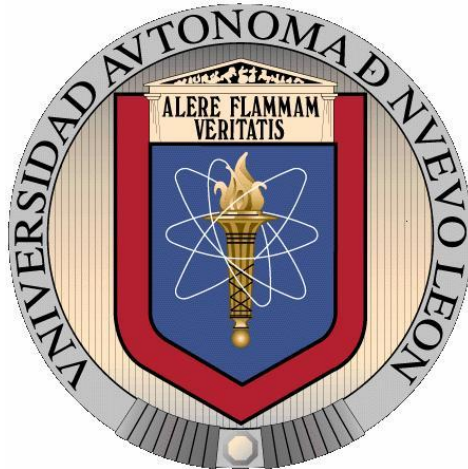


**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina**



**“Análisis de un Implante para Cartílago de Células Madre
Mesenquimales Modificadas Genéticamente con Factores
Condrogénicos en *Ovis aries*”**

Propuesta de tesis presentada por:

L.B.G. Marcela Alejandra Espinoza Juárez

Como requisito para obtener el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad
en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Diciembre de 2012

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y en la Unidad de Terapia Génica y Celular del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); bajo la dirección del Dr. C. Augusto Rojas Martínez y la co-dirección del Dr. C. Jorge Lara Arias.

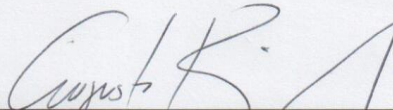
Las cirugías, seguimiento y mantenimiento de los animales se realizaron en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la misma universidad bajo la colaboración y asesoría del M.V.Z Adalberto Ábrego Guerra.

Los ensayos de histoquímica e inmunohistoquímica se realizaron en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la UANL, contando con la colaboración y asesoría del M.C. Víctor J. Romero Díaz. Parte de las imágenes obtenidas de estos ensayos se tomaron en la Unidad de Bioimagen y Biotecnología del CIDICS con la colaboración del Dr. C. Juan Carlos Segoviano Ramírez.

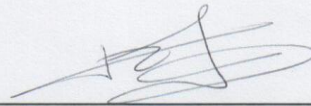
Este trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina bajo el código BI12-002. Cuenta con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio de la convocatoria S0008-2009-1.

**“Análisis de un Implante de Cartílago de Células Madre Mesenquimales
modificadas genéticamente con factores condrogénicos en *Ovis aries*”**

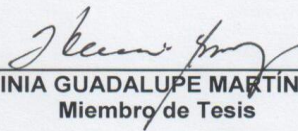
Aprobación de la Tesis:



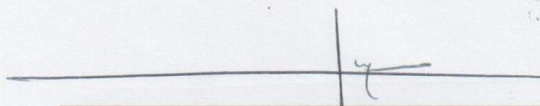
DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Director de Tesis



DR. C. JORGE LARA ARIAS
Co-Director



DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Miembro de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| LISTA DE TABLAS | 1 |
| LISTA DE FIGURAS | 2 |
| ABREVIATURAS | 3 |
| RESUMEN | 4 |
| CAPÍTULO I. Introducción | 5 |
| CAPÍTULO II. Antecedentes | |
| 2.1 Cartílago Articular | 6 |
| 2.2 Padecimientos y Reparación del Cartílago | 7 |
| 2.3 Terapia Celular del Cartílago | 9 |
| 2.4 Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo (ADSC) | 10 |
| 2.5 Factores de Crecimiento Condrogénico | 12 |
| 2.6 Terapia Génica | 13 |
| 2.7 Ingeniería de Tejidos | 15 |
| 2.8 Modelos Animales | 16 |
| CAPÍTULO III. Justificación | 18 |
| CAPÍTULO IV. Objetivo General | 19 |
| CAPÍTULO V. Objetivos Específicos | 20 |
| CAPÍTULO VI. Estrategia General | 21 |
| CAPÍTULO VII. Materiales y Métodos | |
| 7.1 Material Biológico | 21 |
| 7.2 Materiales y Reactivos | 22 |
| 7.3 Equipos | 24 |
| 7.4 Métodos | 24 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO VIII. Resultados | |
| 8.1 Perfiles de función hepática y biometrías hemáticas completas | 34 |
| 8.2 ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> . Ensayos de micromasa | 35 |
| 8.3 ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> . | |
| 8.3.1 Análisis macroscópico de las lesiones | 36 |
| 8.3.2 Histoquímicas | |
| 8.3.2.1 Composición del tejido y morfología celular | 38 |
| 8.3.2.2 Detección producción de GAGs y colágenos | 40 |
| 8.3.3 Inmunohistoquímicas | |
| 8.3.3.1 Producción de colágeno I | 42 |
| 8.3.3.2 Producción de colágeno II | 43 |
| 8.3.3.3 Producción de colágeno X | 44 |
| 8.3.4 EVALUACIÓN HISTOLÓGICA. Escala O'Driscoll | 44 |
| CAPÍTULO IX. Discusión | 46 |
| CAPÍTULO X. Conclusiones | 54 |
| CAPÍTULO XI. Perspectivas | 55 |
| CAPÍTULO XII. Bibliografía | 56 |
| CAPÍTULO XIII. Anexos | |
| 13.1 ANEXO 1. Medios de cultivo y soluciones | 59 |
| 13.2 ANEXO 2. Técnicas | 60 |
| 13.3 ANEXO 3. Evaluación histológica: escala O'Driscoll. | 65 |

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Factores condrogénicos
- Tabla 2.** Perfiles de función hepática y biometrías hemáticas
- Tabla 3.** Número de borregos por resultado
- Tabla 4.** Análisis de escala O'Driscoll

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Composición y arreglo del cartílago articular
- Figura 2.** Tipos de terapia génica para cartílago
- Figura 3.** Estrategia general
- Figura 4.** Lipectomía
- Figura 5.** Toma de muestra
- Figura 6.** Células HEK 293 en cultivo
- Figura 7.** Efecto citopático en células HEK 293
- Figura 8.** Esquema de producción viral
- Figura 9.** Diluciones seriadas de las partículas virales
- Figura 10.** Micromasa celular
- Figura 11.** Intervención quirúrgica
- Figura 12.** Estabulación de los borregos
- Figura 13.** Micromasas
- Figura 14.** Fotos de las lesiones al momento del sacrificio
- Figura 15.** Tricómico de Masson
- Figura 16.** Ampliación de superficie en casos mejor e intermedio del grupo 2
- Figura 17.** Zonas de transición en áreas de lesión de borregos del grupo 3
- Figura 18.** Safranina O / verde rápido
- Figura 19.** Ampliación de zonas de transición en grupo 3 y fibrocartílago en grupo 2
- Figura 20.** Inmunohistoquímica para colágeno I
- Figura 21.** Inmunohistoquímica para colágeno II
- Figura 22.** Inmunohistoquímica para colágeno X
- Figura 23.** Escala de evaluación histológica O'Driscoll

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|---|
| BMP | Proteínas morfogénicas de hueso |
| MEC | Matriz extracelular |
| CMM | Células madre mesenquimales |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle médium |
| FGF-2 | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| GAG | Glucosaminoglicanos |
| IGF-1 | Factor de crecimiento similar a insulina-1 |
| MOI | <i>Multiplicity of infection</i> |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| qPCR | Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SOX9 | <i>Sex determining regio Y-box 9</i> |
| TCID₅₀ | <i>Tissue culture infectious dose 50</i> |
| TGF-β | Factor de crecimiento transformante beta |
| PDGF | Factor de crecimiento derivado de plaquetas |
| MAPK | Proteína quinasa activadora de mitógenos |
| ATCC | American type cell culture |
| DAB | Diaminobenzidina |
| HRP | Peroxidasa de rábano |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| rpm | Revoluciones por minuto |

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Se han desarrollado diferentes técnicas para el tratamiento de padecimientos articulares. Actualmente, metodologías que incluyen células madre adultas (CMM) son las más prometedoras debido a las ventajas de un tratamiento con células autólogas. En nuestro laboratorio se han hecho ensayos *in vitro* a través de los cuales se ha determinado que la combinación de los factores condrogénicos IGF-1 / FGF-2 transducidos por vectores adenovirales en CMMs derivadas de tejido adiposo, induce una condrogénesis óptima. **OBJETIVO:** Evaluar histológicamente la regeneración de cartílago articular en un modelo de lesión de cóndilo en *Ovis aries*, inducida por un implante de CMMs autólogas derivadas de tejido adiposo modificadas genéticamente con los factores IGF-1 y FGF-2, incluidas en una matriz de fibrina humana. **MÉTODOS:** Se realizaron 3 grupos experimentales: lesión sin tratamiento (grupo 1), lesión tratada con implante de CMM (grupo 2) y lesión tratada con implante de CMM modificadas genéticamente (grupo 3). Cada grupo consistió de 7 borregos. Para cada uno se realizó una lipectomía, a partir de la cual se extrajeron las células que se emplearían en el tratamiento. Se realizaron perfiles de función hepática y biometrías hemáticas para cada borrego. Se hizo un ensayo de micromasa para los 7 borregos del grupo 3. 4 meses después de las cirugías de lesión e implantación se realizaron análisis histoquímicos (tricrómico de Masson, safranina O / verde rápido, azul de toluidina); inmunohistoquímicos (colágeno I, II y X) y una evaluación histológica (escala O'Driscoll). **RESULTADOS:** No se observaron eventos adversos pos-implante y la estabulación se realizó sin eventualidades. En los ensayos de micromasa se observó variabilidad entre los 7 borregos. Macroscópicamente en el grupo 2 se encontraron un mayor número de lesiones completamente cubiertas (2). Microscópicamente se encontró: grupo 1, baja celularidad, grupos de condrocitos y regeneración natural; grupo 2, fibrosis, calcificación y detección de GAGs similar a lo normal; grupo 3, fibrosis, calcificación, mezcla de tejidos en transición y neovascularización. **DISCUSIÓN:** La variabilidad encontrada en los ensayos *in vitro* puede deberse a que no se hizo selección de la población de CMM; a que el ensayo se realizó solo hasta el día 14 y a la variabilidad intrínseca de cada animal. A pesar de que macroscópicamente el grupo 2 presentó mayor número de lesiones reparadas, la microscopía reveló fibrosis y calcificación. En el grupo 1 se observó una regeneración natural aunque con un poco de fibrosis. En el grupo 3 se presentó una mezcla de tejidos (cartílago, hueso, mesénquima) que sugiere una organización temprana del tejido, por lo que probablemente se realizó esta evaluación en un tiempo muy corto. En las inmunohistoquímicas se apreciaron patrones de expresión similares a los normales en el caso del grupo 1. En el grupo 2 se detectaron niveles altos de colágeno I. En el grupo 3 se encontró expresión tanto de colágeno de tipo I como de tipo II en todos los individuos. **CONCLUSIONES:** No hubo una adecuada reparación con implante al mes 4 en el grupo 3. Se encontró una mezcla de diferentes tejidos con tejido fibrótico produciendo colágeno I y II. Los datos sugieren una organización temprana de los tejidos hacia condrogénesis.

Dr. Augusto Rojas Martínez
Director de Tesis

Dr. Jorge Lara Arias
Co-Director de Tesis

CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

Los padecimientos crónicos degenerativos de articulaciones son una de las principales causas de incapacidad en edad productiva en el mundo. Alrededor del planeta, millones de personas presentan complicaciones en articulaciones debidas al desgaste natural, por traumatismos, o enfermedades inflamatorias autoinmunes.

En cuanto al tratamiento no quirúrgico de este tipo de padecimientos se han desarrollado diversas tecnologías que van desde el reemplazo de la articulación completa por prótesis de diferente naturaleza, hasta técnicas de reparación mediante ingeniería de tejidos y medicina regenerativa.

El cartílago hialino, que es el tipo de cartílago que se encuentra recubriendo articulaciones y tráquea, es un tejido conectivo complejo, el cual presenta una diversidad de componentes que se encuentran en un arreglo muy particular. Además de lo anterior, la falta de irrigación hace de este tejido particularmente difícil de reestructurar.

En 1925 se reportó uno de los primeros casos de trasplante osteoarticular. A partir de esto han evolucionado un sinnúmero de tecnologías. La primera metodología empleada (1979), además del reemplazo completo de articulación, fue la estimulación de médula ósea de hueso subcondral para la formación de fibrocartílago de relleno, generada por la penetración hasta esta área. Posteriormente en los años 1975 y 1976, el Dr. Allan Gross realizó los primeros injertos osteocondrales. Se le atribuye al Dr. Lars Peterson la primera implantación de condrocitos cultivados *in vitro* en 1984.

Actualmente, algunas metodologías que incluyen células madre adultas son las que se han desarrollado de forma importante, debido a la ventaja que representa el que el tratamiento sea autólogo, sin riesgo alguno para el paciente. Aunado a esto, se encuentra el potencial de diferenciación, manipulación y proliferación de esta estirpe celular y su muy importante y probada capacidad regenerativa en diferentes órganos.

Sin embargo, los defectos condrales siguen siendo un reto para la medicina moderna ya que no se ha logrado restablecer la arquitectura natural del tejido. Es necesario entender mejor los mecanismos moleculares y fisiológicos que promueven la regeneración articular y de esta forma ser capaces de inducir, mediante una terapia celular efectiva, la regeneración estructural y funcional del cartílago hialino.

CAPÍTULO II ANTECEDENTES

2.1 CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular es un tejido complejo que cubre las terminaciones de huesos largos en articulaciones diartrodiales evitando, junto con el líquido sinovial, la fricción constante y consecuente desgaste de las mismas. Es un tejido conjuntivo de consistencia coloidal, flexible, que posee resistencia elástica. La función de este tejido está determinada por su composición bioquímica y propiedades mecánicas. Está estructurado de componentes de diversa naturaleza.

Existen tres tipos de cartílago: hialino, elástico y fibroso, los cuales se diferencian fundamentalmente por la cantidad de sustancia amorfa que presentan y por el tipo de colágeno que predomina en la matriz cartilaginosa.

En el cartílago hialino se pueden distinguir dos fases: una sólida y una líquida. La sólida está compuesta principalmente por distintos colágenos (10-20% de peso húmedo) siendo el colágeno II el que se encuentra en mayor proporción (90%). También se encuentran proteoglicanos formando una matriz gelatinosa y en alrededor de 2%, condrocitos que son las células propias de este tejido. Los condrocitos están incluidos en lagunas en el seno de la matriz y son células esféricas. La fase líquida está compuesta por agua en la cual se encuentran iones y nutrientes disueltos. Cualquier alteración al arreglo o proporción de los componentes de la matriz extracelular modifica de forma importante las propiedades biomecánicas del tejido.¹

El arreglo estructural de los componentes bioquímicos del cartílago articular es particular y determina tres zonas con características morfológicas y funcionales diferentes: zona superficial, zona media y zona interna. Éstas se distribuyen a lo largo del tejido como se muestra en la Figura 1.

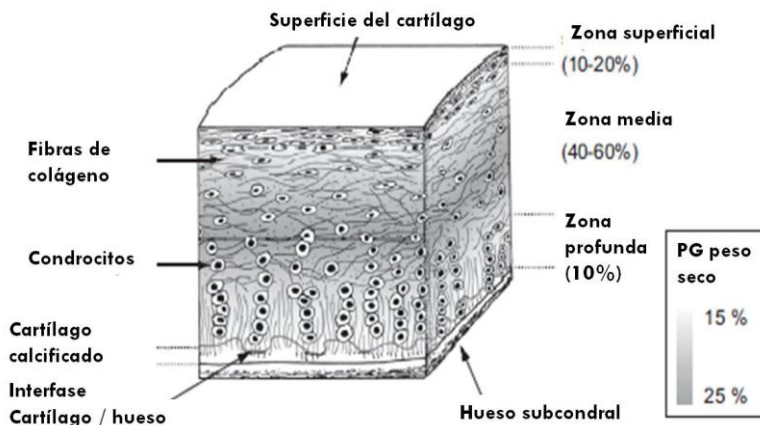


Figura 1. Composición y arreglo del cartílago articular hialino. Se muestran 3 zonas que consisten de diferentes componentes en distintos arreglos, lo cual, les brinda funciones determinadas. Adaptada de Buckwalter y col., 1994.

Se pueden identificar condrocitos con morfología y distribución diferente para las tres zonas, así como cambios en la orientación de las fibras de colágeno y en la proporción de proteoglicanos. Es importante mencionar que es el movimiento de compresión derivado de la carga a la que están sujetas las articulaciones, el que mantiene sano el cartílago y el fenotipo normal de los condrocitos que lo componen.

Una característica importante de este tejido es que es aneural, avascular y alinfático. El transporte de nutrientes y desechos se hace a través de difusión del líquido sinovial que a su vez es producto de la compresión mecánica de las articulaciones. Además de lo anterior, la capacidad de remodelación de este tejido es muy baja, ya que los condrocitos son células con un metabolismo muy bajo y el recambio de los componentes de la matriz cartilaginosa es prácticamente nulo a lo largo de la vida de una persona. Los proteoglicanos presentes en el cartílago articular se reemplazan cada 25 años y la vida media del colágeno se estima de varias décadas hasta inclusive 400 años.² Estas características y la ausencia de vasos sanguíneos y linfáticos, resulta en una limitada capacidad regenerativa.

2.2 PADECIMIENTOS Y MÉTODOS DE REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO

Muchas de las lesiones articulares son asintomáticas y los individuos que presentan síntomas por lo general padecen de un intenso dolor y se ha demostrado que el riesgo de estos pacientes con lesión articular de progresar a osteoartritis aumenta 5 veces en comparación con pacientes que no han tenido lesiones en cartílago.²

En la actualidad la osteoartrosis es una enfermedad de compleja etiología y que representa el padecimiento músculo-esquelético más común en personas de edad avanzada. Inicialmente el tratamiento a pacientes con lesiones articulares incluye un tratamiento paliativo y artroplastia.³

En nuestro país, el 25% de la población adulta sufre alguna forma de artrosis, que es la degeneración o lesión mecánica en articulaciones, porcentaje que se incrementa considerablemente en las personas mayores de 65 años. Afecta principalmente a las mujeres y en muchas ocasiones se presenta de forma asintomática. En México el 0.4% del PIB se destina al tratamiento de enfermedades muscoesqueléticas, entre las que se encuentran las lesiones mecánicas de articulaciones.⁴

Los orígenes de lesiones en el cartílago articular son diversos: obesidad, lesión por deporte, desgaste por edad o enfermedad. Desde 1743 se identificaba al desgaste articular como un problema importante y de difícil tratamiento y se sabía que una vez dañado, nunca se recuperaba. A pesar de la ya sabida limitada capacidad de regeneración, a lo largo de la historia se han desarrollado diferentes metodologías y estrategias de reparación articular.

En 1959 se promovía la entrada de médula ósea en la lesión al hacer perforaciones hasta hueso subcondral mediante la técnica Pridie, de esta forma se inducía irrigación y la entrada de factores y células que potenciaban la regeneración del tejido. En la actualidad esta técnica se ha mejorado haciendo las perforaciones más pequeñas (microfactura).²

Otra técnica utilizada para tratar lesiones articulares es cubrirlas con alguna matriz natural o sintética (colágeno, ácido hialurónico). De forma natural se puede hacer un trasplante de cartílago autólogo de una zona no sujeta a carga.

El trasplante de condrocitos autólogos es una técnica que se ha empleado desde el año 1994, siendo en sus primeros años una simple inyección de condrocitos expandidos a partir de una biopsia tomada de una zona de la articulación no sujeta a peso. En la segunda etapa del desarrollo de esta técnica se comenzaron a usar andamios en los cuales se incluyen las células. En la actualidad se utilizan implantes tridimensionales en los cuales las células se distribuyen espacialmente de una forma más adecuada. Sin embargo, esta técnica tiene limitaciones importantes. Para la

obtención de los condrocitos a trasplantar en el área de la lesión es necesario generar una nueva lesión al tomar la biopsia. Sumado a esto, la desdiferenciación que se presenta *in vitro* al expandir las células para tener un número adecuado para trasplantar, provoca que el tejido neoformado sea fibroso y no cartílago hialino.

2.3 TERAPIA CELULAR DEL CARTÍLAGO

Debido a los prometedores resultados que las células madre adultas han reportado en otros padecimientos y que no representan un dilema ético como el empleo de células embrionarias, se han empleado en el tratamiento de lesiones articulares.⁵

La fuente de células madre mesenquimales adultas mejor caracterizada y primera en ser empleada es la médula ósea. Éste tejido se obtiene a partir de punción en cresta iliaca y se aíslan a las células mononucleares que poseen la particularidad de crecer adheridas al plástico de una botella de cultivo. Se ha probado incluir estas células en matrices y cultivarlas en medio condrogénico con lo que se ha probado que son capaces de diferenciarse a células parecidas a condrocitos.⁶

Se ha observado en diferentes trabajos, que al administrar células madre mesenquimales (CMMs) en el área de la lesión del cartílago las células son capaces de diferenciarse a células con características similares a condrocitos. Después de 6 semanas comienzan a desdiferenciarse y a perder depósitos de colágeno II. Esto aún permanece como un área de oportunidad ya que se ha demostrado que estas células son capaces de llevar a cabo funciones similares y poseer características morfológicas y de marcadores celulares similares a los condrocitos; sin embargo, esto es por un periodo de tiempo limitado. Se han realizado trabajos en los cuales se analiza el perfil de metilación de promotores de proteínas como colágeno II y X que permanecen prendidos o apagados durante la condrogénesis para de esta forma encontrar los mecanismos moleculares que puedan asegurar el mantenimiento de las CMMs en un estado de diferenciación por un largo periodo de tiempo.²

Chang y col. realizaron un trabajo en donde se probaron células recién extraídas de médula ósea incluidas en una matriz de fibrina en una lesión crónica y concluyeron que estas células eran capaces de reparar el cartílago articular.⁷ Se han hecho trabajos utilizando borregos como modelo animal practicándoles lesiones en rodilla solo con células derivadas de médula ósea⁸ o pre-tratadas en medio condrogénico en una

matriz de quitosan.⁹ En ambos casos los análisis histológicos reportaron una matriz similar al cartílago hialino.

Guo y colaboradores fueron uno de los primeros en utilizar al borrego como modelo animal en trabajos de reparación articular. Su trabajo consistió en el empleo de células madre derivadas de médula ósea embebidas en una matriz de fosfato de β -tricalcio. Después de un tiempo de observación de 24 semanas determinaron que la formación de cartílago hialino se presentaba bajo estas condiciones debido a la detección de glicosilaminoglicanos (GAGs) y el análisis histológico que realizaron.¹⁰

Se ha determinado que el efecto que tienen las CMMs en la regeneración de lesiones o neoformación tisular, se debe no solo al reclutamiento de las células administradas, sino también a la excreción de factores de crecimiento y la formación de estructuras tisulares tales como puentes fibrilares de colágeno. Estas acciones promueven la concentración de más células progenitoras endógenas que aceleran la reestructuración tisular. En diferentes trabajos en los cuales se administraron CMMs vía intravenosa después de lesiones diversas (infarto al miocardio, isquemia cerebral, lesión en pulmón) se identificó una migración predominante de las células administradas hacia el área de la lesión. Esto puede deberse a receptores o ligandos presentes en el área de la lesión que facilita la migración, adhesión e infiltración de las CMMs. Puede ser un proceso similar al presentado por linfocitos en una reacción inflamatoria.¹¹

2.4 CMM DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO

Desde los años sesentas del siglo XX, cuando por primera vez Alexander Friedenstein y su equipo demostraron que la médula ósea es capaz de formar un tejido óseo heterotópico en la cápsula renal de ratones, capaz de mantenerse y renovarse por sí solo, las células madre han representado una opción prometedora para la restauración tisular. Las que han sido mejor caracterizadas y empleadas (por ser las primeras en identificarse), tanto en investigación como en terapias experimentales son las derivadas de médula ósea. Sin embargo, su tasa de recuperación y proliferación es baja. Otro linaje celular pluripotencial y por mucho tiempo considerado la mejor opción para terapia celular regenerativa, es el embrionario. El uso de esta estirpe celular presenta un conflicto ético muy importante, por lo cual su empleo ha sido limitado y relegado.

En los últimos años se han comenzado a emplear las CMM derivadas de tejido adiposo. Éstas células requieren de un procedimiento poco invasivo para su obtención, tienen la capacidad de diferenciarse a diversos linajes mesodérmicos (condrocitos, osteocitos, adipocitos, miocitos) e inclusive a células neuronales; además, su porcentaje de obtención en comparación con otras fuentes (0.1% - 3.33%) y tiempo de duplicación elevados (~60 hrs) las hacen una opción ideal para la terapia celular e ingeniería de tejidos.¹²

Después de realizar un análisis de diferentes donadores (humanos y otras especies), el grupo de trabajo del Dr. Nauta encontró que los inmunofenotipos presentados por las CMM derivadas de tejido adiposo fueron consistentes y además similares a los de las células derivadas de médula ósea. Se han determinado marcadores de superficie como Stro-1, CD105, CD90, CD166, CD271. También se ha determinado que este linaje celular es negativo para los marcadores hematopoyéticos y endoteliales CD11b, CD14, CD31 y CD45.¹³

Se ha comprobado en modelos de isquemia en ratones la regeneración producida por las CMMs derivadas de tejido adiposo administradas por vía intravenosa e intramuscular, lo cual denota un efecto directo (diferenciación) e indirecto (secreción de factores angiogénicos). Se piensa que además de factores de crecimiento, citocinas y antioxidantes son secretados por estas células, lo cual promueve efectos autócrinos y parácrinos tales como la diferenciación, reclutamiento de otras células madre y la supervivencia y recuperación de células dañadas.

Se ha obtenido la regeneración de úlceras en pacientes diabéticos tratados con CMMs derivadas de tejido adiposo incluidas en una esponja de colágeno I. También se ha logrado la regeneración de tejido periodontal en un modelo de rata utilizando CMMs derivadas de tejido adiposo y plasma rico en plaquetas. Así mismo las CMMs derivadas de tejido adiposo han sido empleadas ampliamente en el tratamiento de heridas, e inclusive en pacientes tratados con radioterapia que presentaron daño funcional en diferentes órganos. Así como estos trabajos, se ha logrado la regeneración de diferentes tejidos (hueso, miocardio, nervios periféricos, tendones) entre los cuales se encuentra el tejido osteocondral.¹⁴

Se ha probado ya este linaje celular en la inducción de la generación de cartílago utilizando una matriz de fibrina comercial en ratones atímicos. Después de 12 semanas

se observó que el grupo de ratones que fueron tratados con la combinación de CMMs derivadas de tejido adiposo y fibrina resultó en la producción de un tejido similar a cartílago hialino, con producción de GAGs, un aumento en el tamaño de la fibrina y la expresión de marcadores condrogénicos.

2.5 FACTORES DE CRECIMIENTO CONDRÓGÉNICO

Hasta el momento se ha identificado un número significativo de factores que intervienen en condrogénesis, síntesis de matriz extracelular (MEC) en cartílago y restauración del tejido. Muchos de ellos actúan en conjunto para regular desarrollo y homeostasis del tejido.

Además de estimular síntesis de componentes de la MEC, estos factores inducen proliferación celular y disminuyen los efectos catabólicos generados por citocinas como IL-1 y metaloproteinasas. Los factores ideales para una terapia de regeneración articular deberán cumplir con las siguientes características: a) ser efectivo sin importar la edad del paciente, b) ser efectivo sin importar la presencia de osteoartritis y c) no ocasionar efectos colaterales en ningún tejido u órgano asociado: ligamentos, tendones, membrana sinovial, meniscos, hueso subcondral, mesénquima.¹⁵

Algunos de los factores reportados en la literatura con potencial condrogénico son los siguientes¹⁵:

Tabla 1. Factores condrogénicos

| | |
|-------------------------------|---|
| TGF-β | Se ha probado su capacidad para potenciar la síntesis de MEC a través de la estimulación de los condrocitos. Disminuye también actividad catabólica de citocinas. Estimula condrogénesis <i>in vitro</i> . Sin embargo, en algunos estudios <i>in vivo</i> se han encontrado efectos nocivos como fibrosis. |
| BMPs | Estimulan síntesis de MEC. Inducen la producción de colágeno IIB y disminución de colágeno I. Los efectos regenerativos que produce el empleo de BMP7 no son dependientes de edad o presencia de osteoartritis. |
| IGF-1 | En cultivo, la adición de este factor junto con TGF- β se ha comprobado induce diferenciación condrogénica en CMMs. En modelos animales el empleo de este factor genera una reparación extensiva del cartílago. |
| FGF-2 | Participa en la homeostasis del cartílago. Se ha observado que activa rutas anabólicas y disminuye agricanasa. Sin embargo, se ha encontrado que en algunos casos puede ser antagonista de la producción de proteoglicanos inducida por IGF-1. |
| PDGF | Este factor posee un rol importante en la reparación de heridas mediante la estimulación de síntesis de MEC. No presenta efectos adversos hasta el momento. |

Zschamack y colaboradores ¹⁶ realizaron 4 grupos experimentales de tratamiento de lesiones de cóndilo en borrego, en donde probaron el empleo de una matriz de colágeno I y embebieron CMMs derivadas de médula ósea y pre-diferenciadas *in vitro* con TGF- β . Después de 6 meses de observación encontraron que el grupo en donde las células fueron pre-diferenciadas con el factor condrogénico, mostraba regeneración del cartílago.

Existen dos rutas intracelulares principales mediante las cuales TGF- β induce la diferenciación condrogénica. La primera de ellas involucra a la familia SMAD y la segunda a la proteincinasa activada por mitógeno (MAPK). Las dos operan a través de un receptor para TGF β . La familia de citocinas FGF participan en condrogénesis por medio de la fosforilación de MAPK, esto induce la expresión de Sox9 que es un regulador clave en la diferenciación condrogénica.¹⁷

En un trabajo reportado por Singh y colaboradores³ se determinó la influencia que ejercía IGF-1 en la reparación del cartílago. Anterior a este trabajo, Mizuta y colaboradores ¹⁸ demostraron FGF-2 es crucial para la proliferación de células condroprogenitoras durante la inducción de condrogénesis en una lesión osteocondral.

2.6 TERAPIA GÉNICA

Uno de los inconvenientes de utilizar factores para la inducción de las células que se emplean en una terapia celular, es la vida media de las proteínas y la dilución en los tejidos y fluidos del organismo. Para utilizarlos como inductores es necesario realizar varias dosis para que la presencia de los factores sea constante. Es por esto que se ha considerado el empleo de la terapia génica como una herramienta adecuada para promover la expresión constitutiva de estos factores y de esta forma la inducción de la condrogénesis sea prolongada. Lo que se pretende lograr al momento de aplicar una terapia génica en cartílago hialino es la expresión sostenida y localizada en el área de lesión, de factores que promuevan la regeneración del cartílago, exponiendo al mínimo riesgo a los tejidos que no son blanco de la terapia.

El primero en utilizar terapia génica en articulaciones fue Evans C.H. y colaboradores en 1996 ¹⁹ para el tratamiento de artritis reumatoide con un vector retroviral. En los últimos años se han venido evaluando diferentes sistemas de modificación genética.

Un componente clave de una terapia génica es el vector mediante el cual se modificarán las células diana. Hasta el momento se han generado y utilizado una variedad amplia de vectores para reparación articular, entre los que se encuentran: DNA desnudo, liposomas, adenovirus, virus asociados a adenovirus, virus del herpes simple, foamivirus, lentivirus, etc. cada uno con características de expresión del transgen distintas.²⁰ La terapia génica utilizando Este tipo de vectores varía desde administrar el vector directamente en el área de la lesión que se quiere tratar (terapia *in vivo*), hasta la construcción de tejidos *in vitro* que han sido potencializados mediante la modificación genética de las células que los componen (terapia *ex vivo*). Los análisis *in vivo* son más simples, baratos y menos invasivos; sin embargo, implicarían la introducción directa al organismo a tratar y por lo tanto, mayor riesgo.

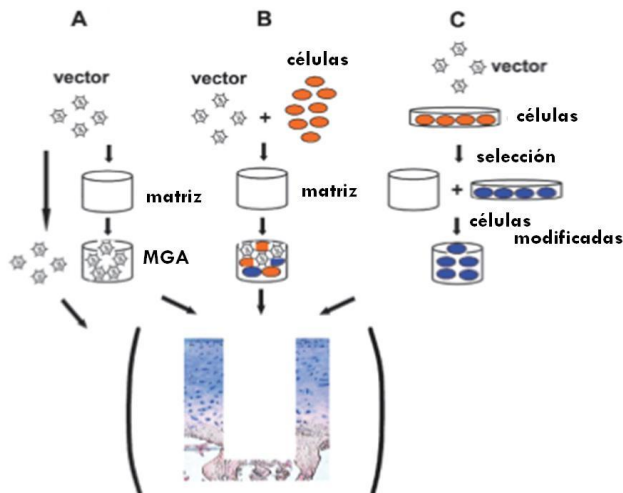


Figura 2. Tipos de terapia génica para cartílago. A. el vector acarreador del gen o genes con los que se desean modificar las células, es embebido en un andamio, llamado matriz genéticamente activada (MGA) y posteriormente es colocado en el área de lesión. B. Las células y el vector son incluidos en un andamio para posteriormente ser colocados en el área de lesión; C. Las células son modificadas genéticamente *ex vivo*, son seleccionadas y posteriormente embebidas en la matriz que se colocará en el área de la lesión. Tomada de Steinert y col., 2008.

Para la inducción de condrogénesis *in vitro* de células CMMs a través de terapia génica se han probado diferentes proteínas morfogénicas de hueso (BMPs).^{21 22} En un trabajo realizado en ratas, se evaluó la condrogénesis *in vivo* inducida por CMMs modificadas genéticamente con los factores BMP-2 e IGF-1 mediante vectores adenovirales e incluidas en una matriz de fibrina en lesiones patelares. Se comprobó mediante la detección de colágeno tipo II y proteoglicanos, que el tratamiento con estos dos factores era efectivo para la producción de un tejido similar al cartílago hialino.²³

En 2010 se realizó un trabajo en el cual se emplearon conejos con lesión en cóndilo los cuales fueron tratados con fibroblastos genéticamente modificados con IGF-1 o/y FGF-2. Después de 4 meses de observación se determinó que la combinación de los dos

factores era la que generaba mejores puntuaciones en una escala de evaluación histológica, así como la que producía una proliferación celular más elevada.²⁴

En nuestro laboratorio se realizaron ensayos *in vitro* transduciendo CMMs derivadas de tejido adiposo con diferentes factores condrogénicos solos o en combinación. Se realizaron micromasas y se evaluaron a los días 3, 14 y 28 por qPCR, métodos histoquímicos e inmunohistoquímicos y pruebas bioquímicas. La combinación de factores que resultó en una mayor producción de marcadores condrogénicos (agrecano, colágeno II) y una menor producción de proteínas involucradas en procesos de fibrosis e hipertrofia (colágeno I y X) por qPCR fue la constituida por IGF-1 y FGF-2. Estos resultados fueron corroborados por ensayos histoquímicos y de inmunohistoquímica, determinándose que esta combinación de factores indujo una mejor condrogénesis.²⁵

2.7 INGENIERÍA DE TEJIDOS

Para la reparación de cartílago se han desarrollado alternativas utilizando células, factores de crecimiento y andamios o matrices con propiedades biomecánicas similares al tejido que se quiere mimetizar. Las ventajas que ofrecen este tipo de andamios son: potenciar la reparación del tejido, cubrir el área dañada, mejorar la distribución de las células en un volumen determinado y liberar localmente moléculas capaces de estimular la regeneración del tejido tratado. Estas herramientas son utilizadas en un campo de la medicina regenerativa que es la ingeniería de tejido. Éste es un campo multidisciplinario que se enfoca en restaurar, mantener o potencializar el funcionamiento de órganos y tejidos.²

Se ha observado que la matriz en la que se han incluido CMMs determina en cierta medida la diferenciación de éstas hacia ciertos linajes. Las células perciben su microambiente, reaccionan ante él y lo modifican. Este proceso natural contribuye a la definición de la función e identidad de las mismas. El cultivo en superficies rígidas como una botella de plástico puede promover o inhibir la activación de rutas de señalización.

Además de la MEC en donde se encuentran situadas y que ellas mismas generan, la morfología celular que es también determinada de cierta forma por la MEC juega un papel importante en la identidad celular. Por ejemplo, se han identificado, a través de

análisis por microarreglos, que en células incluidas en una matriz de colágeno I varía la expresión de BMPs y de miostatina (GDF8). TGF β está involucrada en la remodelación de la MEC, realizando procesos de proteólisis y unión proteica. No solo la expresión génica puede determinar la funcionalidad celular, sino también la arquitectura el medio en el que se encuentra.²⁶

Se ha observado que al emplear matrices como colágeno o fibrina en donde las células permanecen alejadas físicamente por el material entre ellas, en contraste con otros hallazgos utilizando otro tipo de células y procesos de diferenciación, se promueve la diferenciación condrogénica de las CMMs. Se ha observado que la modificación en los componentes de los andamios que se utilizan para incluir CMMs influye tanto en la viabilidad celular como en la condrogénesis de las células.

En el trabajo realizado por el Dr. Jorge Lara Arias en 2006²⁷ se dio seguimiento a un paciente al cual se le hizo un implante con condrocitos embebidos en una matriz de fibrina humana comercial, utilizada por cirujanos en el quirófano para detener hemorragias. Mediante un análisis inmunohistoquímico después de 6 meses pos-implantación, se determinó que la inclusión de los condrocitos en ese soporte de fibrina podía proporcionar un microambiente favorable para la síntesis de MEC cartilaginosa.

²⁷

2.8 MODELOS ANIMALES

Se sabe que la regulación mecánica del cartílago es importante después del nacimiento ya que gracias a la compresión mecánica que se ejerce al momento de caminar, correr, saltar hace posible que el cartílago lleve a cabo una remodelación adicional a la prenatal y termine de madurar. Se ha observado que la condrogénesis es potenciada en CMMs incluidas en agarosa y a las que se les aplica una fuerza compresora, dependiendo de la frecuencia y duración del peso que se le aplique. Este mismo fenómeno se ha identificado en células incluidas en ácido hialurónico en donde se detectó un aumento en genes reguladores de la condrogénesis en comparación con células que no estuvieron sujetas a compresión mecánica.²⁸

Los modelos animales en investigación médica y clínica son cruciales para la generación de conocimiento en ciencia básica y aplicada que finalmente es usado en la generación de terapias para el tratamiento de padecimientos del ser humano. Aún

teniendo el diseño experimental y planeación adecuados, si no se tiene un modelo animal preciso para lo que se quiere analizar se puede obtener información errónea.

Hasta el momento hay una amplia variedad de animales que se han empleado en el desarrollo de tratamientos en ortopedia, generalmente roedores, debido a su fácil manipulación, bajo costo de adquisición y mantenimiento. Sin embargo, en ortopedia es necesario el empleo de instrumentación y técnicas quirúrgicas especiales que muchas veces son difíciles en especies tan pequeñas. Los primates no humanos representan la mejor opción en cuanto a investigación que finalmente será aplicada a humanos, pero el costo del uso de estos animales es muy alto por lo que se descarta.²⁹

Los modelos ovinos han sustituido al trabajo en perros en ortopedia. Esto se debe a sobre todo a la anatomía del hueso y articulaciones y la embriogénesis de éstos. Las ovejas son animales domésticos que pueden manejarse fácilmente. Son similares a los humanos en cuanto a la carga que ejercen sobre sus extremidades. Poseen un tamaño adecuado para muestreo y múltiples procedimientos experimentales.³⁰

CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

Los resultados de los estudios *in vitro* realizados en nuestro laboratorio sugieren que las CMMs transducidas con los factores condrogénicos IGF-1 y FGF-2, favorecen la formación de colágeno II y proteoglicanos, características de la matriz cartilaginosa. Análisis preliminares sugieren que la fibrina es un material adecuado para la construcción de un implante.

En este trabajo se propone la realización de un ensayo pre-clínico de regeneración de cartílago, utilizando un implante con los elementos ya mencionados en una lesión articular de cóndilo en un modelo ovino.

CAPÍTULO IV

OBJETIVO GENERAL

Evaluar histológicamente la regeneración de cartílago articular en un modelo de lesión de cóndilo en *Ovis aries*, inducida por un implante de CMMs autólogas derivadas de tejido adiposo modificadas genéticamente con los factores IGF-1 y FGF-2, incluidas en una matriz de fibrina humana.

CAPÍTULO V

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.-** Comparar las características histológicas de las lesiones en los tres grupos mediante el análisis estadístico de una escala de evaluación histológica.

- 2.-** Definir la composición de GAGs y colágenos en los tres grupos de tratamientos experimentales por medio de técnicas histológicas.

- 3.-** Definir los posibles efectos tóxicos debidos al empleo de vectores adenovirales en el modelo animal.

CAPÍTULO VI ESTRATEGIA GENERAL



Figura 3. Estrategia general. Lipectomía. Se extrajo tejido adiposo a partir de caja torácica de cada animal evaluado. Producción de vectores adenovirales. A la par de lo anterior, se hizo una producción de los vectores adenovirales empleados para la modificación genética de las células a emplear. Extracción de CMMs. A partir del tejido adiposo extraído, se aislaron las CMMs mediante una separación por gradientes, tomando el infranadante generado a partir de éstos. Perfil de función hepática y biometría hemática. Para evaluar citotoxicidad del vector empleado se realizaron éstas pruebas a cada uno de los borregos al momento de la lipectomía y 15 días después de la cirugía de implantación. Cultivo de CMMs. Las células se tuvieron en cultivo hasta el segundo pase, en el caso de los borregos del grupo 2; y hasta 14 días de pre-diferenciación, en el caso de los borregos del grupo 3. Transducción. Las células empleadas se modificaron genéticamente con vectores adenovirales. Micromasa. A la par del cultivo de las células, se realizó un ensayo de micromasa para evaluar el patrón de expresión de diferentes colágenos en los borregos del grupo 3. Preparación del implante. 2 horas antes de la cirugía de implantación se generaron los implantes a colocar en las lesiones, utilizando fibrina humana y las células cultivadas. Cirugía para implantación. Se realizaron lesiones de 3 mm x 4 mm a cada uno de los borregos. 4 meses de observación. En este tiempo los animales estuvieron en estabulación y pastoreo normales. Análisis histológico y de toxicidad. Pasado el tiempo de observación, se obtuvo la zona de la lesión para realizar evaluaciones macroscópicas y microscópicas.

CAPÍTULO VII MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Producción viral. Se utilizaron alícuotas de células HEK293 que existían en congelación en nitrógeno líquido a -193°C en el laboratorio (células de riñón embrionario humano, ATCC CRL-15TM. Manassas, VA). Los vectores adenovirales que se utilizaron para iniciar la producción (AdIGF1 y AdFGF2) fueron proporcionados por la Dra. C. Idalia Garza Veloz quien los construyó como parte de su tesis doctoral.

Borregos. Se hicieron tres grupos, cada uno con 7 animales, 21 en total. Los borregos que se utilizaron fueron hembras jóvenes (4-7 meses) de la raza pelibuey, con un peso inicial de alrededor de aproximadamente 17 kg.

Elaboración de implantes. Se emplearon CMMs derivadas de tejido adiposo. Para lo anterior se realizaron lipectomías a cada hembra de caja torácica y a partir del tejido adiposo obtenido se procedió a aislar las células madre.

Pruebas de citotoxicidad. Sangre y suero a partir de la yugular de cada animal.

Histoquímicas e inmunohistoquímicas. Se tomó el área de la lesión y se fraccionó en dos partes iguales. Una de estas partes se incluyó en parafina y se hicieron cortes para realizar las técnicas histológicas correspondientes.

7.2 MATERIALES Y REACTIVOS

Cultivo celular. Tanto para la producción viral como para el cultivo de las CMMs se utilizó el medio Advance Dulbecco's Modified Eagle (Invitrogen. Carlsbad, CA), suero fetal bovino (Invitrogen), tripsina al 0.25% (Invitrogen), antibiótico-antimicótico 100X (GIBCO-BRL. Grand Island, NY), L-glutamina 200mM 100X (GIBCO). Los materiales que se utilizaron para el cultivo celular fueron: botellas de cultivo de 25 cm^2 (Corning. Costar City, NY), botellas de cultivo de 75 cm^2 (Corning), botellas de cultivo de 150 cm^2 (Corning), pipetas serológicas desechables de 5, 10 y 25 mL (Corning). Para la extracción de células a partir de grasa se utilizó colagenasa I (GIBCO).

Producción viral. Se utilizaron los mismos reactivos que para el cultivo de las células madre. Para la purificación se usó cloruro de cesio (GIBCO), glicerina (Research

Organics. Cleveland, OH), Tris (Amresco), cloruro de sodio (Invitrogen), cloruro de magnesio (Invitrogen). Como material se utilizaron para la producción: scrapers (Corning), placas de 96 pozos (TPP), botellas de cultivo de 75 y 150 cm² (Corning); y para la purificación: tubos de polialómero (Beckman, Palo Alto CA), membranas de diálisis Slide-A-Lyzer 10K (Pierce. Rockford, IL).

Elaboración de implantes. Para esta parte del trabajo se utilizó el kit comercial Tissuocol™ de 2 mL (Baxter AG. Volketswil, Suiza) y placas petri de 10 cm (Corning).

Sedación, intervención quirúrgica y sacrificio de los animales. Para realizar las lipectomías se utilizó ketamina (Anesket® Vet / Pisa S.A de C.V. México DF, México). Para las cirugías se empleó nuevamente ketamina y posteriormente isoflurano (Isoba® Vet/ Schering Plough. Abbott, Francia) en una combinación con oxígeno. En el sacrificio se empleó una sobredosis de ketamina. Como tratamiento pos-operatario se administraron analgésicos (Finadyne, Schering Plough Ltd. Reino Unido) y antibiótico (Keflex, Lilly & Co. Indianapolis, Indiana). Para cerrar los abordajes se utilizaron suturas de ácido poliglicólico y nylon (3-0 VYCRIL Ethicon, Inc.; 3-0 ETHILON™ Nylon Suture, Ethicon, Inc. Somerville, NJ).

Mantenimiento de los animales. Los animales fueron puestos en estabulación y pastoreo libre en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y fueron alimentados con paca de alfalfa 30% / 70% de paca de sorgo a libre demanda.

Pruebas de toxicidad. Se utilizaron para cada borrego 2 tubos de tapa morada (BD Vacutainer® K2 EDTA 10.8 mg) para sangre total y 2 tubos de tapa roja (BD Vacutainer® Serum) para suero.

Procesamiento de muestras. Para la fijación del tejido se utilizó Formalina (Merck) y glutaraldehído al 2.5% (25% Fisher). Para la descalcificación se utilizó EDTA (Amresco), ácido fórmico (Mallinckrodt CHEMICALS. Deventer, Holanda) y ácido clorhídrico (J.T. Baker). Las muestras se incluyeron en parafina (Mc Cormick Scientific Paraplast) después de una deshidratación acetona (CTR Scientific. Monterrey, México).

Histoquímicas e inmunohistoquímicas. Para realizar las inmunohistoquímicas se realizó un desenmascaramiento de antígenos se utilizó ácido cítrico (SIGMA). Los

portaobjetos se trataron con silano al 2% (SIGMA). Se utilizó el kit de detección (Mouse & Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC Kit, Abcam). Los anticuerpos empleados fueron: anti-colágeno I (dil 1:300, ab34710), anti-colágeno II (dil 1:500, ab34712), anti-colágeno X (dil 1:500, ab58632). En las técnicas para histoquímicas se utilizaron los siguientes colorantes y ácidos: ácido pícrico (J.T. Baker), formaldehído (J.T. Baker), sulfato ferroso (CTR Scientific), rojo escarlata (Analytika), fuscina ácida (Analytika), ácido fosfomolibdico (CTR Scientific), ácido fosfotúngstico (CTR Scientific), azul de anilina (J.T. Baker), ácido acético (Jalmek), azul de toluidina (SIGMA), verde rápido (SIGMA), safranina O (SIGMA), xilol (CTR Scientific), alcohol absoluto (CTR Scientific), alcohol de 96° (CTR Scientific).

7.3 EQUIPOS

- Campana de flujo laminar (Labconco Class II type A2. México D.F., México)
- Incubadora de CO₂ Series 8000 WJ (Thermo Scientific. México D.F., México)
- Ultracentrífuga Optima L-100 XP (Beckman Coulter. Brea, CA)
- Quirófano de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
- Máquina de sedación E-Z anesthecia, (Euthanex Corp. Palmer, PA)
- Microtomo RM2235 (Leica. Buffalo Grove, IL)
- PT Module (Thermo Scientific. México D.F., México)
- Microscopio PALM Microimaging GmbH (Carl Zeiss. México D.F., México)

7.4 MÉTODOS

Descripción del diseño. Se utilizaron 21 borregos de la raza pelibuey distribuidos de la siguiente forma en 3 grupos de 7 animales cada uno:

- G1 (S-I) Borregos a los que se les practicó una lesión en el cartílago articular y no se trató de tal forma que se pudiera observar la regeneración propia del tejido.
- G2 (I-CMM) Borregos a los que en el área de la lesión se les colocó un implante con células madre mesenquimales autólogas (CMMa) extraídas de tejido adiposo.
- G3 (I-3C) Borregos a los que en el área de la lesión se les colocó un implante con CMMa modificadas genéticamente para producir los factores condrogénicos IGF-2 y FGF-2.

Cada uno de los grupos contó con una n de 7 individuos a partir del siguiente cálculo:

G1 = Control = Cartílago fibroso

G2 = CMMs = cartílago fibroso-hialino

G3 = CMMs + vector adenoviral = cartílago hialino

Hipótesis nula: $G1=G2=G3$

Hipótesis alterna: $G1 \diamond G2 \diamond G3$

Tamaño de la muestra: Tipo prevalencia

Con una proporción calculada de 86% (6/7) de encontrar cartílago hialino (G3) y una proporción calculada de 43% (3/7) de encontrar cartílago fibroso-hialino (G2) con alfa de 5% y beta de 80% y dos direcciones, se requieren 7 individuos

Estudio con una proporción

| |
|--|
| $(Za(\text{raiz}(p0(1-p0)))-Zb(\text{raiz}(p1(1-p1))))/(p0-p1))^2$ |
| Proporción 1 86 |
| Proporción 2 43 |
| Alfa p% 5 |
| Beta % 80 |
| P 1 dirección 0.025 |
| P 2 direcciones 0.050 |
| Z 1.960 |
| P 1 cola -0.421 |
| P 2 colas -0.841 |
| n = 7 |

El tratamiento que se le dio a cada uno de los animales fue asignado de forma aleatoria.

Lipectomías. 24 horas antes de extraer el tejido adiposo, los animales se sometieron a dieta. El día de la cirugía se anestesió completamente con ketamina. El área de cirugía se rasuró y desinfectó con isodine para posteriormente ser colocado un campo estéril. A partir de una incisión de alrededor de 5 cm, se obtuvo grasa subcutánea, aproximadamente 4 g. Éste tejido se colocó en un tubo estéril con buffer PBS adicionado con antibiótico y antimicótico y transportado en hielo para su procesamiento en el laboratorio.



Figura 4. Lipectomía. Se extrajo tejido adiposo a partir de caja torácica de los borregos pertenecientes a los grupos 2 y 3.

Terminado este proceso, los borregos se suturaron con polipropileno, se les roció con una solución de plata cicatrizante y se colocaron en una jaula hasta que hubiera pasado el efecto del anestésico. Posteriormente se regresaron al corral en donde se mantuvieron hasta la cirugía.

Extracción de CMMs. La grasa extraída de caja torácica de cada animal fue cortada en fragmentos pequeños sobre una placa de Petri con ayuda de un bisturí y pinzas. Éste tejido se lavó con buffer PBS mas antibiótico y antimicótico hasta eliminar la mayor cantidad posible de sangre y posteriormente se colocó en un recipiente de plástico estéril que contenía un agitador magnético. En el recipiente se añadieron 10 mL de colagenasa I al 0.1% (Anexo 1) y se colocó en agitación suave de 1 a 2 hrs dependiendo de la consistencia y cantidad del tejido. Pasado este tiempo, se agregaron 2 volúmenes de PBS y se esperó a que se formaran fases: grasa y adipocitos en la parte superior y CMMs en el infranadante. Se recuperó el infranadante y se repitió el proceso de lavado con PBS en dos ocasiones más, para recuperar la mayor cantidad de células posible. Lo recuperado fue centrifugado a 2000 rpm por 6 min, el pellet celular se lavó por centrifugación en dos ocasiones con PBS y finalmente se resuspendió en medio para CMMs (Anexo 1) para ser sembradas e incubadas a 37°C con 5% de CO₂.

Cultivo de CMMs. Las células fueron mantenidas en cultivo máximo por 2 pases antes de elaborar los implantes y hacer la cirugía de implantación para evitar una diferenciación inespecífica. Para los borregos del grupo G2 se expandieron las células hasta obtener 10 millones, para lo cual se realizaron hasta 2 pases con tripsina al

0.25%, evitando pasar de éste número de pases. Las células de los borregos del grupo G3 se expandieron y se hizo un primer pase. En el segundo pase se contaron y sembraron 3 millones de células en botellas de 75 cm², 24 hrs después se realizó el proceso de transducción (Anexo 2). Las células fueron cultivadas en DMEM adicionado con 5% de SFB por 14 días, de esta forma se fomentó la diferenciación *in vitro* de las células antes de realizar el implante. En este tiempo se realizó un pase más, ya que las células llegaron a confluencia. Las células sobrantes se congelaron.

Perfil de función hepática y biometría hemática. Para cada uno de los borregos se hicieron 2 tomas de sangre a partir de la vena yugular: al momento de la lipectomía y 15 días después de la cirugía de implantación. Esto con la finalidad de detectar variaciones en los valores normales en estas dos pruebas que pudieran deberse a eventos adversos relacionados con los vectores adenovirales con los que se modificaron las células del grupo

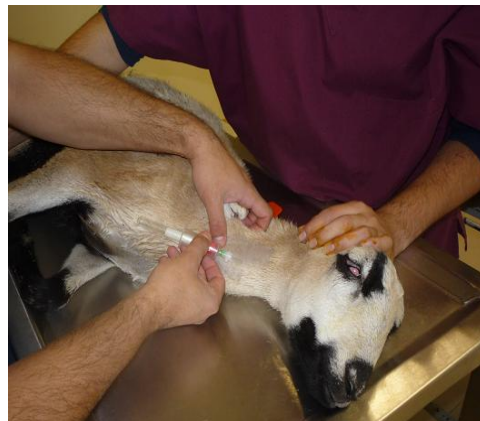


Figura 5. Toma de muestras. Se extrajeron aproximadamente 6 mL de sangre a partir de la vena yugular de cada animal.

G3. En cada toma se llenaron 2 tubos: uno de tapa morada para hacer la biometría hemática y otro más de tapa roja para separar el suero y hacer el perfil de función hepática.

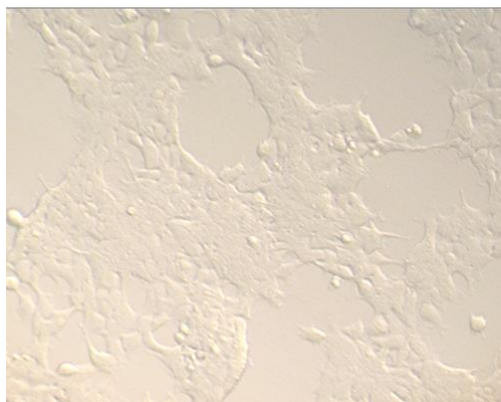


Figura 6. Células HEK 293 en cultivo. Se puede apreciar la morfología normal de las células HEK 293, un poco estrelladas y completamente adheridas a la botella de cultivo.

Producción de vectores adenovirales.

Se inició en una botella de 25 cm² con células HEK 293 a una confluencia de 80% a éstas se les removió por completo el medio en el que estaban sembradas.

A partir de una alícuota de vector purificado con anterioridad por la Dra. C. Idalia Garza Veloz se tomaron 10 µL los cuales se añadieron a un volumen de 1 mL de medio de mantenimiento (Anexo 1) que fue añadido a la botella con células.

El proceso de incubación fue de 3 h a 37°C, pasado este tiempo se añadieron 3 mL de medio de mantenimiento y se esperó por 12-18 h hasta identificar en las células el efecto citopático como se muestra en la figura de la derecha.

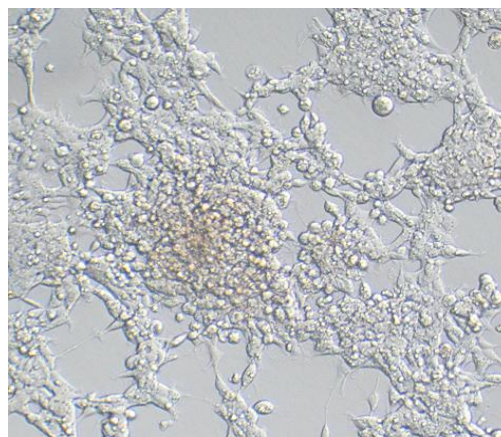


Figura 7. Efecto citopático en células HEK 293. Se observa una morfología redondeada, las células comienzan a desprenderse de la botella de cultivo.

Cuando se presentó este efecto, las células fueron desprendidas de la botella de cultivo con un scraper, colectadas en tubos de 50 mL

y congeladas a -80°C. Las células se lisaron por medio de 3 ciclos consecutivos de descongelamiento a 37°C y congelamiento a -80°C colocándolos unos segundos en agitación vigorosa antes de congelar. Para recuperar las partículas virales liberadas después de la lisis celular se llevó a cabo una centrifugación a 6000 rpm por 5 min separando así un pellet de restos celulares y partículas virales en sobrenadante. Este sobrenadante se congeló hasta ser utilizado en una nueva infección ahora de 1 botella de 75 cm². El proceso siguiente fue similar al anterior finalizando con 40 botellas de 150 cm² como se muestra a continuación:

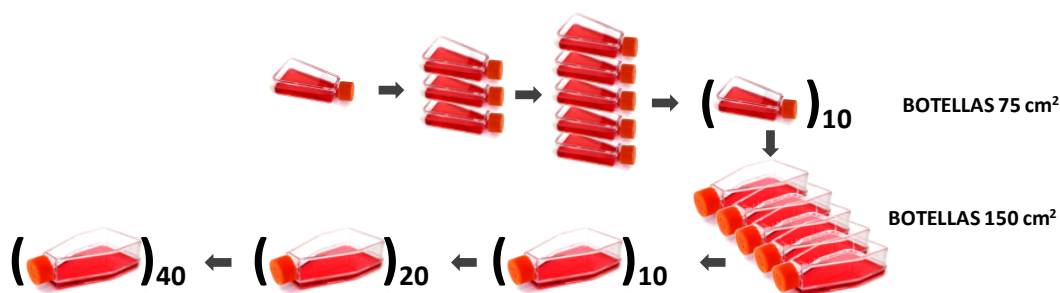


Figura 8. Esquema de producción viral. Se comienza con botellas de cultivo de baja capacidad hasta tener en cultivo 40 botellas de 150 cm², las cuales poseen células infectadas a partir de las cuales se aislarán las partículas virales de interés.

La pastilla resultante de las 40 botellas fue lisada y las partículas virales se purificaron a partir del sobrenadante a través de gradientes continuos y discontinuos de cloruro de cesio por ultracentrifugación (Anexo 2). Finalmente el volumen purificado fue

almacenado en alícuotas de 100 μL en crioviales. Se realizó una producción viral para cada uno de los vectores adenovirales (AdIGF1 y AdFGF2).

Titulación viral. Para determinar la cantidad de partículas virales infecciosas obtenidas se titularon por el método de TCID₅₀. Se sembraron placas de 96 pozos por triplicado con 3,000 células por pozo y 24 h después se realizaron diluciones seriadas del virus en medio de mantenimiento, partiendo de una alícuota de 100 μL como se muestra a continuación:

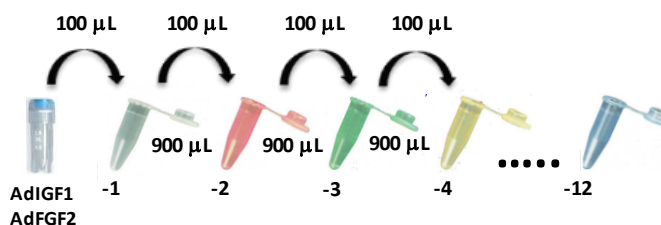


Figura 9. Diluciones seriadas de las partículas virales. Dependiendo de las bandas obtenidas a partir de la purificación viral, se hacen diluciones y se toman las últimas 8 para realizar la titulación viral.

Cada una de las placas para los dos vectores adenovirales se infectaron con las diluciones previamente preparadas, haciendo 10 repeticiones por cada una y 2 columnas de pozos control, las cuales contenían células sin transformar. En cada pozo se agregaron 100 μL de la dilución correspondiente y las dos últimas columnas se utilizaron como control negativo al solo agregarse medio de mantenimiento sin partículas virales. Después de 10 días se cuantificaron los pozos que presentaban efecto citopático y la cantidad de partículas virales infecciosas se calculó como sigue:

$$\text{Prom. conteo IGF1} = 9.6 \quad 1 \times 10^{9.6-0.7} = 1 \times 10^{8.9} \quad 1 \times 10^{8.9+1} = 1 \times 10^{9.9} \quad \text{antilog } 9.9 \\ = 7'943'282,347$$

$$\text{Prom. conteo FGF2} = 9.05 \quad \frac{\text{IGF1} = 7.94 \times 10^9 \text{ PFU/mL}}{1 \times 10^{9.05-0.7} = 1 \times 10^{8.35}} \quad 1 \times 10^{8.35+1} = 1 \times 10^{9.35} \quad \text{antilog } 9.35 = 2'238'721,139$$

$$\underline{\underline{\text{FGF2} = 2.2 \times 10^9 \text{ PFU/mL}}}$$

Transducción. Las células de los borregos del grupo G3 fueron transducidas con los dos vectores adenovirales producidos. Las transducciones fueron llevadas a cabo a 50 MOI para cada uno de los vectores. 24 h antes se sembraron 3 millones de células en botellas de 75 cm^2 . Después de este tiempo se retiró el medio para CMMs y se añadieron 3 mL del mismo medio con la cantidad de partículas virales necesarias. Éste número se determinó de la siguiente manera:

3'000,000 céls x 50 partículas virales = 150'000,000 para cada uno de los vectores (IGF1, FGF2)

IGF1 $1000 \mu\text{L} - \frac{7.94 \times 10^9 \text{ PFU/ml}}{1.5 \times 10^8} = \underline{18.88 \mu\text{L}}$ de una alícuota del virus

FGF2 $1000 \mu\text{L} - \frac{2.2 \times 10^9 \text{ PFU/ml}}{1.5 \times 10^8} = \underline{68.18 \mu\text{L}}$ de una alícuota del virus

Las células fueron incubadas con los virus por 3 h a 37°C y posteriormente se adicionaron 6 mL de medio para CMMs. Se mantuvieron en cultivo por 14 días y al llegar a confluencia durante este tiempo se hizo un pase más, es así como al final del periodo de diferenciación *in vitro* se obtuvieron 11 millones de células para realizar los implantes.

Micromasa. De forma paralela se realizó un ensayo generando micromasas celulares. Se transdujeron 500 mil células de cada uno de los borregos del grupo G3 de la misma forma en la que se hicieron con las células que se utilizaron en los implantes. Después de 2 días de incubación a 37°C y 5% de CO², las células fueron desprendidas de las botellas de cultivo con tripsina al 0.25%, colectadas en tubos de 15 mL y centrifugadas a 2000 rpm por 6 min. Se retiró el medio con tripsina y se sustituyó por 5 mL del medio para CMMs nuevo. Los tubos de 15 mL se incubaron por 14 días a 37°C con la tapa desenroscada para permitir el intercambio de gases. Cada 4 días se retiraban 3 mL del medio y se sustituía con medio nuevo. Finalmente se formaron esferas de células que fueron extraídas de los tubos, deshidratadas y embebidas en parafina para ensayos de inmunohistoquímica, esto con la finalidad de apreciar la diferenciación de las células a través de la producción de colágenos y así poder visualizar a las células en el estado en el que son implantadas en los borregos. Éste ensayo se realizó por triplicado.

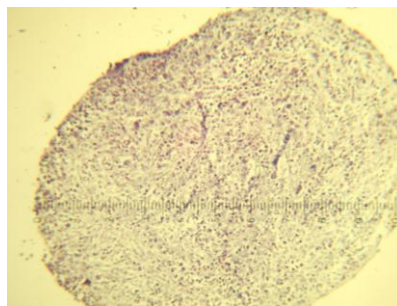


Figura 10. Micromasa celular. Tamaño y forma de las micromasas que se realizaron (200µm)

Preparación del implante. Concluido el período de cultivo para las células de los grupos G2 y G3 éstas fueron despegadas de las botellas de cultivo con tripsina al 0.25%. La tripsina fue eliminada por completo después de una centrifugación a 2000 rpm por 6 min. Las células fueron contadas para utilizar 11 millones por implante. Después de retirar por completo el medio en el que se resuspendieron para ser contadas se les añadió 300 μ L de la solución de trombina del kit de Tissucol®. Este volumen se aspiró con una jeringa para insulina de 1 mL. A la par se preparó otra jeringa con la solución de Tissucol del kit. Las dos jeringas se colocaron en el adaptador que contiene el kit y se virtió una mezcla de estos dos componentes en una placa de Petri formando un rectángulo de aproximadamente 2 x 3 cm. Después de esperar unos minutos a que la mezcla formara un coágulo firme se fraccionó en 6 rectángulos más pequeños con la ayuda de un bisturí y estos fueron colocados en un tubo de 50 mL con medio para CMMs y en refrigeración para ser transportados al quirófano. Estos pasos se repitieron para cada uno de los borregos. Todos los implantes fueron preparados en el laboratorio inmediatamente antes de realizar las cirugías de implantación.

Cirugía para implantación. Los animales se prepararon inicialmente mediante un proceso pre-anestésico administrando ketamina (1 mL por cada 10 kg) y posteriormente xilazina (0.5 mL por cada 1 kg). Una vez sedado se procedió a intubar con laringoscopio y sonda intratraqueal del calibre adecuado dependiendo del borrego. Una vez intubado, se conectó a través de la sonda para administrar 5% de isoflurano inicial y continuar la cirugía con 1% y 2% de oxígeno. Se hizo un abordaje parapatelar medial a la cápsula articular en la pata posterior derecha para exponer el cóndilo medial. Se ubicó la tuberosidad de la tibia y posteriormente la rótula para hacer una incisión recta por la línea media. Se continuó hacia abajo, permitiendo la visualización del tendón del cuádriceps, la rótula y el ligamento rotuliano. Usando una disección afilada, cuidadosamente se separó la expansión del cuádriceps, dividiendo el panículo adiposo infrapatelar para dislocar la rótula lateralmente y exponer el cóndilo medial. Éste se limpió con una gasa estéril y con la ayuda de un bisturí se realizó una lesión rectangular (4 mm x 6 mm). Se removió el tejido cartilaginoso hasta llegar a hueso subcondral. Dependiendo del grupo experimental al que pertenecía el borrego intervenido, se suturó inmediatamente o se adhirió el implante correspondiente con Tissucol®, para ésto se moldeó el implante considerando la forma de la lesión. Se

realizaron 3 suturas, 2 internas con ácido poliglicólico (cápsula sinovial, músculo y tendones) y una externa con nylon o polipropileno (piel).

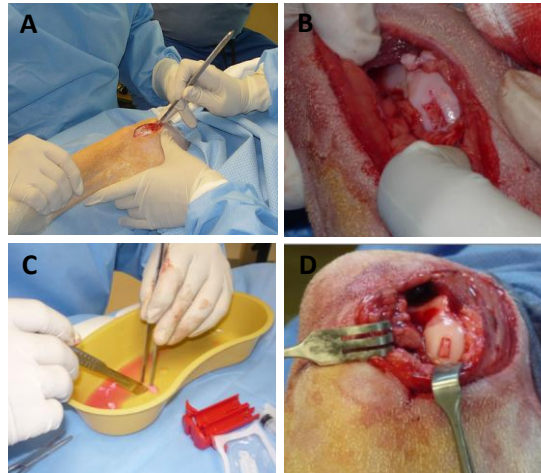


Figura 11. Intervención quirúrgica. A. Abordaje. B. Lesión en cóndilo medial. C. Moldeado del implante. D. Colocación del implante.

4 meses de observación. En este periodo de tiempo los borregos fueron mantenidos en corrales en estabulación y pastoreo libre, procurando que tuvieran en movimiento la pata posterior derecha para que de esta forma se llevara a cabo la regeneración del cartílago lesionado. Después de este tiempo de observación se sacrificaron administrándoles una sobredosis de ketamina (60 mg / kg) y se fotografiaron las lesiones tratadas de la rodilla para análisis macroscópico. Con un serrucho se removió el área de la lesión y el cartílago sano contiguo para análisis. Los tejidos se colocaron en un fijador constituido por formalina al 10% y glutaraldehído al 2.5% en igual proporción.



Figura 12. Estabulación de borregos. Los animales se mantuvieron en corrales de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en pastoreo y estabulación libres.

Procesamiento de muestras. Los tejidos se dejaron en fijador por 4 días y posteriormente se colocaron por 5 días en EDTA al 15%, 10 volúmenes más que el tamaño del tejido para iniciar el proceso de descalcificación del hueso subcondral. Posteriormente se colocaron en ácido fórmico al 10% por 5 días y finalmente en ácido clorhídrico al 2.5% por 2 días más. Durante este proceso se monitoreó la dureza al tacto del tejido. Pasado este proceso, el tejido fue deshidratado con acetonas graduales y xilol y embebido en parafina para hacer cortes con microtomo (Anexo 2).

Pruebas histoquímicas e inmunohistoquímicas. En cada una de las muestras se realizó un corte fraccionándolas a la mitad para realizar los cortes, comenzando por el medio de la lesión. Incluyendo el control (cartílago sano), se realizaron tres técnicas de tinción y tres inmunotinciones: Tricrómico de Masson (morfología celular, matriz amorfa, colágenas), azul de toluidina (mucopolisacáridos), safranina O/verde rápido (GAGs y colágenas). Para las inmunohistoquímicas se realizó un pretratamiento de las muestras en buffer de citratos pH 6 (Anexo 1). Éste consistió en un precalentamiento a 65°C y posteriormente una incubación a 85°C por 20 minutos. Las inmunohistoquímicas que se realizaron fueron las siguientes: para colágeno I (tejido fibroso, hueso), II (cartílago hialino) y X (condrocitos hipertróficos) (Anexo 2).

Evaluación histológica. Ésta se hizo considerando los parámetros de una escala utilizada a nivel internacional para evaluar integridad tisular, la escala O'Driscoll (Anexo 3). Se realizaron observaciones por parte de 3 observadores diferentes. Con los datos se realizó una prueba U de Mann-Whitney con el programa SPSS.

CAPÍTULO VIII RESULTADOS

8.1 PERFILES DE FUNCIÓN HEPÁTICA Y BIOMETRÍAS HEMÁTICAS COMPLETAS.

Se realizaron perfiles de función hepática y biometrías hemáticas para cada uno de los borregos al momento de realizar las biopsias de tejido adiposo y 15 días después de las cirugías de implantación. La finalidad de estos análisis fue determinar posibles efectos citotóxicos derivados del empleo de vectores adenovirales para la transducción de las células que se emplearon en los implantes de los borregos del grupo 3. Para cada grupo se hizo un promedio y desviación estándar de los resultados de los 7 animales para cada rasgo medido antes y después de la cirugía de implantación.

Tabla 2. Perfiles de función hepática y biometrías hemáticas de borregos

| | GRUPO 1 (S-I) | | GRUPO 2 (CMM) | | GRUPO 3 (I-3C) | | REFEREN CIA |
|------------------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------------|
| | PRE- CIRUGÍA | POS- CIRUGÍA | PRE- CIRUGÍA | POS- CIRUGÍA | PRE- CIRUGÍA | POS- CIRUGÍA | |
| LEUCOCITOS | 9.68 ± 0.22 | 8.92 ± 0.25 | 8.27 ± 0.20 | 8.04 ± 0.20 | 7.50 ± 0.40 | 9.04 ± 0.33 | 4-11 10 ³ /μL |
| HB | 11.07 ± 0.13 | 10.57 ± 0.15 | 10.86 ± 0.13 | 10.97 ± 0.13 | 10.83 ± 0.22 | 11.70 ± 0.23 | 10-14 g/L |
| PLAQUE- TAS | 609.34 ± 0.32 | 484.06 ± 0.52 | 483.11 ± 0.36 | 517.01 ± 0.47 | 513.96 ± 0.57 | 490.97 ± 0.59 | 250-750 mL |
| P. TOTALES | 6.61 ± 0.05 | 6.56 ± 0.04 | 6.19 ± 0.07 | 8.04 ± 0.20 | 5.97 ± 0.08 | 6.54 ± 0.11 | 5.4-7.8 g/dL |
| ALBÚMINA | 3.14 ± 0.18 | 2.96 ± 0.17 | 3.11 ± 0.15 | 3.39 ± 0.08 | 3.23 ± 0.12 | 3.36 ± 0.14 | 2.7-3.7 g/dL |
| GLOBULI NA | 3.47 ± 0.20 | 3.54 ± 0.14 | 3.06 ± 0.08 | 2.99 ± 0.11 | 2.73 ± 0.18 | 3.19 ± 0.19 | 3.5-5.7 g/dL |
| ALT | 14.86 ± 0.35 | 19.57 ± 0.28 | 13.29 ± 0.44 | 17.57 ± 0.12 | 16.57 ± 0.37 | 17.57 ± 0.12 | 5-34 U/L |
| AST | 161.00 ± 0.86 | 148.71 ± 0.37 | 100.71 ± 0.25 | 123.57 ± 0.30 | 112.71 ± 0.19 | 133.86 ± 0.49 | 49-123.3 U/L |
| BILIRRUBI NA TOTAL | 0.18 ± 0.53 | 0.03 ± 0.0 | 0.17 ± 0.35 | 0.05 ± 0.0 | 0.17 ± 0.35 | 0.05 ± 0.0 | 0.0-0.5 mg/Dl |
| BILIRRUBI NA DIRECTA | 0.04 ± 0.0 | 0.01 ± 0.0 | 0.04 ± 0.0 | 0.01 ± 0.0 | 0.04 ± 0.0 | 0.01 ± 0.0 | 0.0-0.2 mg/dL |
| BILIRRUBI NA INDIRECTA | 0.14 ± 0.51 | 0.02 ± 0.0 | 0.12 ± 0.0 | 0.05 ± 0.0 | 0.12 ± 0.0 | 0.05 ± 0.0 | 0.0-1.0 mg/dL |
| FOSFATA- SA ALCALINA | 278.71 ± 0.85 | 300.29 ± 0.50 | 185.29 ± 0.52 | 277.71 ± 0.35 | 185.29 ± 0.52 | 277.71 ± 0.35 | 68-387 U/L |
| GGT | 60.00 ± 0.15 | 64.00 ± 0.18 | 49.29 ± 0.23 | 57.43 ± 0.14 | 49.29 ± 0.23 | 57.43 ± 0.14 | 30-60 U/L |

En ninguno de los resultados evaluados se encontró una alteración importante con respecto a los valores de referencia para borregos, lo cual indica que no se presentó toxicidad por los vectores adenovirales.

8.2 ESTUDIOS *IN VITRO*. ENSAYOS DE MICROMASAS

A la par de los cultivos en monocapa en pre-diferenciación por 14 días para la generación de implantes para los borregos del grupo 3, se hizo un ensayo de micromasa. Se tomaron 500,000 células transducidas de cada uno de los borregos y se hizo un cultivo en conglomerados celulares. Al igual que las células en monocapa, las micromasas se mantuvieron en cultivo por 14 días. Pasado este tiempo se fijaron, deshidrataron, incluyeron en parafina y se les hicieron cortes para la detección por inmunohistoquímica de colágenos I, II y X.

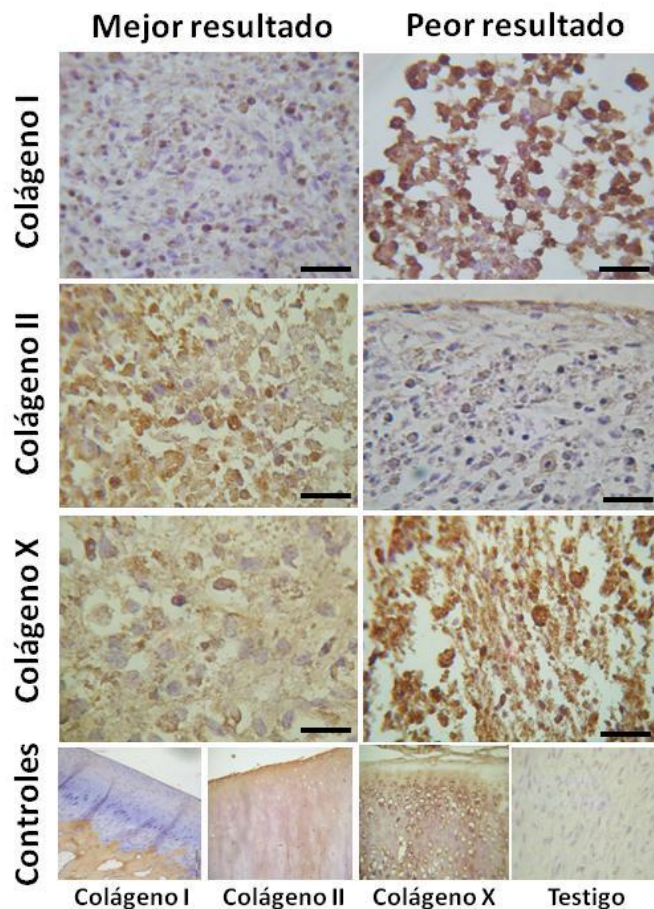


Figura 13. Micromasas. Controles: colágeno I cóndilo sano de borrego adulto; colágeno II cóndilo sano de borrego adulto; colágeno X tráquea de gato. Testigo: inmunohistoquímica de micromasa sin anticuerpo primario. De los 7 borregos pertenecientes al grupo 3 se identificaron los que presentaron mejores resultados y resultados desfavorables. Entendiéndose como mejores resultados alta expresión de colágeno II y baja de colágeno I y X; y como peores baja expresión de colágeno II y alta de I y X. Barra = 80 μ m.

Se consideró como mejor resultado aquel en donde colágeno I y X fueron escasos y colágeno II abundante. Los peores casos los constituirían micromasas en donde colágeno I y X fueran altos y colágeno II escaso. De acuerdo a la cantidad de micromasas que presentaron buenos o malos resultados por tipo de colágeno detectado, se observó lo siguiente:

Tabla 3. Número de borregos por resultado

| | Mejores resultados | Peores resultados |
|--------------------|--------------------|-------------------|
| COLÁGENO I | 1 de 7 | 4 de 7 |
| COLÁGENO II | 3 de 7 | 2 de 7 |
| COLÁGENO X | 2 de 7 | 3 de 7 |

Como panorama general, se observó variabilidad en los resultados ya que los tres tipos de colágeno se producen de forma indistinta en los 7 borregos, siendo colágeno I la de expresión más elevada, seguido por colágeno II. Estos resultados concuerdan con lo reportado anteriormente para condrogénesis *in vitro*.

8.3.1 ESTUDIOS *IN VIVO*. ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES

Después de 4 meses de estabulación normal en la que los animales no presentaron anomalía alguna relacionada con la marcha, ni signos de inflamación o fiebre, los borregos fueron sacrificados para obtener el cóndilo en donde se había practicado la lesión a evaluar. Macroscópicamente se encontraron diferencias en el grado de reparación de las lesiones entre grupos. En la mayoría de los casos las lesiones no fueron cubiertas por tejido nuevo. Hubo casos de cobertura total y parcial.

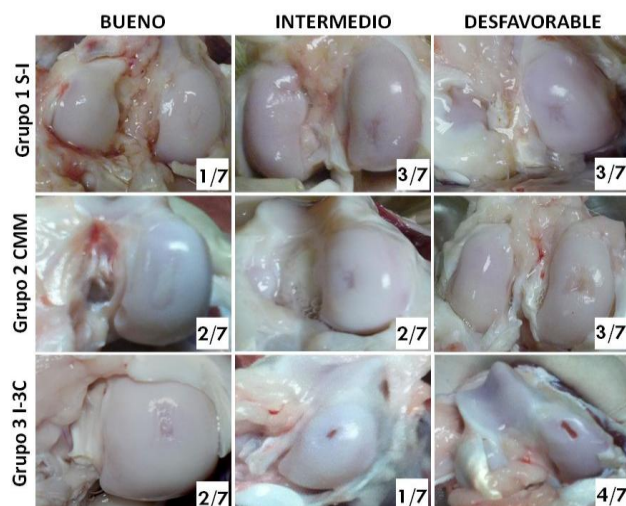


Figura 14. Fotos de lesiones al momento del sacrificio. Los números en la esquina inferior derecha indican el número de resultados en cada grupo evaluado. Se observan los cóndilos mediales derecho.

Se encontró una lesión aparentemente reparada en el grupo 1. El grupo 2 fue el que presentó un mayor número de lesiones completamente cubiertas; sin embargo, el análisis microscópico muestra fibrosis en el tejido neoformado. En el grupo 3 se encontraron 2 lesiones parcialmente cubiertas, las cuales microscópicamente están compuestas por una mezcla de tejidos en transición.

En las lesiones del grupo 1 se identificaba un proceso natural de regeneración derivado del cartílago sano adyacente, aparentemente este tejido comenzó a cubrir el área de la lesión de una forma acelerada. En el grupo 2 se encontraron perforaciones muy evidentes en comparación con el grupo 1 y en el grupo 3 al igual que en el grupo 2 se encontraron lesiones todavía en reparación temprana.

8.3.2 ESTUDIOS *IN VIVO*. HISTOQUÍMICAS.

El área de la lesión se seccionó tomando tejido sano adyacente y hueso subcondral para realizar una comparación y la evaluación de la integración del implante en los casos de los borregos del grupo 2 y 3. Este tejido se empleó para realizar una evaluación histoquímica que consistió de tres técnicas.

En una muestra de cartílago sano la técnica de Tricrómico de Masson permite apreciar en color azul brillante la matriz cartilaginosa compuesta de colágenos y mucinas. En rojo evidencia a la matriz ósea. Permite también identificar morfología celular.

La técnica de azul de toluidina es ampliamente utilizada para el análisis de cartílago ya que presenta un efecto de metacromasia debida a los grupos sulfatos que se encuentran en los proteoglicanos del tejido, dando una coloración violeta. En nuestro caso se empleó para realizar una evaluación a través de la escala O'Driscoll.

La técnica que emplea safranina O y verde rápido permite identificar la producción de GAGs mediante una coloración roja y en color verde pálido a los colágenos, sin distinguir entre tipos de colágenos.

8.3.2.1 ESTUDIOS IN VIVO. HISTOQUÍMICAS: COMPOSICIÓN DEL TEJIDO Y MORFOLOGÍA CELULAR.

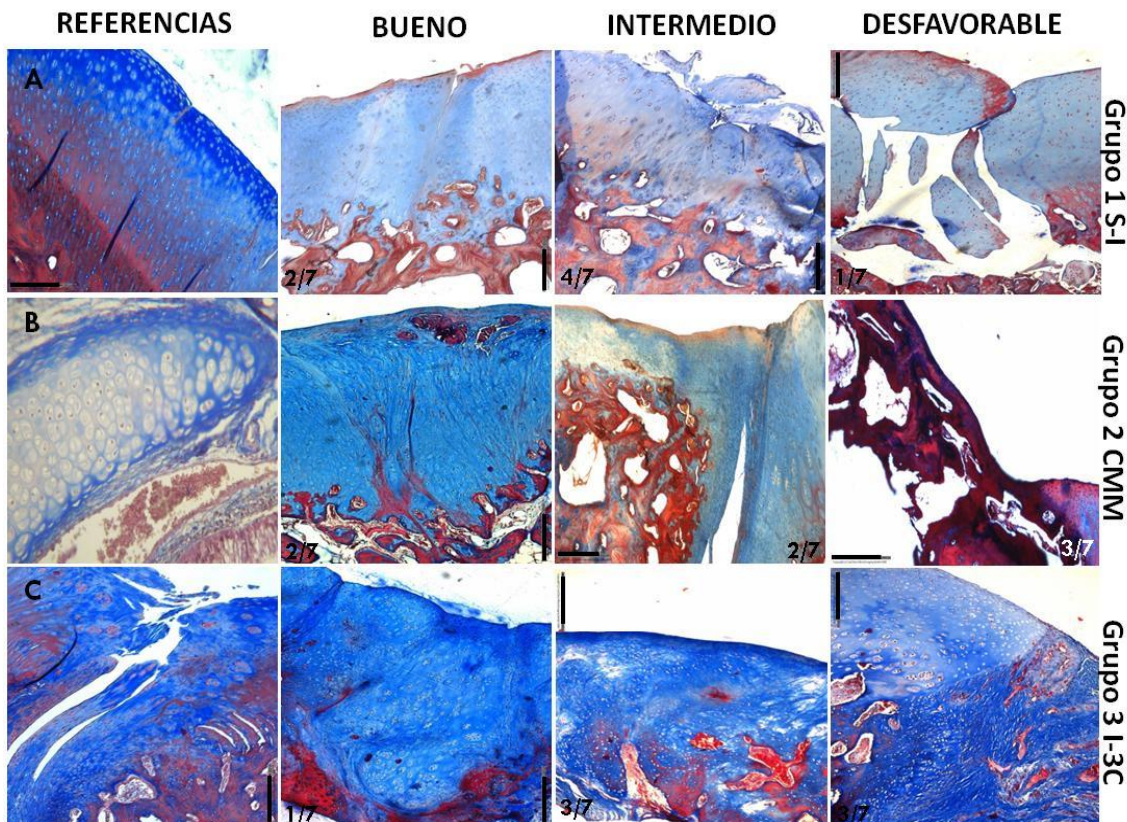


Figura 15. Tricrómico de Masson. Referencias: A) Cóndilo de borrego sano, 5 años; B) Tráquea de gato; C) Lesión osteoartrótica practicada en 1 un borrego de 5 años. Se muestra en azul brillante la matriz cartilaginosa y en rojo la matriz ósea. Barra de escala = 300 μ m. Objetivo 5x.

Comparando con las referencias, se puede apreciar que en los borregos del grupo 1 la tinción con azul de anilina, que es el colorante que tiñe la matriz del cartílago, se encuentra disminuida. Hay una disminución en la densidad celular y presencia de grupos de condrocitos que son característicos de procesos regenerativos y de fibrosis. El área del cartílago se ve disminuida y en los casos intermedios y desfavorables se encuentra el tejido interrumpido por completo o con fisuras. Algo que es de notarse, es la tinción roja en la superficie que denota fibrosis y probable calcificación, esto aumenta dependiendo del grado de desintegración del tejido.

En el caso del grupo 2 se encuentra al igual que en el grupo 1, una notable disminución del área del cartílago y aumento del área del hueso subcondral. Fue en este grupo que se presentaron un mayor número de lesiones completamente reparadas. Sin embargo,

se observó tinción roja en la superficie del tejido formado y un acercamiento a estas zonas demuestra lo siguiente:

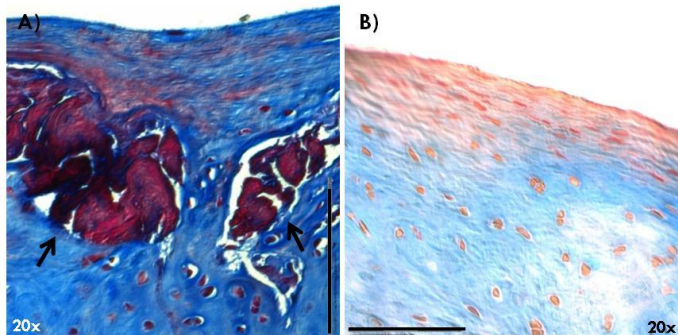


Figura 16. Ampliación de superficie en casos mejor e intermedio del grupo 2. A) Área superficial del mejor caso. B) Área superficial del caso intermedio encontrado en el grupo 2. Las flechas indican áreas de calcificación. En la imagen B observamos tinción roja que sugiere fibrosis. Barra de escala = 150 μm .

Tinción roja en la parte superficial que denota fibrosis. Las células presentan una morfología espiculada, se trata de fibroblastos y en el mejor de los casos se encontraron zonas con una notable calcificación. El tejido formado es principalmente fibroso, con una alta densidad celular entre las que hay fibroblastos y lo que parecen ser osteoblastos.

En el grupo 3 se observan características muy peculiares. Toda el área de la lesión fue cubierta por una mezcla de tejidos en aparente transición en donde se pueden identificar: tejido mesenquimatoso no diferenciado, cartílago hialino, tejido óseo y fibrosis. Otro hallazgo relevante es la formación de vasos sanguíneos a lo largo de las lesiones.

En la imagen de la izquierda se pueden apreciar las áreas de transición en la lesión. Al parecer el tejido neoforado se encontraba en una organización temprana ya que se puede identificar la formación de hueso y de cartílago. Se pudieron detectar restos de fibrina en algunas lesiones lo que nos indica

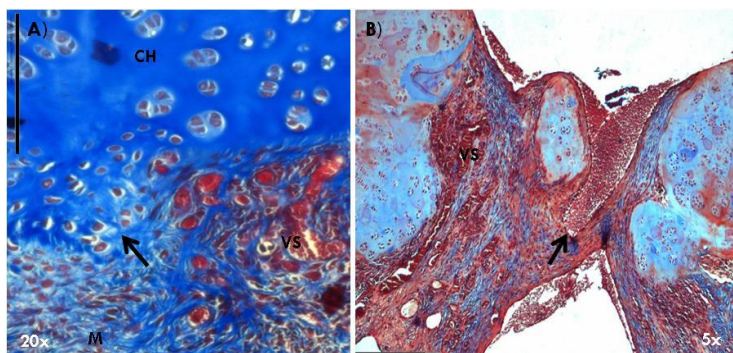


Figura 17. Zonas de transición en áreas de lesión de borregos del grupo 3. A) Zonas de transición en el mejor de los casos encontrado en grupo 3. Se aprecia una mezcla de tejidos. B) En el borrego 11 se puede detectar fibrina perteneciente al implante. CH=cartílago hialino; M=mesénquima no diferenciada; VS=vasos sanguíneos. La flecha en la imagen A) indica osteoblastos. La flecha en imagen B) señala resto de fibrina. Barra en A) = 150 μm , barra en B) = 300 μm .

que este material se perdió y se comenzó a reemplazar por tejido fibroso y una mezcla de tejidos. En el grupo 3 se puede observar una alta fibrosis y densidad celular. Es evidente el efecto de la inducción de las células por parte de los factores con los que se modificaron.

8.3.2.2 ESTUDIOS IN VIVO. HISTOQUÍMICAS: DETECCIÓN DE PRODUCCIÓN DE GLUCOSAMINOGLICANOS Y COLÁGENOS.

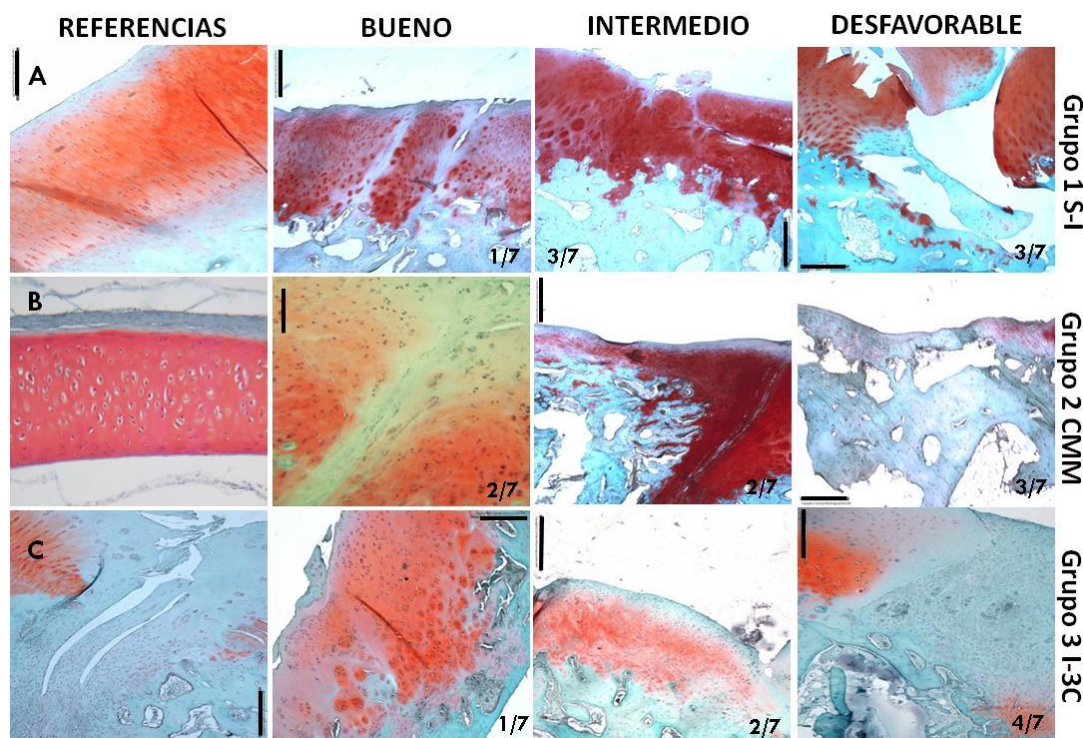


Figura 18. Safranina O/verde rápido. En rojo se pueden apreciar zonas activas de producción de glucosaminoglicanos. En verde pálido se pueden detectar áreas de producción de colágenos. Referencias: A) Cóndilo de borrego sano, 5 años; B) Tráquea de gato; C) Lesión osteoartrótica practicada en 1 un borrego de 5 años. Barra de escala = 300 μ m. Objetivo 5x.

Como se observó en tricrómico de Masson, en esta tinción se aprecia nuevamente en el grupo 1 una disminución en la tinción con safranina O en la matriz debida a la disminución de la densidad celular. Aunado a esto, en las zonas de fisuras e interrupción del tejido, la tinción con verde rápido es mayor debido a la fibrosis presente en estas áreas.

En el caso del grupo 2 se puede identificar en los límites de la lesión, una activa producción de GAGs debido a la intensa coloración roja de esa zona. Sin embargo, a lo

largo de la lesión se observan áreas dispersas de tinción con este colorante. Se observa una notable tinción verde en áreas de fibrocartilago y una ausencia de coloración roja en estas zonas, haciendo un acercamiento se puede observar una agregación de condrocitos que no producen GAGs. El desgasta del cartílago se hace más evidente en los casos desfavorables de éste grupo con esta técnica.

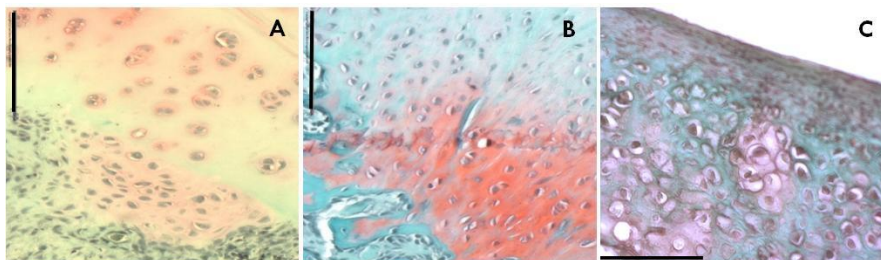


Figura 19. Ampliación de zonas de transición en grupo 3 y fibrocartilago en grupo 2. A) Zona de transición en el mejor de los casos del grupo 3. B) Zona de transición caso desfavorable del grupo 3, en éste al igual que en el anterior, se detectan zonas de producción de GAGs. C) Fibrocartilago en caso intermedio del grupo 2, es notoria la ausencia de tinción con safranina O. Barra de escala = 150 μ m. Objetivo 20x.

En el caso del grupo 3, en contraste con lo que se esperaba, se pueden identificar zonas de producción de GAGs. Comparando con los controles, la arquitectura del tejido y el patrón de tinción con esta técnica en el mejor de los casos, se puede ver que es similar. En uno de los casos desfavorables de este grupo encontramos una fibrosis muy alta con presencia de neovascularización. Sin embargo, como es característico de las lesiones de este grupo, hay lagunas de producción de GAGs dispersas a lo largo de la lesión. Las células que morfológicamente parecen osteoblastos o condroblastos, se encuentran produciendo activamente GAGs, esto se puede observar en la micrografía B de la figura 17. Lo anterior es un indicio de que esta mezcla de tejidos se encontraba en un proceso de organización y maduración.

8.3.3 ESTUDIOS *IN VIVO*. INMUNOHISTOQUÍMICAS.

Mediante los análisis histoquímicos se puede identificar la arquitectura del tejido, morfología y por lo tanto, la naturaleza de las células que lo componen. Una parte importante de la regeneración de éste tejido, además de la composición en cuanto a proteoglicanos, es la producción de colágenos. En el cartílago hialino el principal componente proteico es el colágeno tipo II. La presencia de colágeno I denotaría

fibrosis y la presencia elevada de colágeno X, hipertrofia de los condrocitos. Es por esto que es necesario el análisis de la expresión de estas tres proteínas en el proceso regenerativo de las lesiones.

8.3.3.1 ESTUDIOS IN VIVO. PRODUCCIÓN DE COLÁGENO I.

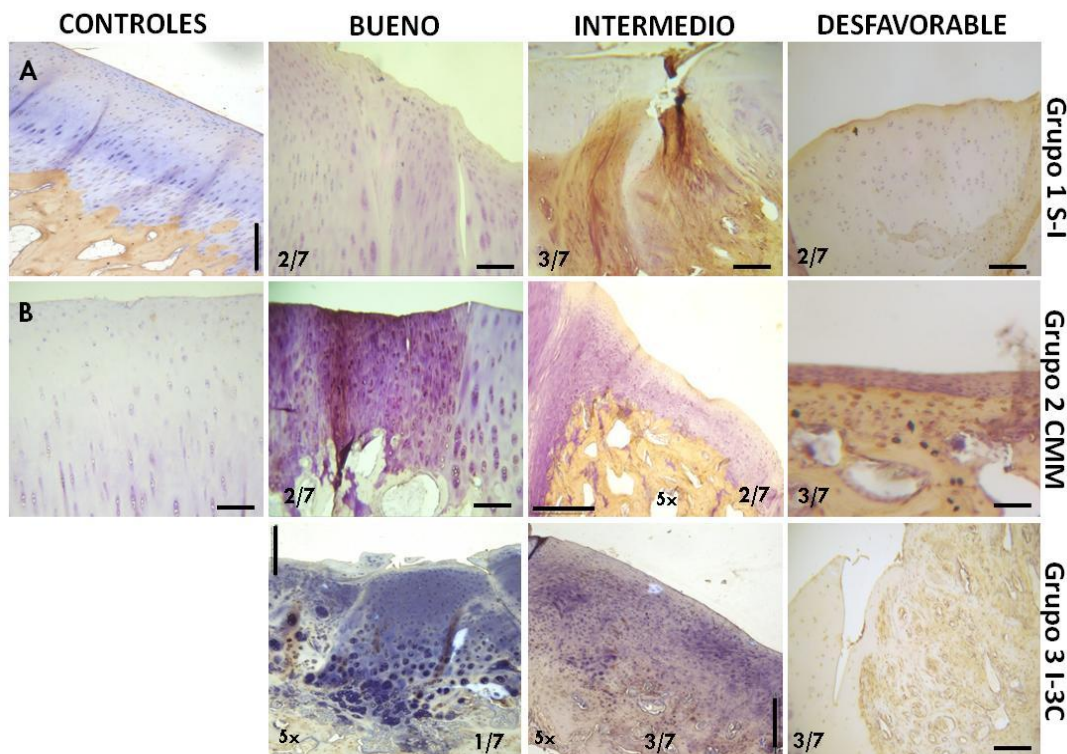


Figura 20. Inmunohistoquímica para colágeno I. La detección de producción de esta proteína se realizó mediante la identificación de diaminobenzidina, la contrateñida se realizó con hematoxilina. Referencias: A) Cónido de borrego sano, 5 años; B) Testigo. Barra de escala 5x = 300 μ m; barra de escala 10x = 40 μ m. Objetivo 10x.

Comparando con el control, el grupo 1 presenta según lo esperado señal para colágeno I ya que su producción es parte del proceso natural de cicatrización de una lesión en cartílago. En los casos intermedio y desfavorable es más notable la producción de esta proteína.

En el grupo 2 se encontró una importante producción de colágeno I en todos los casos, sobre todo en áreas en donde mediante las histoquímicas se mostraba fibrosis, en los límites de la lesión, en áreas de fisuras y en zonas de fibrocartílago, en comparación con los otros dos grupos, el grupo 2 presentó una producción más alta de esta proteína.

En el caso del grupo 3 se presenta la presencia de esta proteína como se esperaba de acuerdo a lo detectado con las histoquímicas. En el mejor de los casos se observa muy poca producción de colágeno I, aunque es mayor en comparación con el grupo 1.

8.3.3.2 ESTUDIOS IN VIVO. PRODUCCIÓN DE COLÁGENO II.

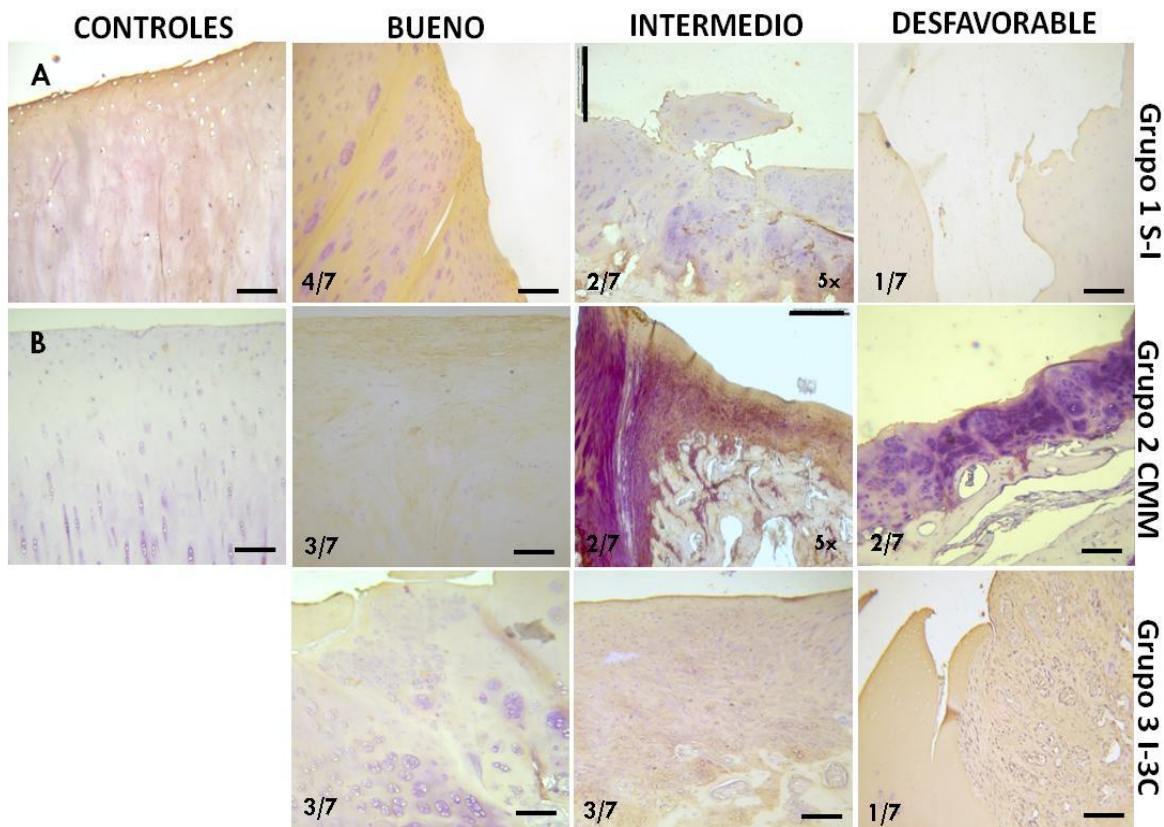


Figura 21. Inmunohistoquímica para colágeno II. Referencias: A) Córdilo de borrego sano, 5 años; B) Testigo. Barra de escala 5x = 300 μ m; barra de escala 10x = 40 μ m. Objetivo 10x.

En el grupo 1 se puede observar un patrón de tinción similar al control, sin embargo en los casos más desfavorables la señal para colágeno II disminuye considerablemente, aunque es aún perceptible.

En el grupo 2 vemos como en todos los casos se detecta la expresión de colágeno II, aún en las áreas de fibrosis, disminuyendo en los casos más desfavorables.

En el caso del grupo 3, contrario a lo que se esperaba, en todas las lesiones se presentó la producción de colágeno II, no tan notoria como en los otros dos grupos pero relevante considerando la fibrosis y mezcla de tejido encontrados en los análisis histoquímicos.

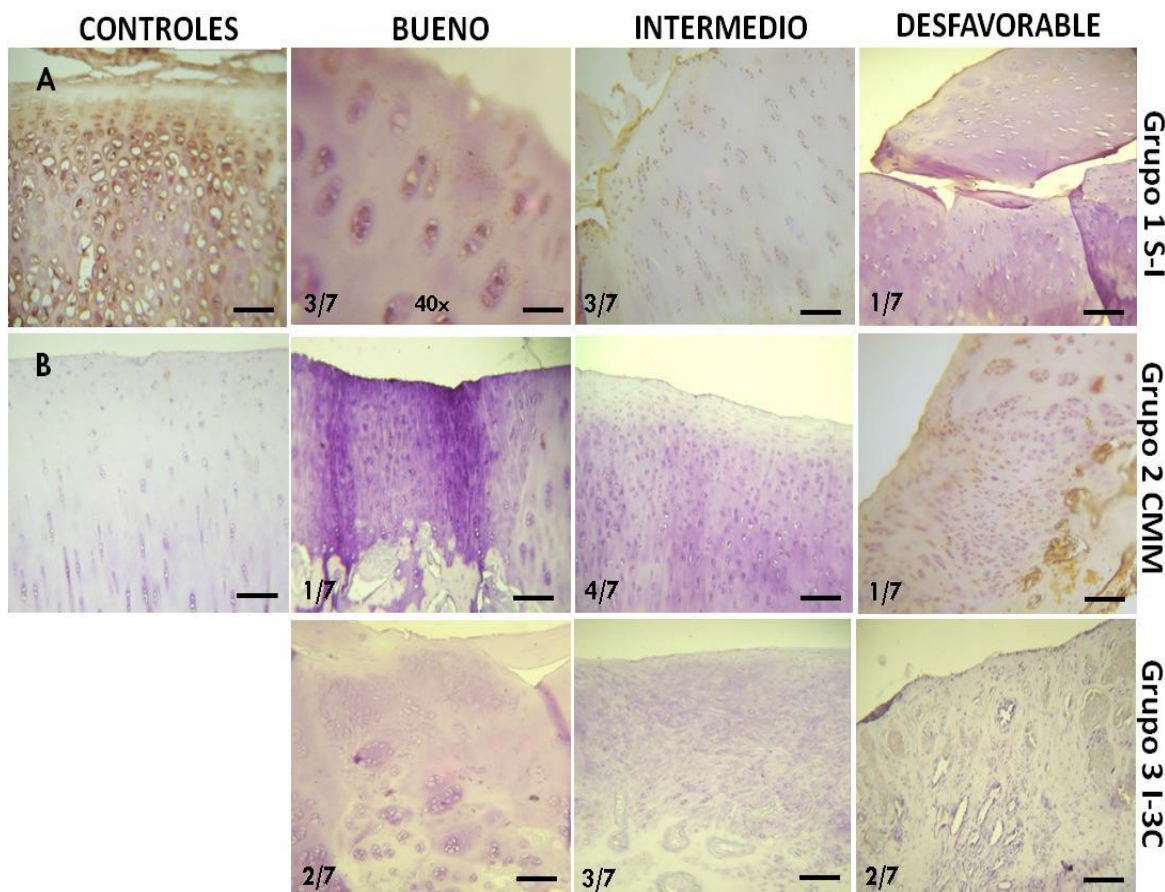
8.3.3.3 ESTUDIOS *IN VIVO*. PRODUCCIÓN DE COLÁGENO X.

Figura 22. Inmunohistoquímica para colágeno X. Referencias: A) Tráquea de gato; B) Testigo. Barra de escala 40x = 20 μ m; barra de escala 10x = 40 μ m. Objetivo 10x.

La producción de colágeno X para los tres grupos fue en general baja. Se encontró intracelular, en superficie y en áreas del hueso subcondral. Solo algunos casos mostraron expresión importante de esta proteína, sobre todo en el grupo 2. En el grupo 3 no se encontró expresión de colágeno X.

8.3.4 ESTUDIOS *IN VIVO*. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA, ESCALA O'DRISCOLL.

El objetivo final de una terapia de reemplazo para cartílago es la reestructuración de la arquitectura del tejido. Existen diferentes escalas de evaluación histológica para determinar la naturaleza del tejido formado y el efecto del implante colocado en la articulación. Una de las que se establecieron primero fue la Escala O'Driscoll. Ésta evalúa nueve rasgos del cartílago tratado valorándolos con un puntaje que va del 0 al 2 o al 3, siendo 0 el peor resultado y 2 o 3 un tejido similar al cartílago hialino.

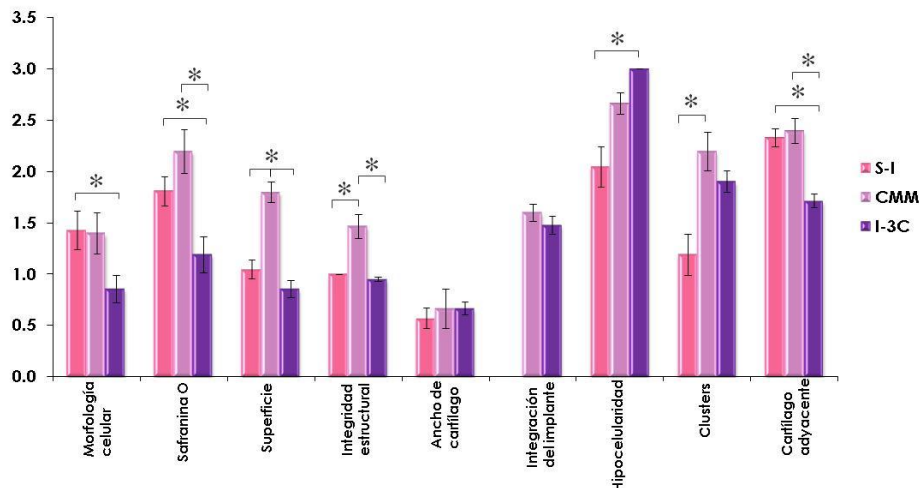


Figura 23. Escala de evaluación histológica O'Driscoll. Los * indican diferencias significativas entre grupos. Se evaluaron nueve variables en las lesiones, cada una con un puntaje de 0 a 2 o 3, siendo el 0 un resultado desfavorable y el puntaje más alto, un tejido parecido al cartílago hialino. $p < 0.05$.

A partir de las observaciones de tres técnicos diferentes y de forma independiente, se determinaron los puntajes para cada variable y se aplicó la prueba U de Mann-Whitney para datos no paramétricos encontrando los resultados que se muestran en la Figura 23.

Tabla 4. Análisis de escala O'Driscoll.

| | |
|---------------------------------|---|
| MORFOLOGÍA CELULAR | Se encontró bajo puntaje en el grupo 3 debido a alta fibrosis. Sin embargo, en los otros 2 grupos tampoco se obtienen puntajes altos. |
| TINCIÓN CON SAFRANINA O | El grupo 2 muestra en promedio un puntaje más alto. Esto se debe a las zonas delimitando la lesión que se encuentran con una alta producción de GAGs. En el caso del grupo 3, de forma general las áreas de producción de GAGs son escasas. |
| SUPERFICIE DEL CARTÍLAGO | El grupo 2 resulta más alto debido a que fue éste el que presentó mayor número de lesiones completamente cubiertas. |
| INTEGRIDAD ESTRUCTURAL | No se encontró diferencia significativa entre los grupos 1 y 3 |
| ÁNCHO DE CARTÍLAGO | En los tres grupos se observa una disminución del grosor, siendo muy evidente en los grupos 1 y 2. En el caso del grupo 3 se evaluó la cantidad de cartílago hialino presente a lo largo de toda el área de lesión. |
| INTEGRACIÓN DEL IMPLANTE | Microscópicamente se observó continuidad entre la lesión y el cartílago adyacente, por lo tanto el implante cubre toda el área lesionada y es sobre éste que se genera nuevo tejido. |
| HIPOCEULARIDAD | Una de las características de la regeneración por fibrocartílago es la disminución de la densidad celular. En este caso el grupo 1 fue el que presentó casos más desfavorables y en el grupo 3 se estimuló de forma importante la proliferación celular acelerada. Es por esto que es más cercano a lo normal. |
| CLUSTERS DE CONDROCITOS | Otra característica no deseable en la regeneración de cartílago es la formación de grupos de condrocitos que se presentan en cicatrices fibrosas. El grupo 2 presentó un puntaje más alto en esta variable seguido por el grupo 3. El grupo 1 fue el que presentó una mayor presencia de grupos de condrocitos. |

CAPÍTULO IX

DISCUSIÓN

El primer ensayo que se realizó fue el análisis de los perfiles de función hepática y biometrías hemáticas practicados a los animales al momento de tomar la biopsia de grasa y 15 días después de la cirugía de implantación con el fin de detectar alteraciones debidas al uso de vectores adenovirales. Comparando con los valores de referencia para borrego, los resultados que indicarían un posible daño hepático se encuentran dentro de los rangos normales. Las ovejas no presentaron ninguna reacción adversa o problema durante el tiempo de observación, tampoco al momento del sacrificio. Como en muchos estudios preclínicos (incluso en ovejas) y clínicos, las dosis de vectores adenovirales empleados no se asociaron a eventos adversos.³¹

Los ensayos de micromasas muestran variaciones importantes entre los individuos después de 14 días de pre-diferenciación *in vitro*, lo anterior debido a la producción indistinta de los tres tipos de colágenos detectados por inmunohistoquímica, en los tres grupos evaluados. En la mayoría de los individuos analizados se detectó la producción de los tres colágenos casi por igual, siendo colágeno I el que se expresa de forma más consistente e importante en la mayoría, posteriormente colágeno II y finalmente colágeno X.

Los resultados obtenidos en estos ensayos, pueden explicarse de acuerdo a los siguiente: **a)** en los ensayos las células permanecen en conglomerados estáticos, que afectarían la nutrición y el proceso de diferenciación; **b)** la población celular con la que se trabajó no fue seleccionada, por lo tanto, en el aislado celular que se hizo a partir de la biopsia hay una mezcla de linajes celulares con diferentes marcadores de superficie celular (ej. CM hematopoyéticas, precursores endoteliales, fibroblastos, pre-adipocitos y CMMs); **c)** los resultados coinciden con trabajos hechos anteriormente en nuestro laboratorio en los que durante la condrogénesis *in vitro*, se detectaron inicialmente altos niveles de colágeno I, posteriormente de colágeno II e intermitentemente el colágeno X; este análisis se realizó después de 14 días de pre-diferenciación, pero pudiera ser que el tiempo fuera corto para analizar los patrones de expresión de estas proteínas; **d)** aunado a lo anterior, es necesario considerar las diferencias intrínsecas propias de cada animal.

El cartílago es un tejido complejo, los condrocitos participan no solo en el mantenimiento y recuperación del mismo, también están involucrados en el proceso de

neoformación de hueso a través de osificación endocondral. Por lo tanto, estas células pueden, dependiendo del estrés al que estén sometidas, mantenerse como condrocitos articulares o hipertrofiarse para generar hueso. En la fisiología normal del tejido, al no existir una compresión mecánica, el cartílago comienza un proceso de fibrosis, caracterizada por la expresión de colágeno I.

Es importante señalar que durante el tiempo de observación en el cual los animales se mantuvieron en un corral, no se observaron eventos adversos como fiebre, inflamación o artrosis, los animales no presentaron alteraciones en la marcha y permanecieron en movimiento todo el tiempo. El propósito de este trabajo al generar una lesión, fue el dar seguimiento y finalmente evaluar la reestructuración de la arquitectura del tejido bajo los tres tratamientos, no de evaluar función mecánica, por lo que durante los 5 días posteriores a la cirugía se les administraron antibióticos y analgésicos a los animales para que de esta forma movieran la extremidad que había sido lesionada y nutrieran el cartílago y el implante por compresión.

Las imágenes macroscópicas de las lesiones *post mortem* demuestran que las ovejas del **grupo 1** se encontraban desarrollando un proceso regenerativo natural, en donde el cartílago adyacente comenzaba a cubrir el área de la lesión, en 1 de los 7 casos de éste grupo se observó la reparación de la lesión por un tejido similar a cartílago. En el **grupo 2** hay un mayor número de lesiones aparentemente reparadas (dos lesiones); aún así se podían detectar los límites de la lesión. Entre las ovejas del **grupo 3** se detectaron 5 de 7 ovejas cuyas lesiones se encontraban en estadios tempranos de resolución aún con perforaciones en el área de lesión, en dos de ellas se detectaron lesiones parcialmente cubiertas. Los resultados del grupo 3 podrían sugerir que la lesión se retrasó en resolver y que aparentemente los animales se sacrificaron tempranamente.

Los reportes más relevantes mostraron que los periodos de sacrificio para análisis en ovejas, son entre 6 y 12 meses.^{16 32} Es por lo anterior, que los resultados encontrados macroscópicamente sugieren que el periodo de observación en nuestro estudio fue corto. Se han observado buenos resultados utilizando matrices de fibrina para la generación de cartílago *in vivo*.^{33 27} Sin embargo, se ha reportado que la fibrina es un material que al ser empleado en implantes para evaluación *in vitro*, se reabsorbe con gran facilidad, desapareciendo eventualmente del plato de cultivo e *in vivo* se ha observado la cobertura solo parcial de la lesión.²

El análisis macroscópico resulta insuficiente ya que es en los análisis histoquímicos e inmunohistoquímicos que se puede observar la naturaleza y arquitectura del tejido formado y del tejido lesionado.

Microscópicamente en el grupo 1 se observa la esperada recuperación natural del cartílago, debido a la presencia de grupos de condrocitos cerca del área de la lesión y a la escasez de células en general. Hay un adelgazamiento del espesor del cartílago y en la superficie se aprecian fisuras y desintegración del tejido. En la tinción con tricrómico de Masson se observa un patrón normal, la matriz cartilaginosa en color azul y la matriz ósea en color rojo. En las zonas en donde existen fisuras la tinción del azul es menor y en la superficie se puede detectar una tinción en rojo que sugiere fibrosis. En la zona superficial y en donde se encuentran fisuras, la tinción con verde rápido elevada indica riqueza en colágenos lo que confirma lo encontrado por tricrómico de Masson. La tinción con safranina O es parecida a la normal, aunque un poco escasa, debido a la disminución en la densidad celular y a la presencia de fisuras.

En el grupo 2 se observaron áreas de fibrocartílago, evidente por la proliferación excesiva de condrocitos, la tinción con verde rápido, el amontonamiento entre ellos y la nula tinción con safranina O. Aún así, existen zonas dispersas a lo largo de la lesión que presentan tinción roja debida a la safranina O, se detectaron también áreas de fibrosis con presencia de fibroblastos que poseen una morfología más espiculada y alargada que los condrocitos y las células madre. Mediante la técnica de tricrómico de Masson, se pueden distinguir zonas de calcificación y fibrosis en la superficie del tejido neoformado, macroscópicamente parecía haber sido resuelta por un tejido parecido a cartílago; sin embargo, el tejido presente es fibroso y al parecer mineralizado con presencia de fibroblastos. Se observó un adelgazamiento notable del espesor del cartílago en la mayoría de los borregos y un aumento en el área del hueso subcondral, en algunos casos el tejido neoformado es muy delgado y fibroso. En todos los casos en las zonas de límite de la lesión y tejido sano adyacente, se encuentran grupos de condrocitos con importante producción de GAGs, debido a la coloración roja intensa que presentan en la técnica de safranina O/verde rápido.

En el grupo 3 se observa una mezcla de tejidos en aparente estado de organización: hialino, mesenquimatoso y fibroso. A diferencia de los otros dos grupos, en todos los borregos de este grupo la totalidad del área de la lesión se cubre con esta mezcla de tejidos, no se aprecia un aumento en el área del hueso subcondral como en los

anteriores, al contrario, se pueden distinguir algunas zonas hialinas en áreas pertenecientes al hueso subcondral. Se aprecian lagunas de cartílago dispersas a lo largo de la lesión. Se observan zonas de transición hacia hueso y cartílago. El mesénquima presente es abundante; de acuerdo a la literatura lo más común cuando se aplican terapias con células madre, aunque éstas hayan sido pre-diferenciadas, es que sean los factores que éstas secretan los que promueven el reclutamiento de otras células mesenquimales o de células especializadas en la reparación del tejido, la regeneración se deriva principalmente de células provenientes de hueso subcondral.³⁴

En los borregos de este grupo se identifica una alta densidad celular comparando con los resultados obtenidos en los otros dos grupos. Definitivamente hay una estimulación por parte de las células genéticamente modificadas; sin embargo, pareciera que no es específica ya que hay zonas de transición hacia osteoblastos y hacia condroblastos. Por esta razón se considera que el tiempo de observación debió ser más largo, ya que parecería que el tejido está en un proceso de remodelación y reestructuración temprana. También detectamos fibrosis y por lo tanto, la presencia de fibroblastos que es también una reacción natural a la lesión cuando el hueso subcondral se expone.³⁵

Los resultados obtenidos a partir de las técnicas histoquímicas para el grupo 3 muestran que hay regiones de calcificación pero en general, en los mejores casos, la arquitectura y patrón de tinción es similar al tejido sano. Es de particular interés lo encontrado en la tinción con safranina O y verde rápido ya que en regiones en donde la morfología celular hace pensar que la población celular que se está generando es osteoblastoide, se producen GAGs evidenciados con la tinción roja propia del colorante safranina O. Inclusive en los casos más desfavorables muestran estas lagunas de producción de GAGs.

A lo largo del área de lesión hay formaciones vasculares. Se sabe que en el periostio que se encuentra en la zona intermedia entre hueso y cartílago, las células madre que se encuentran presentes se encargan de diferenciarse según los requerimientos del medio, para la formación de trabéculas óseas, fibrocartílago e inclusive vasos sanguíneos.³⁴ Además, de acuerdo a la literatura de forma regular el factor FGF2 con el que se modificaron las células, posee actividad angiogénica *in vivo*, también estimula la diferenciación, la proliferación y la maduración de osteoblastos³⁶. Aunque *in vitro* se ha demostrado el potencial condrogénico de FGF2^{37 25}, también se han reportado casos de fibrosis *in vivo*.³⁸

No se puede esperar que la estimulación por solo un factor condrogénico reestructure la arquitectura y funcionalidad del cartílago, es por esto que se opta por la combinación de factores.¹⁵ Puede ser que FGF2 no haya sido la mejor opción para los ensayos *in vivo* a pesar de los resultados obtenidos *in vitro*. Es por esto, que analizando los resultados del trabajo que antecede al presente, y coincidente con lo reportado en la literatura, la combinación IGF-1/TGF- β podría ser otra opción para inducir condrogénesis y la reparación del cartílago lesionado.³⁹ IGF-1 es un comprobado mitógeno y estimulador de la condrogénesis por sí solo. Se encuentra sobre-expresado en células diferenciadas *in vitro* a condrocitos.⁴⁰ Sin embargo, esta combinación debe ser probada y analizada

Por lo general, en los trabajos en los que se han realizado terapias experimentales utilizando CMMs, la población celular no se enriquece, se hace un análisis de marcadores de superficie de membrana que se han identificado como propios de células madre mesenquimales como el CD105, CD90, CD271, CD73, entre otros¹² con el fin de obtener poblaciones celulares que posean estos marcadores en un porcentaje no menor al 80%. En nuestro caso, este factor pudo resultar importante ya que las condiciones en una botella de cultivo y en el microambiente de la lesión son distintas, si consideramos que las células madre no representan el 100% de las células que tenemos en cultivo después de la extracción de grasa, sino que hay una mezcla de otras poblaciones (fibroblastos, pre-adipocitos, células del endotelio vascular) estas otras poblaciones celulares pudieran estar siendo estimuladas de forma diferente a la esperada debida a los factores con las que se modificaron y la naturaleza y programación propia.

En este trabajo se utilizó una escala de evaluación histológica que ha sido utilizada por décadas para el análisis de la recuperación de lesiones en cartílago considerando el uso de implantes.⁴¹¹⁶ En los resultados de esta escala encontramos poca variación entre las observaciones de los tres técnicos.

En cuanto a **morfología celular**, los resultados son relativamente óptimos para el grupo 1 y 2 y pobres para el grupo 3. Esto se debe a la presencia de fibrosis y mesénquima considerable en el grupo 3, aún cuando se encontraron lagunas de condrocitos y condroblastos dispersos en la zona de lesión. Los resultados obtenidos por la **tinción de safranina O** son parecidos, óptimos para los grupos 1 y 2 y pobres

para el 3, en el caso de este grupo la tinción con safranina O es detectable en las lagunas de condrocitos y condroblastos y la tinción verde rápido muy evidente debido a la fibrosis. En cuanto a **regularidad de la superficie**, los animales del grupo 2 casi logran obtener el puntaje más alto para esta característica a diferencia de los grupos 1 y 3, debido a las fisuras en la superficie y a las perforaciones no resueltas en la zona de la lesión y a que es el grupo 2 el que presentó un mayor número de lesiones aparentemente reparadas. En **integridad estructural del tejido** se aprecian los mismos resultados. Sin tener en cuenta la arquitectura del tejido, el **ancho del cartílago** en los tres grupos es similar, en el caso de los borregos del grupo 3, el área de regeneración es grande, sin embargo, la naturaleza del tejido es variable por lo tanto no puede determinarse como cartílago hialino por completo. En cuanto a **integración del implante**, en los dos grupos en donde se colocó implante microscópicamente se observa la continuidad del tejido neoformado en el área de la lesión con el cartílago adyacente, por lo tanto, se puede considerar que la integración del implante se llevó a cabo. Sin embargo, algo que es muy evidente, especialmente en el grupo 3, es que la fibrina del implante se perdió, esto es notable en el caso del borrego 11 ya que se observaron restos de la fibrina del implante en medio de la fibrosis y lagunas de cartílago presentes en el área de la lesión. Es también notable en el grupo 3 la alta densidad celular en comparación con los otros dos grupos, especialmente el grupo 1 en donde se identifica **hipocelularidad**. Es claro el impacto de las células modificadas en cuanto a estimulación de la proliferación en comparación a las células madre sin modificar, además estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura en cuanto al efecto de los factores IGF-1 y FGF-2 en proliferación.²⁴ La presencia de **clusters de condrocitos** es más evidente en los grupos 2 y 3, esto se puede deber al aumento de fibrosis en estos grupos y a la activa reestructuración del tejido lesionado. En cuanto a la **integridad del cartílago adyacente** a la lesión el grupo 3 muestra una diferencia marcada y desfavorable con respecto a los otros 2 grupos y esto puede deberse al reordenamiento del tejido.

En las inmunohistoquímicas de los borregos del grupo 1 se aprecia un patrón de expresión de colágenos según lo esperado, colágeno tipo II presente así como colágeno tipo I debido al proceso normal de cicatrización. Probablemente el tamaño de la lesión que se practicó a los borregos fue muy pequeña y la regeneración natural del cartílago se presenta de forma muy eficiente. En otros trabajos se han hecho lesiones

con osteotomo de 8 mm y hasta de 15 mm de diámetro ¹⁶, la lesión practicada en este trabajo fue de 3 mm X 4 mm.

En borregos del grupo 2 se están expresando ambos tipos de colágeno en las zonas fibrosas, siendo el colágeno I el que se expresa de forma predominante, sobre todo en áreas de fibrocartílago.

En borregos del grupo 3 hay una considerable expresión de colágeno I. Sin embargo, se detectó producción de colágeno II en todos los animales de este grupo, a pesar de los resultados observados en las histoquímicas que nos sugieren que lo que se encontraba en el área de lesión era predominantemente fibrosis.

Se ha observado que el primer cartílago que se forma después de una lesión es fibrocartílago, parecido morfológicamente al cartílago hialino pero no funcionalmente y con una presencia activa de condrocitos productores de colágeno tipo I. Utilizando células de médula ósea en terapia celular para cartílago, estas tienden a hipertrofiarse ³⁴. Se han realizados ensayos con células madre de membrana sinovial para evitar calcificación e hipertrofia, pero es prácticamente imposible, ya que la expresión de colágeno X y I es constante.² En este caso la expresión de colágeno X fue muy baja, solamente en algunos casos fue considerable, sobre todo en borregos del grupo 2.

Es posible que esta evaluación se esté realizando en una etapa aún temprana de la regeneración que resulte en hallazgos no concluyentes. De acuerdo a las zonas de transición que hay en las lesiones del grupo 3, a los patrones de expresión de colágeno I y II y a la aparición de neovascularización, parecería que el tejido que se está iniciando a reestructurar. Se requiere alargar el período de observación para asegurar esto. En un estudio con pacientes, después de un año de haberles trasplantado matrices de colágeno con CMMs, se encontró fibrocartílago, pero funcionalmente y mecánicamente se mejoró la condición de los pacientes después de 4 y 5 años.³⁵

Considerando el estado de las lesiones al momento del sacrificio, parece ser que el implante de fibrina en conjunto con los factores con los que se modificaron a las células en el grupo 3, está ocasionando reacciones adversas, iniciando por la pérdida del material del implante, la inhibición de la reestructuración natural como ocurre en el grupo 1 y la generación de fibrosis y neovascularización. Esto coincide con un trabajo realizado en nuestro laboratorio, en donde se determinó que el uso de la matriz de

fibrina humana *in vitro* provocaba una alta expresión de colágenos I y X en comparación con cultivos en micromasa.

CAPÍTULO X CONCLUSIONES

- No hubo una adecuada reparación con implante al mes 4 en el grupo 3.
- Se encontró una mezcla de diferentes tejidos con tejido fibrótico produciendo colágeno I y II.
- Los datos sugieren una organización temprana de los tejidos hacia condrogénesis

CAPÍTULO XI PERSPECTIVAS

- Debido a la mezcla de poblaciones en los aislados celulares que se hicieron a partir de las biopsias de tejido graso, sería importante enriquecer la población a través de una selección de las células que presenten marcadores de membrana que han sido reportados para células madre mesenquimales como lo son: CD105, CD90, CD106 y CD271. De esta forma se eliminaría la posibilidad de que otras poblaciones celulares estén generando efectos inesperados e indeseados.
- Es también de suma relevancia hacer el seguimiento de la regeneración a diferentes tiempos. En tiempos iniciales para observar que es lo que sucede finalmente con el implante que se coloca en el área de lesión, así como a tiempos más largo para evaluar la reestructuración de la arquitectura del tejido final. Esto podría ser a los 2, 6 y 12 meses.
- Hasta el momento es sabido que no solo es el efecto de las células que se implantan en terapias celulares lo que promueve la regeneración tisular, sino los factores que estas producen y el reclutamiento de células del propio individuo tratado. Es por esto que es necesario marcar las células que se están incluyendo en el implante para determinar el destino final de éstas.
- De acuerdo a lo reportado en la literatura, el factor FGF-2 posee una actividad angiogénica y probable fibrosis *in vivo*. *In vitro* se ha reportado su probado efecto condrogénico, sería importante evaluar otros factores o combinaciones de factores que hayan arrojado resultados favorables en la evaluación *in vitro* para evaluar su efecto *in vivo*.
- En este trabajo las células con las que se generaron los implantes para los borregos del grupo 3 se mantuvieron en medio constituido solamente por DMEM y suero fetal bovino para evaluar únicamente el efecto de los factores condrogénicos con los que se estaban transduciendo a las células. Sin embargo, se ha reportado que ciertos componentes como la insulina, la transferrina, el selenio, la dexametasona y el ácido ascórbico se añaden a medios condrogénicos. Sería interesante añadir estos componentes al medio de cultivo aún cuando las células hayan sido modificadas genéticamente para seguir un proceso condrogénico.

CAPÍTULO XII BIBLIOGRAFÍA

1. Chung, C. & Burdick, J. a Engineering cartilage tissue. *Advanced drug delivery reviews* **60**, 243–62 (2008).
2. Richter, W. Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *Journal of internal medicine* **266**, 390–405 (2009).
3. Vaquero, J. & Forriol, F. Knee chondral injuries: clinical treatment strategies and experimental models. *Injury* **43**, 694–705 (2012).
4. ISSSTE APLICA EL ISSSTE PROGRAMA PARA EL DIAGNOSTICO TEMPRANO DE LA ARTRITIS, QUE AFECTA A 1.5 MILLONES DE MEXICANOS. 1 (2005).
5. Qi, Y., Feng, G. & Yan, W. Mesenchymal stem cell-based treatment for cartilage defects in osteoarthritis. *Molecular biology reports* **39**, 5683–9 (2012).
6. De Girolamo L, Bertolini G, Cervellin M, Sozzi G, V. P. Treatment of chondral defects of the knee with one step matrix-assisted technique enhanced by autologous concentrated bone marrow in vitro characterisation of mesenchymal stem cells from iliac crest and subchondral bone. *Injury* (2010).
7. F, Ishii T, Yanai T, Mishima H, Akaogi H, Ogawa T, et al. Repair of large full-thickness articular cartilage defects by transplantation of autologous uncultured bone-marrow-derived mononuclear cells. *J Orthop Res* **26**, 18–26 (2008).
8. Alfaqeh H, Norhamdan MY, Chua KH, Chen HC, Aminuddin BS, R. B. Cell based therapy for osteoarthritis in a sheep model: gross and histological assessment. *Med J Malaysia* **63**, (2008).
9. Mrugala D, Bony C, Neves N, Caillot L, Fabre S, Moukoko D, et al. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. *Ann Rheum Dis* **67**, 288–295 (2008).
10. Guo, X. *et al.* Repair of large articular cartilage defects with implants of autologous mesenchymal stem cells seeded into beta-tricalcium phosphate in a sheep model. *Tissue engineering* **10**, 1818–29 (2004).

11. 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 (Dayton, Ohio)* **25**, 2739–49 (2007).
12. Darwin J. Prockop, D.G.P., Bruce A. Bunnell *Mesenchymal stem cells. Methods and Protocols.*,. 197 (Humana Press: 2008).
13. Nauta, A. J. & Fibbe, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* **110**, 3499–506 (2007).
14. Mizuno, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: Ten years of research and a literature review. *J Nippon Med Sch* **76**, 56–66 (2009).
15. Fortier, L. a, Barker, J. U., Strauss, E. J., McCarrel, T. M. & Cole, B. J. The role of growth factors in cartilage repair. *Clinical orthopaedics and related research* **469**, 2706–15 (2011).
16. Zscharnack, M. *et al.* Repair of chronic osteochondral defects using predifferentiated mesenchymal stem cells in an ovine model. *The American journal of sports medicine* **38**, 1857–69 (2010).
17. Kim, B.-S., Kang, K.-S. & Kang, S.-K. Soluble factors from ASCs effectively direct control of chondrogenic fate. *Cell proliferation* **43**, 249–61 (2010).
18. Mizuta H, Kudo S, Nakamura E, Otsuka Y, Takagi K, H. Y. Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **12**, 586–596 (2004).
19. Evans CH, Robbins PD, Ghivizzani SC, et al. Clinical trial to assess the safety, feasibility, and efficacy of transferring a potentially anti-arthritis cytokine gene to human joints with rheumatoid arthritis. *Hum Gene Ther.* **7**, 1261–1280 (1996).
20. Steinert, A. F., Nöth, U. & Tuan, R. S. Concepts in gene therapy for cartilage repair. *Injury* **39 Suppl 1**, S97–113 (2008).
21. Carlberg AL, Pucci B, Rallapalli R, et al. Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* **67**, (2001).

22. Steinert A, Weber M, Dimmler A, et al. . Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate. *J Orthop Res.* **21**, 1090–1097 (2003).
23. Gelse K, von der Mark K, Aigner T, et al. Articular cartilage repair by gene therapy using growth factor-producing mesenchymal cells. *Arthritis Rheum.* **48**, 430–441 (2003).
24. Madry, H. *et al.* Acceleration of articular cartilage repair by combined gene transfer of human insulin-like growth factor I and fibroblast growth factor-2 in vivo. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* **130**, 1311–22 (2010).
25. Idalia, G. V. Desarrollo de un implante de CMM modificadas genéticamente para reemplazo de cartílago. 75 (2012).
26. Tenney, R. M. & Discher, D. E. Stem cells, microenvironment mechanics, and Growth Factor activation. **21**, 630–635 (2010).
27. Arias, J. L. Cultivo de condrocitos humanos para la implantación en lesiones articulares. (2006).
28. Huang, A. H., Farrell, M. J. & Mauck, R. L. Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage. *Journal of biomechanics* **43**, 128–36 (2010).
29. Martini, L., Fini, M., Giavaresi, G. & Giardino, R. Sheep model in orthopedic research: a literature review. *Comparative medicine* **51**, 292–9 (2001).
30. Potes, J. C. *et al.* The Sheep as an Animal Model in Orthopaedic Research. **2**, 29–32 (2008).
31. Glasgow J.N., Everts M., C. D. T. Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy. *Cancer Gene Ther. Author manuscript.* **4**, 337–346 (2007).
32. Marquass, B. *et al.* Matrix-associated implantation of predifferentiated mesenchymal stem cells versus articular chondrocytes: in vivo results of cartilage repair after 1 year. *The American journal of sports medicine* **39**, 1401–12 (2011).
33. Jung, S.-N. *et al.* In vivo cartilage formation using chondrogenic-differentiated human adipose-derived mesenchymal stem cells mixed with fibrin glue. *The Journal of craniofacial surgery* **21**, 468–72 (2010).

34. LeBaron, R. G. & Athanasiou, K. a Ex vivo synthesis of articular cartilage. *Biomaterials* **21**, 2575–87 (2000).
35. Steinert, A. F. *et al.* Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis research & therapy* **9**, 213 (2007).
36. Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R. & Franceschi, R. T. Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *The Journal of biological chemistry* **277**, 36181–7 (2002).
37. Gaissmaier, C., Koh, J. L. & Weise, K. Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair. *Injury* **39 Suppl 1**, S88–96 (2008).
38. Bikfalvi, a, Klein, S., Pintucci, G. & Rifkin, D. B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocrine reviews* **18**, 26–45 (1997).
39. Liu, T. M. *et al.* Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 750–60 (2007).
40. Madry, H., Zurakowski, D. & Trippel, S. B. Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene therapy* **8**, 1443–9 (2001).
41. Rutgers, M., Van Pelt, M. J. P., Dhert, W. J. a, Creemers, L. B. & Saris, D. B. F. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **18**, 12–23 (2010).

CAPÍTULO XIII

ANEXOS 1: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

13.1.1 MEDIO PARA CMMS

Éste medio se prepara con medio DMEM adicionado con 5% de L-glutamina. Se agrega SFB para que finalmente quede a una concentración del 10%. Se añade también antibiótico/antimicótico. Se almacena a 4°C.

13.1.2 MEDIO DE MANTENIMIENTO PARA CÉLULAS HEK 293

Se utiliza medio DEMEM adicionado con 5% de L-glutamina. Se agrega SFB para que finalmente quede a una concentración del 5%. Se añade antibiótico/antimicótico. Se almacena a 4°C.

13.1.3 COLAGENASA I AL 0.1%

Se pesan 100 mg de colagenasa I y esto se disuelve en 100 mL de PBS estéril. Se esteriliza por filtración y se almacena en congelación a -20°C cubierta de la luz.

13.1.4 BUFFER DE CITRATOS PH 6

Pesar 1.94 g de ácido cítrico anhídrido y disolver en 1 L de agua bidestilada. Ajustar pH a 6 con NaOH.

CAPÍTULO XIII

ANEXOS 2: TÉCNICAS

13.2.1 PURIFICACIÓN VIRAL

Se inicia lisando la última pastilla celular por ciclos de congelamientos y descongelamiento (3) en baño maría a 37°C y a -80°C respectivamente. Se centrifuga y toma el sobrenadante eliminándose el debris celular.

1.- Colocar en tubos de polialomero 4 mL de CsCl₂ densidad 1.4 (el volumen máximo de los tubos es de 10 mL, calcular el volumen de CsCl₂ de acuerdo al volumen de pastilla que se tenga).

2.- Añadir 4 mL de CsCl₂ densidad 1.2 comenzando por añadir 500 µL lentamente con la micropipeta de 100 µL, evitando romper el gradiente.

3.- Verificar que los gradientes estén separados.

4.- De acuerdo al volumen recuperado de la pastilla celular, preparar los tubos necesarios para purificar el total de volumen.

5.- Agregar aproximadamente 1 mL de sobrenadante sobre gradiente, iniciando con 500 µL con la micropipeta de 100 µL, lentamente.

6.- Añadir 1 mL o 500 µL de aceite mineral encima del sobrenadante hasta llegar al borde del tubo.

7.- Balancear el peso para la ultracentrífuga pesando los tubos colocados en chaquetas. Retirar o añadir aceite mineral según se requiera para equilibrar el peso (la variación debe ser de 000.00xx).

*Se programa la ultracentrífuga de la siguiente manera: 35,000 rpm, 1:30 horas, No Brake a 4°C.

8.- Después del tiempo de centrifugado se identifica y aspira con micropipeta la banda blanquecina que se forma entre gradientes.

9.- Agregar un volumen igual al recuperado de PBS.

10.- Colocar en un tubo de polialomero 6 mL de CsCl₂ de densidad 1.35.

11.- Agregar sobre estos la banda recuperada lentamente, empezando por 500 μ L con la micropipeta de 100 μ L.

12.- Agregar finalmente 1 mL o 500 μ L de aceite mineral.

13.- Balancear.

*Programar de la siguiente forma: 35,000 rpm, 18 hrs, 4°C, No Brake.

14.- Preparar 3 L de buffer de diálisis (10 mL TRIS 10 mM, 10mL MgCl₂ 1mM, 28 mL NaCl 140 M).

15.- Recuperar banda blanquecina, mientras tanto poner en agitación a 10°C la membrana de diálisis.

16.- Colocar lo recuperado en membrana y dializar por 1 hr. Repetir esto 1 vez más.

17.- En la 3era diálisis, añadir 10% de glicerol a buffer de diálisis.

18.- Después de la 3era diálisis recuperar virus y alicuotar en crioviales.

19.- Almacenar a -80°C inmediatamente.

13.2.2 TRANSDUCCIÓN

1.- Eliminar el medio en el cual se cultivan las células.

2.- Hacer 2 lavados con PBS.

3.- Hacer los cálculos necesarios para transducir a una MOI de 50 por vector adenoviral.

4.- Preparar un volumen de 3 mL de medio DMEM sin suero en el caso de botellas de cultivo de 75 cm₂ y 5 mL en el caso de botellas de 150 cm₂ con la cantidad de virus necesaria (descongelar vial con virus en frío).

5.- Añadir el medio preparado con virus a la botella de cultivo y colocar en la incubadora a 37°C por 3 hrs.

6.- Pasado este tiempo hacer 3 lavados con PBS eliminando por completo el medio con virus.

7.- Añadir medio para CMM y regresar a la incubadora.

13.2.3 INCLUSIÓN DE TEJIDO EN PARAFINA

1.- Lavar el tejido en agua destilada y colocarlo en un tubo de 1 o 1.5 mL.

2.- Colocar en acetonas graduales 70%, 90%, 100%, 100%, 20 min en cada una.

3.- Colocar en una mezcla de acetona/xilol por 20 min.

4.- Colocar en 2 de xilol por 20 min cada uno.

5.- Eliminar por completo el xilol en el que se encuentren y añadir parafina líquida a todo el tubo.

6.- Dejar en esa parafina por 20 min a 60°C una vez que ésta esté completamente líquida.

7.- Eliminar la parafina y hacer un segundo cambio con parafina nueva.

8.- Dejar por 20 min a 60°C, montar y dejar enfriar para hacer cortes.

13.2.4 TRICRÓMICO DE MASSON

1.- Hidratar en agua destilada por 20 seg.

2.- Colocar en solución fijadora de Bouin por 30 min a 60°C.

3.- Lavas con agua de la llave hasta que pierda el color amarillo.

4.- Enjuagar con agua destilada unos segundos.

5.- Teñir núcleos con hematoxilina férrica por 10 min.

6.- Lavar con agua de la llave por 10 min.

7.- Lavar con agua destilada hasta que deje de teñirse.

8.- Colocar en solución de ácidos (fosfotúngstico y fosfomolibdico) por 10 min.

9.- Sumergir en agua destilada.

10.- Teñir con azul de anilina por 20 min.

- 11.- Lavar con agua destilada hasta que deje de teñirse.
- 12.- Hacer una inmersión de 15 seg en ácido acético acuoso al 1%.
- 13.- Deshidratar en alcoholes 95%, 100%, alcohol xilol por 15 seg.
- 14.- Aclarar en 2 cambios de xilol de 15 seg cada uno y montar con resina.

13.2.5 AZUL DE TOLUIDINA

- 1.- Colocar las muestras en etanol al 100%, 2 cambios por 5 min cada uno.
- 2.- Colocar las muestras en etanol al 95% por 2 min.
- 3.- Colocar las muestras en etanol al 70% por 2 min.
- 4.- Lavar con agua de la llave por 30 seg.
- 5.- Teñir con azul de toluidina acuoso al 0.25% por 5 min.
- 6.- Lavar con agua destilada hasta que dejen de teñirse.
- 7.- Deshidratar en alcohol al 95%, 2 cambios por 5 min cada uno.
- 8.- Deshidratar en alcohol al 100%, 2 cambios por 5 min cada uno.
- 9.- Aclarar en xilol, 3 cambios por 2 min cada uno y montar con resina.

13.2.6 SAFRANINA O/VERDE RÁPIDO

- 1.- Teñir núcleos con hematoxilina férrica por 2 min.
- 2.- Lavar con agua de la llave por 8 min.
- 3.- Teñir con verde rápido por 6 min.
- 4.- Colocar en ácido acético acuoso al 1% por 10 seg.
- 5.- Teñir con Safranina O acuoso al 0.1% por 3 min.
- 6.- Deshidratar con alcoholes 95%, 100%, cada uno por 2 min.
- 7.- Aclarar con xilol, 2 cambios por 2 min y montar con resina.

13.2.7 INMUNOHISTOQUÍMICA CON EL KIT MOUSE & RABBIT SPECIFIC HRP/DAB DETECTION IHC, ABCAM

- 1.- Hidratar las muestras con agua destilada por 20 seg.
- 2.- Añadir peróxido de hidrógeno para bloquear a la peroxidasa endógena por 15 min.
- 3.- Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
- 4.- Añadir bloqueador de proteínas por 40 min.
- 5.- Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
- 6.- Añadir el anticuerpo primario a la concentración adecuada e incubar toda la noche (colágeno II y X) o por 2 horas (colágeno I).
- 7.- Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
- 8.- Añadir el anticuerpo secundario biotinilado e incubar por 20 min.
- 9.- Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
- 10.- Añadir la estreptavidina conjugada con peroxidasa e incubar por 20 min.
- 11.- Lavar 3 veces con buffer PBS/Tritón X por 2 min cada una.
- 12.- Añadir diaminobenzidina e incubar de 5 a 10 min.
- 13.- Lavar con agua destilada.
- 14.- Contrateñir con hematoxilina de Gill por 2 min.
- 15.- Lavar con agua destilada por 20 seg y posteriormente con agua de la llave hasta que deje de teñirse.
- 16.- Deshidratar con alcoholes 95%, 100%, 100%/xilol por 15 seg.
- 17.- Aclarar con 2 cambios de xilol, cada uno de 15 seg y montar con resina.

CAPÍTULO XIII

ANEXOS 3: EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

13.3 ESCALA O'DRISCOLL

| Categorías | Características | Puntaje |
|-------------------------------------|---|---------|
| Morfología celular | Cartílago articular hialino | 2 |
| | Mesénquima no diferenciada | 1 |
| | Tejido fibroso o hueso | 0 |
| Tinción con safranina O | Normal o casi normal | 3 |
| | Moderada | 2 |
| | Ligera | 1 |
| | Ninguna | 0 |
| Superficie | Intacta | 2 |
| | Fisuras | 1 |
| | Interrupción severa con fibrilación | 0 |
| Integridad estructural | Normal | 2 |
| | Ligeramente interrumpida incluyendo quistes | 1 |
| | Desintegración severa | 0 |
| Grosor de cartílago | 100% o similar a cartílago adyacente | 2 |
| | 50-100% de cartílago normal | 1 |
| | 0-50% de cartílago normal | 0 |
| Integración del implante | Integración de en ambos límites de la lesión | 2 |
| | Integrado en uno de los límites o parcialmente en ambos | 1 |
| | Sin integración | 0 |
| Hipocelularidad | Celularidad normal | 3 |
| | Ligera hipocelularidad | 2 |
| | Hipocelularidad moderada | 1 |
| | Severa hipocelularidad | 0 |
| Grupos de condrocitos | Sin grupos | 3 |
| | Algunos grupos | 2 |
| | Presencia moderada | 1 |
| | Abundantes | 0 |
| Degeneración de cartílago adyacente | Celularidad normal, sin grupos de condrocitos, tinción normal | 3 |
| | Celularidad normal, pocos grupos de condrocitos, tinción moderada | 2 |
| | Hipocelularidad moderada, tinción ligera | 1 |
| | Hipocelularidad severa, poca o nula tinción | 0 |

