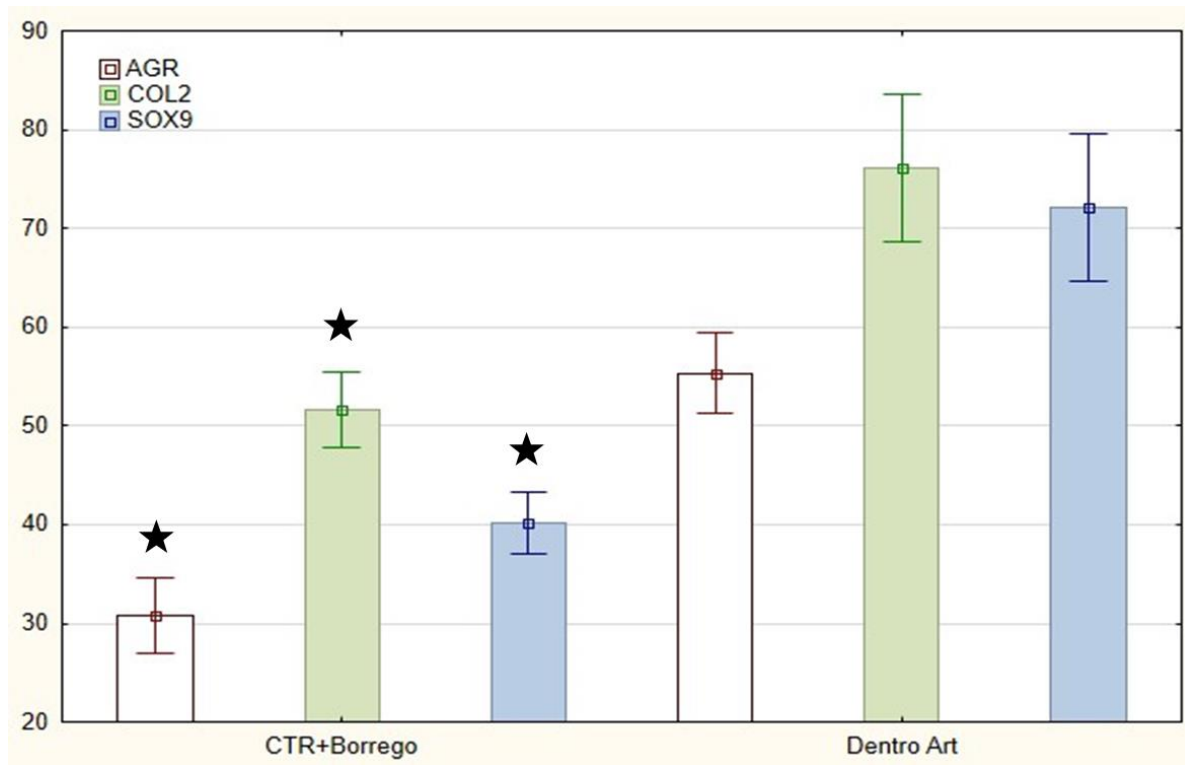
Imágenes de las inmunofluorescencias, mostrando los marcadores (COL2AI, AGR, SOX9) utilizados en el injerto intra articular con células condrales a 6 meses.



**Fig. 9** Tabla de inmunofluorescencias del injerto intra articular con células condrales a 6 meses.

En la figura 9 se observa distribuido en dos columnas el implante de seis meses en el injerto intra articular del borrego además de la respuesta a los anticuerpos COL2A, Agrecano y SOX9, así como la comparación del control positivo de borrego utilizando los mismos anticuerpos (COL2A, Agrecano y SOX9) todos los injertos son con células condrales.

## Análisis estadístico de la expresión de fluorescencia para el injerto intra articular con células condrales a 6 meses.



**Fig. 10 Injerto intra articular con células condrales a 6 meses dentro de la articulación**

En la gráfica podemos observar un aumento en la expresión del injerto dentro de la articulación con respecto a el control positivo, se observa una diferencia estadísticamente significativa al realizar la prueba T para todos los injertos en Agrecano (0.0075) la expresión es del 1.80 % más con respecto al control para COL2A1(0.024) el aumento es de 1.47 % mas también la expresión en SOX9 (0.0067) es de 1.79 % más con respecto al control positivo de borrego.

★Diferencia estadísticamente significativa,  $P < 0.05$ , prueba T para muestras independientes.

## Discusión

En el presente estudio se analizó la expresión de las proteínas características del cartílago articular, en un constructo a 3 y 6 meses en un modelo experimental ovino.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la expresión de los marcadores para cartílago de las células que se implantaron en el injerto es similar, debido a que el microambiente que rodeó al injerto favoreció que la expresión se mantuviera hasta por 6 meses. Cuando se realizaron las inmunofluorescencias el anticuerpo utilizado en cada injerto mas su control, mostró que las proteínas analizadas para cada grupo tenían un porcentaje alto de especificidad (anexo1) de la secuencia entre humanos y ovinos.

Weimin, Zheng <sup>38</sup> y colaboradores, en un estudio mostraron que las células troncales mesenquimales facilitan la diferenciación condrogénica cuando las células son estimuladas in-vivo, es decir que pueden promover la regeneración mediante los siguientes mecanismos:

1. Las *CTM* pueden diferenciarse directamente en células nativas.
2. Las células pueden ejercer efectos paracrinicos a través de la secreción de factores de crecimiento u hormonas, rescatando el tejido lesionado.
3. Las células pueden transferir mitocondrias a través de nanotubos de túnel y secretar exosomas o microvesículas específicos que influyen en las células circundantes.

Nuestros resultados se pueden igualar a lo encontrado por estos autores, como se observa en las figuras 6 y 10, se ve como el mecanismo de regeneración es potencial en el andamio cargado con *CTM*, y estas a su vez pueden diferenciarse directamente si el microambiente es adecuado; De acuerdo a los puntos planteados en la figura 6, (injerto con células troncales en la región extra articular) al analizar la gráfica no se observa ninguna diferencia significativa entre el injerto y el control positivo, como lo menciona el punto numero dos: “Las células pueden ejercer efectos paracrinicos a través de la secreción de factores de crecimiento u hormonas, rescatando el tejido lesionado”, esto apoya a nuestro resultado ya que el injerto se encontraba fuera de la articulación al lesionar este lugar, las células que se encontraban

alrededor de la lesión posiblemente migraron y se distribuyeron, lo cual propició que el injerto pudiera diferenciarse directamente a un tejido similar al del cartílago nativo.

Por otra parte, en la figura 10, (injerto intra articular con células troncales dentro de la articulación) podemos observar este mismo comportamiento debido a que el injerto se encontraba dentro de la articulación, es decir en el micro ambiente adecuado en comparación a la figura 6 (injerto con células troncales en la región extra articular) donde este se encontraba fuera de la articulación, al observar la gráfica podemos ver que hay una diferencia significativa pero a favor del injerto intra articular con células troncales en el cual se ve que para cada injerto con su respectivo marcador aumenta una vez más, lo cual favorece a que nuestro resultado se pueda trasladar al punto tres que menciona: “las células pueden transferir y secretar exosomas específicos los cuales influyen en las células circundantes” y el punto número uno “las células pueden diferenciarse directamente a células nativas si son estimuladas” en este caso con *CTM* tienen buena afinidad y están estructuralmente alineadas por lo que favorecen el rescate del tejido lesionado.

Diversos autores han reportado que, la variación topológica en la apariencia histomorfológica del cartílago articular está influenciada por la carga mecánica local de los condrocitos en las diferentes zonas. Los patrones de estrés, tensión y flujo de fluido creados en la articulación dan como resultado cambios espaciales y temporales en las tasas de síntesis y degradación de las proteínas de la matriz<sup>39</sup>; también reportaron que los períodos de carga cíclica rara vez duran más de 1 hr y que estos se intercalan con períodos de recuperación parcial y de plena recuperación total de al menos 16 hrs. por día.

Teniendo en cuenta la información anterior podemos especular que las células condrales mantienen y remodelan la matriz del tejido cartilaginoso en equilibrio, por procesos que involucran la expresión de genes como el *SOX9* el *Cfbal/Runx2*, donde su objetivo principal son las metaloproteinasas de la matriz (*MMPs*) y las metaloproteinasas inhibitoras de tejido (*TIMPs*),<sup>40</sup> por esta razón la presencia del gen *SOX9* es importante porque nos permiten evaluar la respuesta del cartílago articular con respecto a las cargas, como ya se mencionó se sabe que la expresión del *SOX9* favorece la protección del cartílago y su relación para mantener el equilibrio condrogénesis/osteogénesis.<sup>41</sup>



Puede decirse que los condrocitos tienen una forma característica de comportarse, ellos secretan una matriz rica en colágeno de tipo II y de proteoglicanos agrecanos en general, expresan una característica genética programada impulsada por el SOX9, los niveles de proteína SOX9 han de ser estrictamente controlados para que la condrogénesis normal ocurra.<sup>42</sup> Sabiendo esto se dice que el SOX9 regula la expresión del colágeno tipo II, IX, XI, y Agrecano, estas proteínas al ser reguladas por este gen se pueden comportar de cierta manera, en nuestro proyecto creemos que se está dando una regeneración de cartílago parcial inducida por el SOX9, como se observa en las figuras 2 (injerto costado de borrego) y 10 (injerto intra articular con células troncales) la expresión del gen.

En la figura 2 se encuentra expresado el SOX9 y Agrecano dos veces más con respecto al control positivo, esta expresión puede deberse a que las zonas de carga articular se estimularon, dando como resultado la regulación del SOX9 y la formación de proteínas (Agrecano) creando a su vez la expresión del fenotipo de cartílago y su crecimiento.

En las figuras 4 (injerto extra articular sin células troncales) y 8 (injerto intra articular sin células troncales) se observa una expresión mayor del Agrecano con respecto al control positivo, se sabe que el cartílago articular se encuentra expuesto a una combinación de cargas de compresión (Mpa), estas fuerzas en un cartílago natural incrementan la expresión de factores catabólicos como los MMPs y las interleucinas disminuyendo la de los agrecanos,<sup>43,44</sup> lo que permite que las lesiones mecánicas se consideren un importante inductor de la destrucción del cartílago articular, sin embargo en nuestro resultado observamos que la expresión de Agrecano es significativa y aumenta dos veces más con respecto al control, lo cual nos permite dar una respuesta favorable ya que posiblemente está respondiendo a una regulación de señales que resultan de fuerzas mecánicas, que a su vez están activando la vía de señalización del condrocito en la superficie articular y manteniendo el cartílago funcional.

En la figura 10 se observa el mismo comportamiento, sin embargo en esta gráfica se están expresando los tres marcadores una vez más con respecto al control positivo (SOX9, COL2A1 y Agrecano), se cree que la regeneración puede ser posible, ya que si uno o dos de estos marcadores se encuentran presentes en el injerto se lleva a cabo la activación de la vía de

señalización en los condrocitos articulares, al expresarse estos factores se está dando la regulación en el desarrollo del cartílago.

## **Conclusión**

Con base al proceso experimental realizado, se puede concluir que se identificó que los injertos pueden tener expresiones similares al cartílago nativo, debido a que el microambiente donde se implantaron favorece la diferenciación y la expresión de las proteínas características de cartílago articular en los injertos analizados, por lo que se puede decir que los injertos podrían mejorar la estructura del cartílago y esto por su parte puede ser prometedor en un tiempo, para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas de las lesiones focales del cartílago articular.

## **Perspectivas**

El proyecto realizado tiene un campo de posibilidades para continuar investigando amplias técnicas de reparación de cartílago articular, y proponer en base a los resultados obtenidos a no solo probar con células troncales mesenquimales si no poder ver con factores de crecimiento el comportamiento de células hipertróficas y su reacción a la regeneración de cartílago articular.



## Bibliografia

1. MDZ-Reader | Band | Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen / Schwann, Theodor | Mikroskopische Untersuchungen über die Uebereinstimmung in der Struktur und dem Wachsthum der Thiere und Pflanzen / Schwann, Theodor. [https://reader.digitale-sammlungen.de/de/fs3/object/display/bsb10076503\\_00001.html](https://reader.digitale-sammlungen.de/de/fs3/object/display/bsb10076503_00001.html).
2. Wayne\_N.\_Becker\_\_Lewis\_J.\_Kleinsmith\_\_Jeff\_Hardin-El\_Mundo\_de\_la\_Célula\_\_ - Pearson\_Education\_(2006).PDF - OneDrive. <https://onedrive.live.com/?authkey=%21ANsxacuYho1pdkc&cid=E46A994CA778FB81&id=E46A994CA778FB81%21139&parId=E46A994CA778FB81%21122&o=OneUp>.
3. Rosen, S. M. *Science, Paradox, and the Moebius Principle: The Evolution of a 'Transcultural' Approach to Wholeness*. (SUNY Press, 1994).
4. Robert JS. Model systems in stem cell biology. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. (2004).
5. Sabapathy V, Kumar S. hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. *Journal of cellular and molecular medicine*. (2016).
6. Zhang G, Shang B, Yang P, Cao Z, Pan Y, Zhou Q. Induced pluripotent stem cell consensus genes: implication for the risk of tumorigenesis and cancers in induced pluripotent stem cell therapy. *Stem cells and development*. (2012).
7. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*. (1970).

8. Luria EA, Owen ME, Friedenstein AJ, Morris JF, Kuznetsow SA. Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell and tissue research*. 1987.
9. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. (1991).
10. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics*. (1987).
11. Pittenger GL, Malik RA, Burcus N, Boulton AJ, Vinik AI. Specific fiber deficits in sensorimotor diabetic polyneuropathy correspond to cytotoxicity against neuroblastoma cells of sera from patients with diabetes. *Diabetes care*. (1999).
12. Irfan-Maqsood M, Matin MM, Heirani-Tabasi A, Bahrami M, Naderi-Meshkin H, Mirahmadi M, et al. Adipose derived mesenchymal stem cells express keratinocyte lineage markers in a co-culture model. *Cellular and molecular biology*. (2016).
13. Fu WL, Zhou CY, Yu JK. A new source of mesenchymal stem cells for articular cartilage repair: MSCs derived from mobilized peripheral blood share similar biological characteristics in vitro and chondrogenesis in vivo as MSCs from bone marrow in a rabbit model. *Am J Sports Med*. (2014).
14. 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. *Human reproduction*. (2004).
15. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. (2003).

16. Bi Y, Ehrichou 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. *Nature medicine*. (2007).
17. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*. (2004).
18. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism*. (2001).
19. 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).
20. Karimineko S, Movassaghpour A, Rahimzadeh A, Talebi M, Shamsasenjan K, Akbarzadeh A. Implications of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. **44(3)**, 749–57 (2016).
21. 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*. 2739–49. (2007).
22. 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. *Experimental hematology*. 42–8 (2002).
23. Lee HL, Yu B, Deng P, Wang CY, Hong C. Transforming Growth Factor-beta-Induced KDM4B Promotes Chondrogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 711–9. (2016).
24. Diederichs S, Gabler J, Autenrieth J, Kynast KL, Merle C, Walles H, et al. Differential Regulation of SOX9 Protein During Chondrogenesis of Induced Pluripotent

- Stem Cells Versus Mesenchymal Stromal Cells: A Shortcoming for Cartilage Formation. *Stem cells and development*. 598–609 (2016).
25. Furumatsu T, Tsuda M, Taniguchi N, Tajima Y, Asahara H. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *The Journal of biological chemistry*. 8343–50 (2005).
  26. Li J, Zhao Z, Liu J, Huang N, Long D, Wang J, et al. MEK/ERK and p38 MAPK regulate chondrogenesis of rat bone marrow mesenchymal stem cells through delicate interaction with TGF-beta1/Smads pathway. *Cell proliferation*. **43(4)**, 333–43. (2010).
  27. Juhasz T, Matta C, Somogyi C, Katona E, Takacs R, Soha RF, et al. Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cellular signalling*. 468–82. (2014).
  28. Goodrich LR, Nixon AJ. Medical treatment of osteoarthritis in the horse - a review. *Veterinary journal*. 51–69 (2006).
  29. Aigner, T., y J. Stöve. “Collagens--Major Component of the Physiological Cartilage Matrix, Major Target of Cartilage Degeneration, Major Tool in Cartilage Repair”. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 55 (12): 1569–93. (2003).
  30. Park, H., Temenoff, J. S., Holland, T. A., Tabata, Y. & Mikos, A. G. Delivery of TGF-beta1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications. *Biomaterials* **26**, 7095–7103 (2005).
  31. Müller, F. A. *et al.* Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **27**, 3955–3963 (2006).
  32. Daley, E. L., Coleman, R. M. & Stegemann, J. P. Biomimetic microbeads containing a chondroitin sulfate/chitosan polyelectrolyte complex for cell-based cartilage therapy. *J. Mater. Chem. B Mater. Biol. Med.* **3**, 7920 (2015).

33. Potential use of chitosan as a cell scaffold material for cartilage tissue engineering. - PubMed - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12542946>.
34. Ingeniería del tejido del cartílago: el papel de la matriz extracelular (ECM) y nuevas estrategias | IntechOpen. <https://www.intechopen.com/books/regenerative-medicine-and-tissue-engineering/cartilage-tissue-engineering-the-role-of-extracellular-matrix-ecm-and-novel-strategies>.
35. BECERRA RATIA, JOSE. Constructo útil para terapia de regeneración de tejidos, procedimiento de obtención y aplicaciones. (2007).
36. Aggarwal, B. B., Krishnan, S. & Guha, S. *Inflammation, Lifestyle and Chronic Diseases: The Silent Link*. (CRC Press, 2016).
37. Yue, B. Biology of the Extracellular Matrix: An Overview. *J. Glaucoma* S20–S23 (2014) doi:10.1097/IJG.0000000000000108.
38. Guo, W. *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Oriented PLGA/ACECM Composite Scaffolds Enhance Structure-Specific Regeneration of Hyaline Cartilage in a Rabbit Model. *Stem Cells Int.* **2018**, (2018).
39. Wong, M. & Carter, D. R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* **33**, 1–13 (2003).
40. Landínez Parra, N. S., Vanegas Acosta, J. C. & Garzón Alvarado, D. A. Regulación molecular del cartílago articular en función de las cargas mecánicas y el proceso osteoartrosico: una revisión teórica. *Rev. Cuba. Ortop. Traumatol.* **22**, 0–0 (2008).
41. Parra, L. *et al.* Regulación molecular del cartílago articular en función de las cargas mecánicas y el proceso osteoartrosico: una revisión teórica. *Rev. Cuba. Ortop. Traumatol.* **22**, 0–0 (2008).

42. Kawakami, Y., Rodriguez-León, J. & Izpisua Belmonte, J. C. The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 723–729 (2006).
43. Hung CT, Henshaw DR, Wang CC, Mauck RL, Raia F, Palmer G, et al. Mitogen-activated protein kinase signaling in bovine articular chondrocytes in response to fluid flow does not require calcium mobilization. *Journal of Biomechanics.* 33:73-80 (2000).
44. Jin G, Sah RL, Li YS, Lotz M, Shyy JY, Chien S. Biomechanical regulation of matrix metalloproteinase-9 in cultured chondrocytes. *Journal of Orthopaedics Research.* 18:899-908 (2000).
45. Guo, W. *et al.* Mesenchymal Stem Cells in Oriented PLGA/ACECM Composite Scaffolds Enhance Structure-Specific Regeneration of Hyaline Cartilage in a Rabbit Model. *Stem Cells Int* **2018**, (2018).

## Anexos

### Anexo. 1 Blast protein secuencia de proteínas de humano y comparación para cada uno de los marcadores.

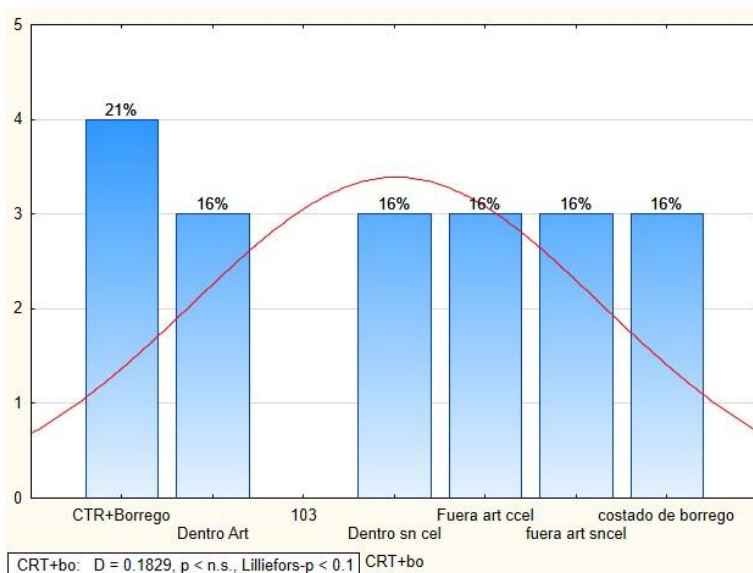
| Anticuerpos evaluados          | Proteína blanca | Ovis Aries | Homo sapiens (Humano) |
|--------------------------------|-----------------|------------|-----------------------|
| <b>Marcadores de cartílago</b> |                 |            |                       |
| Colágena 2AI                   | Ratón           | 97-100%    | 99-100%               |
| Agrecano                       | Ratón           | 94- 100%   | 97-100%               |
| SOX9                           | Humano          | 87-100%    | 87-100%               |
| <b>Marcadores de hueso</b>     |                 |            |                       |
| RUNX2                          | Humano          | 97%        | 100%                  |
| OPN                            | Humano          | 32-100%    | 98-100%               |

**Tabla.2 Comparación Blast protéin de los anticuerpos evaluados**

Se observa la comparación de las proteínas para cada anticuerpo utilizado y su comparación con ovinos y humanos.

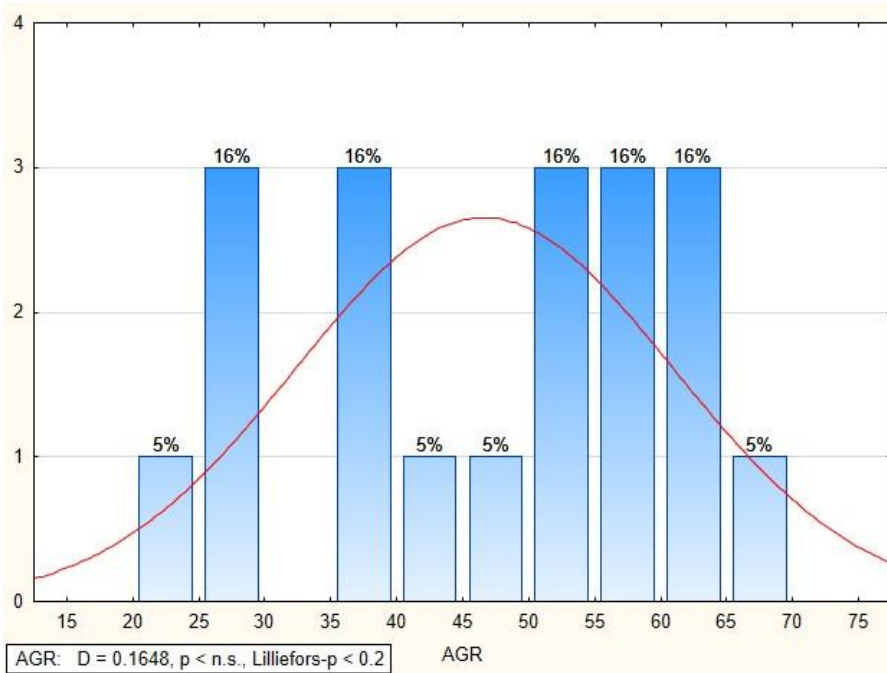
### Anexo 2. Pruebas de Kolmogorov-Smirnov

Prueba de Kolmogorov-Smirnov con la que se estableció que las poblaciones se comportaban de manera normal.



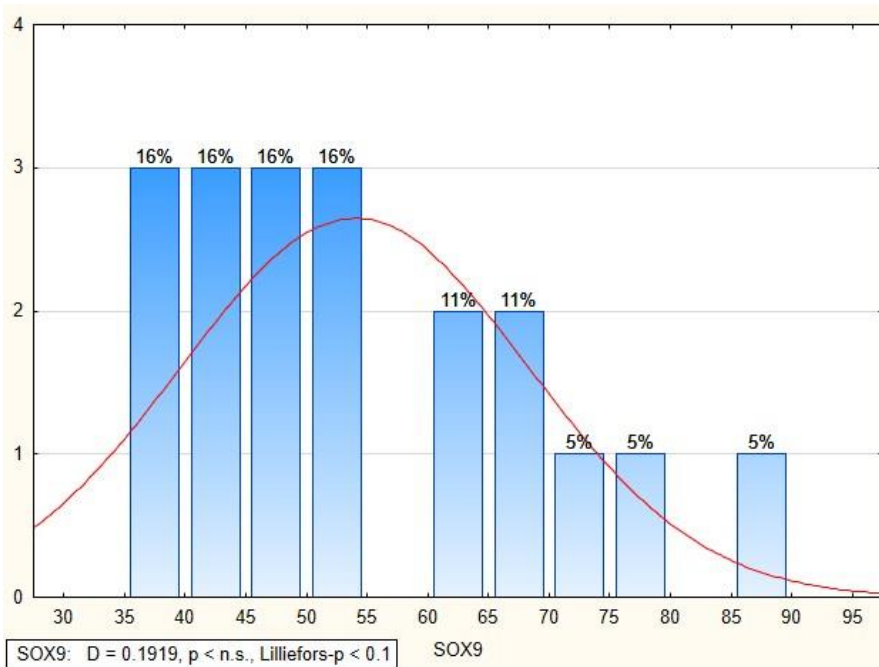
**Fig. 11 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para el control positivo de borrego**

La prueba no es significativa por la tanto tiene un comportamiento normal para el control positivo de borrego



**Fig. 12 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para el marcador de agrecano**

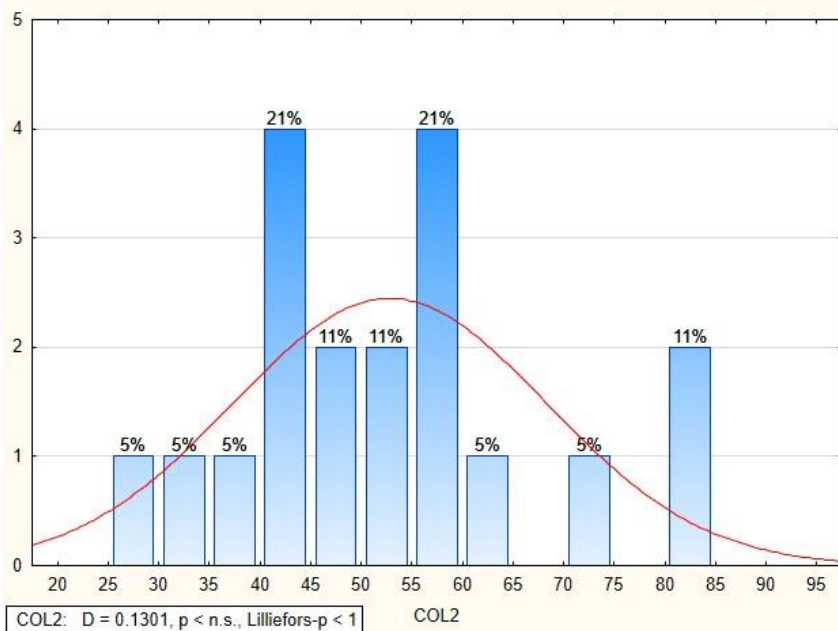
La prueba no es significativa por la tanto tiene un comportamiento normal para agrecano



**Fig. 13 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para el marcador de SOX9**

La prueba no es significativa por la tanto tiene un comportamiento normal para SOX9.



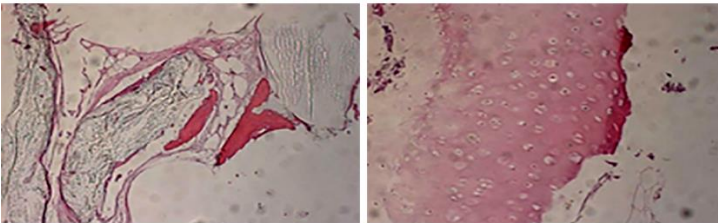


**Fig. 14 Prueba de Kolmogorov-Smirnov para el marcador de COL2A1**

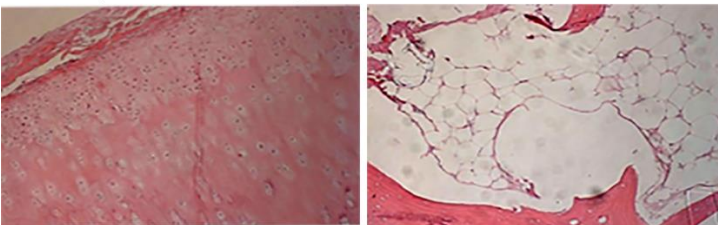
La prueba no es significativa por lo tanto tiene un comportamiento normal para COL2A1

**Anexo. 3 Tabla de tinciones H&E**

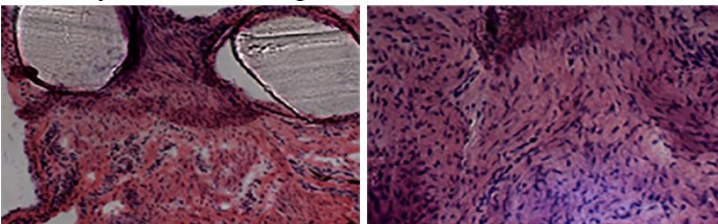
**Implante de cartilago a 3 meses HE**



**Implante de cartilago a 6 meses fuera de la art HE**



**Implante de cartilago a 6 meses dentro de la art HE**



**Fig. 15 Tinción H&E**

En cada implante podemos observar la morfología y tinción de los núcleos celulares marcados en violeta y otros cuerpos extracelulares se pueden ver teñidos de rosa.

**Anexo. 4 Análisis estadístico prueba T para muestras independientes**

| T-tests; Grouping: CTR+Borrego Group vs fuera art sncel |                           |                              |                      |                    |                              |                                 |                               |                                  |                            |                      |  |
|---|---------------------------|------------------------------|----------------------|--------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------|--|
|   | Mean -<br>CTR+Bor<br>rego | Mean -<br>fuera art<br>sncel | t-<br>val<br>ue      | d<br>f<br>p        | Valid N -<br>CTR+Borr<br>ego | Valid N -<br>fuera art<br>sncel | Std.Dev. -<br>CTR+Borre<br>go | Std.Dev. -<br>fuera art<br>sncel | F-ratio -<br>Varianc<br>es | p -<br>Varia<br>nces |  |
| A<br>G<br>R   | 30.73855                  | 54.31323                     | -<br>4.3<br>591<br>9 | 0.0<br>5 072<br>4  | 4                            | 3                               | 7.696594                      | 6.040479                         | 1.62351                    | 0.806<br>263         |  |
| C<br>O<br>L2  | 51.60532                  | 40.02403                     | 2.2<br>299<br>1      | 0.0<br>5 761<br>74 | 4                            | 3                               | 7.741883                      | 5.069149                         | 2.33251                    | 0.628<br>291         |  |
| S<br>O<br>X9  | 40.11148                  | 49.23679                     | -<br>2.4<br>186<br>0 | 0.0<br>5 602<br>21 | 4                            | 3                               | 6.241707                      | 1.603209                         | 15.1574<br>7               | 0.125<br>049         |  |

**Tabla. 3 Análisis estadístico del injerto fuera de la articulación sin células vs control de borrego**

| T-tests; Grouping: CTR+Borrego Group 2: costado de borrego |                        |                              |                      |        |                  |                              |                                    |                               |                                     |                            |                      |
|--|------------------------|------------------------------|----------------------|--------|------------------|------------------------------|------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|----------------------|
|  | Mean - CTR+Bo<br>rrego | Mean - costado de<br>borrego | t-<br>val<br>ue      | d<br>f | p                | Valid N -<br>CTR+Bor<br>rego | Valid N -<br>costado de<br>borrego | Std.Dev. -<br>CTR+Borr<br>ego | Std.Dev. -<br>costado de<br>borrego | F-ratio -<br>Varianc<br>es | p -<br>Varia<br>ncas |
| A<br>G<br>R  | 30.73855               | 62.31592                     | -<br>6.0<br>318<br>7 | 5      | 0.0<br>018<br>4  | 4                            | 3                                  | 7.696594                      | 5.34776                             | 2.07134<br>9               | 0.684<br>000         |
| C<br>O<br>L<br>2   | 51.60532               | 39.92074                     | 1.6<br>732<br>8      | 5      | 0.1<br>551<br>29 | 4                            | 3                                  | 7.741883                      | 10.91229                            | 1.98673<br>0               | 0.564<br>338         |
| S<br>O<br>X<br>9   | 40.11148               | 69.16457                     | -<br>5.2<br>947<br>3 | 5      | 0.0<br>032<br>06 | 4                            | 3                                  | 6.241707                      | 8.40239                             | 1.81217<br>0               | 0.609<br>534         |

**Tabla. 4 Análisis estadístico del injerto del costado de borrego**

| T-tests; Grouping: CTR+ Borrego vs Fuera art ccel |                        |                          |                      |        |                  |                              |                                |                               |                                 |                            |                      |
|---|------------------------|--------------------------|----------------------|--------|------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------|
|   | Mean - CTR+Bor<br>rego | Mean - Fuera art<br>ccel | t-<br>val<br>ue      | d<br>f | p                | Valid N -<br>CTR+Borr<br>ego | Valid N -<br>Fuera art<br>ccel | Std.Dev. -<br>CTR+Borre<br>go | Std.Dev. -<br>Fuera art<br>ccel | F-ratio -<br>Varianc<br>es | p -<br>Varia<br>ncas |
| A<br>G<br>R                                       | 30.73855               | 30.11180                 | 0.1<br>128<br>4      | 5      | 0.91<br>454<br>7 | 4                            | 3                              | 7.696594                      | 6.58442                         | 1.36635<br>0               | 0.898<br>051         |
| C<br>O<br>L<br>2                                  | 51.60532               | 49.99808                 | 0.2<br>217<br>7      | 5      | 0.83<br>326<br>3 | 4                            | 3                              | 7.741883                      | 11.62700                        | 2.25549<br>8               | 0.504<br>854         |
| S<br>O<br>X<br>9                                  | 40.11148               | 51.63351                 | -<br>1.6<br>903<br>2 | 5      | 0.15<br>175<br>8 | 4                            | 3                              | 6.241707                      | 11.86145                        | 3.61134<br>3               | 0.317<br>954         |

**Tabla. 5 Análisis estadístico del injerto fuera de la articulación con células vs control de borrego**

| T-tests; Grouping: CTR+Borrego vs Dentro sn cel |                    |                      |          |    |          |                       |                         |                        |                          |                     |               |
|---|--------------------|----------------------|----------|----|----------|-----------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------|---------------------|---------------|
|   | Mean - CTR+Borrego | Mean - Dentro sn cel | t-value  | df | p        | Valid N - CTR+Borrego | Valid N - Dentro sn cel | Std.Dev. - CTR+Borrego | Std.Dev. - Dentro sn cel | F-ratio - Variances | p - Variances |
| AGR   | 30.73855           | 51.27889             | -4.21292 | 8  | 0.002944 | 4                     | 6                       | 7.696594               | 7.46582                  | 1.062777            | 0.885755      |
| COL2  | 51.60532           | 58.63229             | -0.90245 | 8  | 0.393176 | 4                     | 6                       | 7.741883               | 14.03056                 | 3.284405            | 0.356545      |
| SOX9  | 40.11148           | 45.38331             | -1.50405 | 8  | 0.170980 | 4                     | 6                       | 6.241707               | 4.87869                  | 1.636817            | 0.587143      |

**Tabla. 6** Análisis estadístico del injerto dentro de la articulación sin células vs control de borrego

| T-tests; Grouping: CTR+Borrego Group vs Dentro Art |                    |                   |          |    |          |                       |                      |                        |                       |                     |               |
|--|--------------------|-------------------|----------|----|----------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|---------------|
|  | Mean - CTR+Borrego | Mean - Dentro Art | t-value  | df | p        | Valid N - CTR+Borrego | Valid N - Dentro Art | Std.Dev. - CTR+Borrego | Std.Dev. - Dentro Art | F-ratio - Variances | p - Variances |
| AGR  | 30.73855           | 55.34398          | -4.32855 | 5  | 0.007510 | 4                     | 3                    | 7.696594               | 7.04470               | 1.193638            | 0.972072      |
| COL2   | 51.60532           | 76.13989          | -3.17676 | 5  | 0.024628 | 4                     | 3                    | 7.741883               | 12.87343              | 2.765003            | 0.417146      |
| SOX9   | 40.11148           | 72.13878          | -4.43978 | 5  | 0.006766 | 4                     | 3                    | 6.241707               | 12.82888              | 4.224458            | 0.268266      |

**Tabla.7** Análisis estadístico del injerto dentro de la articulación con células vs control de borrego.