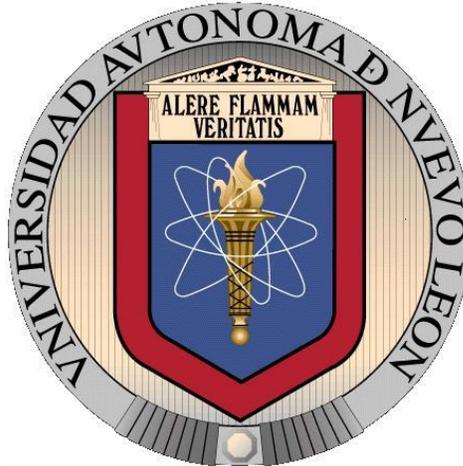


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



“EVALUACIÓN DE UN IMPLANTE DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES MODIFICADAS GENÉTICAMENTE CON PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESOS PARA LA OSTEOGÉNESIS EN *Ovis aries*”

Por

MC. ADELINA ALEJANDRA HERNÁNDEZ HURTADO

Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS con Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Julio, 2013

Evaluación de un Implante de Células Madre Mesenquimales Modificadas Genéticamente con Proteínas Morfogénicas de Huesos para la Osteogénesis en Ovis aries.

Aprobación de Tesis:



Dr. C. Augusto Rojas Martínez
Director de Tesis



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Co-Director de Tesis



Dr. med. Óscar Mendoza Lemus
Miembro de Tesis



Dr. med. José Félix Vilchez Cavazos
Miembro de Tesis



Dra. C. Rocio Ortiz López
Miembro de Tesis



Dr. med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado
Subdirector de Estudios de Posgrado

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 de la Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez.

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 Dr. José Félix Vilches Cavazos, Dr. Jorge Lara Arias y 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. Víktor J. Romero Díaz y del Dr. Iván Alberto Marino Martínez. Este trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina bajo el código BI12-003. Cuenta con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio de la convocatoria SALUD 2008-C01-87362.

Dedico esta tesis con gran amor

A mi esposo

Ing. Jorge Amado Quiroga Guerrero

Responsable directo de la finalización de este trabajo. Por su apoyo incondicional, por ser mi compañero, sostén y comprensión de todos los días. Gracias por caminar siempre a mi lado.

A mi padre Sr. Pedro Hernández Páez por darme la educación necesaria para poder llegar hasta aquí y enseñarme el camino hacia una vida plena.

A la memoria de mi madre Profesara Candelaria Hurtado Gómez, cuya ausencia siento cada día más, pero me fortalece.

Agradecimientos

Primeramente a Dios por permitirme realizar este proyecto de vida.

A mis hermanos, verdaderos amigos, porque los aprecio y quiero, ya que son y siempre serán muy importantes en mi existencia.

A mis sobrinos y ahijados, a quienes deseo éxito en la vida y que logren satisfacciones perdurables.

Al director de esta tesis, Dr. Augusto Rojas Martínez, quien siempre está dispuesto a compartir su sabiduría para alcanzar nuestras metas. Gracias por apoyarme en cada momento y depositar su confianza en mí.

A la Dra. Herminia Martínez Rodríguez por sus consejos siempre tan acertados y necesarios para seguir avanzando.

Al Dr. Félix Vilches, por dirigir y realizar las cirugías de las ovejas, muchas veces interponiendo su valioso tiempo, sin importar el cansancio y de una manera muy profesional y humana.

Al resto de mi comisión de tesis, Dra. Rocío Ortiz López y Dr. Óscar Mendoza Lemus, por su apoyo y comentarios para el engrandecimiento de este trabajo.

Al Dr. Jorge Lara Arias, por su ayuda incondicional en cada paso de este trabajo. Gracias por dedicar mucho de tu tiempo a este proyecto, fuiste pieza clave para los ensayos *in vivo*.

Al M.V.Z. Adalberto Ábrego Guerra, quien se encargó de obtener, alimentar y cuidar muy bien a mis borreguitas, antes y después de las cirugías. Gracias por su gran equipo de trabajo de la Facultad de Medicina Veterinaria.

Al Maestro Víktor Romero por su gran experiencia y dedicación en los estudios histológicos, parte muy importante en el desarrollo de este trabajo.

Al Ingeniero José Luis Tijerina por ayudarme a realizar los estudios de resistencia mecánica. Gracias por su apoyo.

Al Dr. Iván Marino Martínez y la Maestra Gisela Borrego Soto, quienes fueron las primeras personas que además de ofrecerme su apoyo en esta área de la biología molecular, me ofrecieron su amistad verdadera.

A Dany, Idalia, Marcela, Sergio, Gloria, Alí, José, Dante, Manuel, Nidia, Cecy, gracias por su amistad y por compartir grandes momentos.

A Juany, Ariadna, Normita, Lupita, Licenciado Mario y a todo el personal del Departamento de Bioquímica, por hacer mi estancia en ese departamento muy amena y ayudarme a resolver muchos problemas, gracias por su ayuda.

Agradezco muy especialmente a Rosario Salazar Riojas, quien me apoyó y me dio la oportunidad de iniciar el doctorado, en una etapa muy especial de nuestras vidas. Gracias por tu ayuda y tu amistad.

A mi nuevo equipo de trabajo, que ha comprendido que esta última etapa del proyecto ha sido fundamental para su culminación.

A CONACYT por el apoyo económico para realizar este proyecto.

A todas las personas que no mencioné pero que directa o indirectamente me apoyaron para alcanzar un logro más en mi vida. Mil Gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	i
<i>DEDICATORIA</i>	ii
<i>TABLA DE CONTENIDO</i>	iv
<i>LISTA DE TABLAS</i>	viii
<i>LISTA DE FIGURAS</i>	ix
<i>ABREVIATURAS</i>	x
<i>RESUMEN</i>	xi
<i>CAPÍTULO 1. Introducción</i>	1
1.1 Tejido óseo y su importancia	1
1.2 Terapias de regeneración ósea para reparar defectos en hueso	2
1.3 Terapia celular	3
1.4 Factores de crecimiento. Proteínas morfogenéticas de hueso. BMPs	5
1.5 Terapia génica. Vectores adenovirales	7
1.6 Soportes o andamios para formar implantes	8

1.7	Aplicación de implantes óseos en modelos animales	9
1.8	Antecedentes	10
1.9	Justificación	12
1.10	Objetivo general	13
1.11	Objetivos específicos	13
CAPÍTULO 2. Materiales y métodos		14
2.1	Equipo, materiales y reactivos	14
2.1.2	Materiales y reactivos	15
2.2	Metodología	19
2.2.1	Aislamiento de CMMs ovinas de tejido adiposo	19
2.2.2	Caracterización de CMMs	21
2.2.2.1	Citometría de flujo	21
2.2.2.2	PCR en tiempo real	21
2.2.3	Ensayos <i>in vitro</i> para evaluar la diferenciación osteogénica de CMMs	22
2.2.3.1	Ensayos de transducción y co-transducción con vectores adenovirales AdBMP2, AdBMP7 y AdBMP9	22
2.2.3.2	Ensayos de expresión de los marcadores osteogénicos, osteocalcina y colágeno tipo I por PCR tiempo real, cuantificación relativa	23
2.2.3.3	Ensayos de Western blot	24

2.2.3.4	Análisis histológico de la osteogénesis	24
	<i>in vitro</i> de CMMs transducidas con las BMPs	
2.2.4	Obtención de la matriz de hueso desmineralizado	25
2.2.5	Ensayos de adherencia celular	25
2.2.6	Modelo animal	26
2.2.6.1	Grupos experimentales y tamaño de la muestra	26
2.2.7	Implantes autólogos	27
2.2.8	Cirugía de distracción ósea	28
2.2.8.1	Anestesia	28
2.2.8.2	Osteotomía diafisaria de tibia + fijación interna con placa DCP y tornillos	28
2.2.9	Ensayos de regeneración ósea	29
2.2.9.1	Análisis radiográfico y tomografía 3D	29
2.2.9.2	Ensayos de resistencia biomecánica	30
2.2.9.3	Análisis histológico	30
2.2.10	Estudios de bioseguridad y toxicidad	30
CAPÍTULO 3. Resultados		32
3.1	Caracterización de las CMMs	32
3.1.1	Microscopía en campo claro	32
3.1.2	Citofluorometría y PCR en tiempo real	33
3.2	Ensayos de expresión por PCR en tiempo real	34
3.3	Ensayos de Western blot	35

3.4	Análisis histológico <i>in vitro</i>	36
3.5	Análisis radiográfico	38
3.6	Tomografía computarizada	40
3.7	Ensayos de compresión	42
3.8	Ensayos histológicos <i>in vivo</i>	44
3.9	Estudios de bioseguridad y toxicidad	47
CAPÍTULO 4. Discusión de los resultados		48
CAPÍTULO 5. Conclusiones y perspectivas		57
5.1	Conclusiones	57
5.2	Perspectivas	58
CAPÍTULO 6. Bibliografía		59
CAPÍTULO 7. Anexos		64
7.1	ANEXO 1. Medios de cultivo y soluciones	64
7.1.1	Medio de cultivo para CMMs	64
7.1.2	Medio de mantenimiento para células HEK 293	64
7.1.3	Colagenasa I al 0.1%	64
7.2	ANEXO 2. Técnicas	65
7.2.1	Purificación viral	65
7.2.2	Transducción	66
7.2.3	Inclusión de tejido en parafina	66
7.2.4	Tinción tricrómico de Masson	66
7.2.5	Inmunohistoquímica	67

LISTA DE TABLAS

- Tabla 1. Secuencias de los genes utilizados para la PCR en tiempo real.
- Tabla 2. Prueba de hipótesis de comparación múltiple (elasticidad).
- Tabla 3. Estudios de toxicidad. Uso de vectores adenovirales.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. CMMs 80% confluencia al día 14 de cultivo.
- Figura 2. Diagrama de MSCA vs. CD 271.
- Figura 3. Marcadores de expresión de CMMs por qPCR.
- Figura 4. Ensayos de expresión por qPCR para marcadores de hueso.
- Figura 5. Ensayos de Western blot.
- Figura 6. Micrografías del día 1 y 32 de cultivo.
- Figura 7. Radiografías y fotografías a la semana 10 de seguimiento.
- Figura 8. Radiografías representativas de cada grupo de experimentación.
- Figura 9. Tomografía computarizada de corte sagital de los huesos de oveja.
- Figura 10. Tomografía computarizada 3D de la zona de la lesión.
- Figura 11. Gráficas de resistencia a la deformación. Esfuerzo vs. Deformación.
- Figura 12. Evaluación histológica de la zona de la lesión; HyE.
- Figura 13. Evaluación histológica de la zona de la lesión; tricrómico de Masson.

ABREVIATURAS

BMP	Proteínas morfogénicas de hueso
MOD	Matriz ósea desmineralizada
CMMs	Células madre mesenquimales
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
MOI	Multiplicity of infection
PBS	Phosphate buffered saline
RTqPCR	Transcripción reversa, acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real
SFB	Suero fetal bovino
DAB	Diaminobenzidina
HRP	Peroxidasa de rábano
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
rpm	Revoluciones por minuto
COL I	Colágeno tipo I
COL II	Colágeno tipo II
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente

RESUMEN

Adelina Alejandra Hernández Hurtado

Fecha de Graduación: Julio, 2013

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio:

“Evaluación de un Implante de Células Madre Mesenquimales Modificadas Genéticamente con Proteínas Morfogenéticas de Huesos para la Osteogénesis en *Ovis aries*”

Número de páginas: 68

Candidato para el grado de Doctor
en Ciencias con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de Estudio: Salud

Propósito y Método del Estudio: Introducción. La generación de implantes para el tratamiento y regeneración de afecciones del tejido óseo representan una enorme oportunidad de desarrollo e innovación para muchos campos de la salud humana. **Metodología:** nosotros generamos un implante de tres componentes (I-3C) constituido por células madre mesenquimales (CMMs), transducidas *ex vivo* con un vector adenoviral que expresa una combinación de las proteínas morfogenéticas de hueso 2 y 7 (AdBMP2/7), embebidas en una matriz ósea desmineralizada (MOD). Este implante fue probado en un modelo ovino (*Ovis aries*) en una lesión sometida a carga. **Resultados:** los ensayos *in vitro* demostraron que el tratamiento seleccionado con mayor potencial osteogénico es el que contiene la combinación AdBMP2/7 comprobado por PCR en tiempo real, Western Blot y tinciones histológicas e inmunohistoquímicas para las proteínas marcadoras de inducción a hueso, osteocalcina y colágeno tipo I. El implante fue colocado en la zona de la lesión, creada por una distracción en la diáfisis media de la tibia. Se probaron tres grupos de experimentación: control 1 sin implante (S-I); control 2 implante con CMMs (I-CMMs); implante de 3 componentes CMMs modificadas genéticamente con adenovirus que expresan proteínas morfogenéticas de hueso 2 y 7 que se encuentran embebidas en una matriz de hueso desmineralizado (I-3C). **Resultados:** el seguimiento radiográfico por 10 semanas después de la distracción ósea demostró una reducción en el tiempo de consolidación del grupo I-3C. La tomografía computarizada demostró en ese mismo grupo, una forma y estructura del hueso postmortem muy parecida a la de una tibia sin lesión. Estos hallazgos fueron corroborados por los ensayos de compresión e histológicos, demostrando que la calidad del hueso nuevo formado fue mayor que la de los grupos sin implante y con CMMs sin modificación genética. **Contribuciones y Conclusiones:** se logró desarrollar un implante de tres componentes constituido por células madre mesenquimales (CMMs), transducidas *ex vivo* con un vector adenoviral que expresa una combinación de las proteínas morfogenéticas de hueso 2 y 7 (AdBMP2/7), que nos permitirá continuar con los estudios clínicos necesarios para evaluar principalmente defectos en huesos y enfermedades relacionadas con el sistema óseo.

FIRMA DEL ASESOR: _____

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Tejido óseo y su importancia.

El hueso es un tejido de soporte muy resistente que se encarga del movimiento y mantiene la estabilidad de la postura del cuerpo.^{1, 2} Está constituido por tejido conjuntivo integrado en su mayor parte por matriz ósea compuesta por fibras de colágeno tipo I y X que constituyen la matriz orgánica. La matriz inorgánica está formada en un 99% por depósitos de fosfato de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita y de depósitos amorfos. Tiene tres tipos de células: osteoblastos o células formadoras de hueso, osteoclastos o células de reabsorción y los osteocitos, los cuales son las células maduras del hueso.³ La mayoría de los tejidos al sanar crean una cicatriz fibrosa; sin embargo, el hueso es el único tejido capaz de regenerarse sin este tipo de cicatriz. A pesar de su estructura rígida, se mantiene en un constante estado dinámico que se conoce como remodelación ósea. Los principios biológicos que ofrecen la posibilidad para regenerar el volumen del hueso perdido son la osteogénesis, la osteoinducción y la osteoconducción.⁴

La osteogénesis es la formación de nuevo hueso a partir de células osteocompetentes (osteoblastos). La osteoinducción permite la migración y proliferación de células indiferenciadas en el sitio de la regeneración por medio de proteínas inductivas de hueso. La osteoconducción es la habilidad de un material para operar como andamio para guiar la regeneración tisular.^{4, 5}

1.2 Terapias de regeneración ósea para reparar defectos en hueso.

Los defectos de hueso que resultan de una asimetría por un defecto óseo congénito, por un trauma, una infección o una resección de tumor, representan un problema en el campo de la ortopedia, por lo tanto, se han empleado una gran variedad de enfoques para mejorar la osificación de los defectos de hueso. El implante de hueso autólogo es considerado como el estándar de oro para el implante óseo. Sin embargo; este procedimiento tiene sus limitaciones, las cuales incluyen la dimensión del defecto óseo a reemplazar y las restricciones en la cantidad de hueso disponible. Los implantes de hueso alogénicos son una alternativa, pero tiene riesgos de rechazo y puede haber riesgos potenciales en la transmisión de enfermedades infecciosas. Desde los años 90s, los científicos han concentrado sus esfuerzos en la investigación y exploración de la ingeniería de tejidos óseos. El desarrollo de la regeneración de tejidos basada en la terapia

celular y génica mediada por células madre, ha mostrado ser una de las estrategias alternativas más promisorias en la ingeniería de tejidos.⁵⁻⁷

1.3 Terapia celular.

El primer y muy importante paso en la ingeniería de tejidos, es la selección de la fuente celular que pueda eficientemente diferenciarse a tejido óseo. Algunos tipos celulares pueden ser usados como componentes celulares; estos incluyen osteoblastos, células embrionarias y células madre adultas. Dentro de esos candidatos, las células madre mesenquimales (CMMs), son muy apropiadas para su uso en la regeneración de hueso.⁸ Las CMMs fueron descubiertas hace aproximadamente 40 años por Friedenstein y colaboradores quienes las aislaron de médula ósea y las describieron como células adherentes de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos.⁵⁻¹² En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular o ISCT (*International Society Cellular Therapy*) propuso tres criterios para definir las CMMs: estas células deben ser adherentes en cultivo; deben expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y finalmente, las CMMs deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándares de cultivo.^{8,9}

La médula ósea es la principal fuente de aislamiento de CMMs capaces de formar hueso *in vitro*. Sin embargo el procedimiento de obtención tiene algunas desventajas en la práctica clínica: la aspiración de médula ósea es una técnica potencialmente invasiva y dolorosa, e incrementa el riesgo de morbilidad e infección. Por otra parte el tejido adiposo es una fuente ideal de CMMs, de fácil obtención a través de procedimientos como liposucción o abdominoplastías. Al igual que la médula ósea, es derivado del mesodermo embriogénico y contiene una población celular estromal heterogénea. Se ha demostrado que la cantidad de CMMs que se extrae del tejido adiposo es mayor que la médula ósea y el tiempo de formación de la monocapa adherente es menor, por lo tanto disminuye el riesgo de contaminación celular y la pérdida del cultivo.^{5, 9}

La diferenciación ósea *in vitro* de las CMMs resulta de la activación de algunas moléculas que intervienen en diversas vías de señalización, por ejemplo, Cbfa1 (core binding factor alpha 1) es un factor de transcripción expresado en CMMs muy estudiado por su poder de diferenciación osteogénica.^{6, 8} También la adición de proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) al medio osteogénico facilita la proliferación y diferenciación osteogénica de la CMMs *in vitro* e *in vivo*.⁸ De ahí que las CMMs también tienen la habilidad de ser transducidas para convertirse en un potencial vehículo en la terapia de transferencia de genes, principalmente en la expresión de BMPs para la reparación de hueso.

1.4 Factores de crecimiento. Proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs).

El hueso recién formado comienza su mineralización en un promedio de diez días. Para ello las CMMs son estimuladas principalmente por los osteoblastos; estos liberan al medio extracelular una serie de factores como los de la super familia de factores de crecimiento y de transformación beta (TGF- β), dentro de los cuales se encuentra una familia de factores bioactivos conocidos como proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs por sus siglas en inglés). Muchos investigadores han utilizado las BMPs para la regeneración de hueso.¹³⁻¹⁶ En el hueso las BMPs son producidas por las células osteoprogenitoras, osteoblastos, condrocitos y plaquetas. Después de su liberación, la matriz extracelular funciona como un almacenamiento temporal de BMPs. Los efectos regulatorios de las BMPs dependen del tipo de célula blanco, su estado de diferenciación, la concentración local de BMPs, o bien de las interacciones con otras proteínas secretadas. Las BMPs inducen una cascada secuencial de eventos que llevan a la condrogénesis, osteogénesis, angiogénesis y síntesis controlada de matriz extracelular.¹⁶

Las BMPs ejercen sus efectos a través de la unión como dímeros a sus receptores serina/treonina cinasa tipo I y II, formando un complejo oligomérico. Los receptores tipo II son constitutivamente activos y fosforilados y por lo tanto activan a los receptores tipo I. Posteriormente la activación de los receptores tipo

fosforilan a proteínas efectoras intracelulares como el receptor-regulador Smads (R-Smads), Smad 1, Smad 5 y Smad 8. En la activación, el Smads se asocia con el Co-Smad, Smad 4, y se transloca al núcleo, donde se unen con otros factores de transcripción y promotores de unión de genes blancos para el control de su expresión.^{15, 16} Se han identificado y caracterizado alrededor de 20 formas de BMPs y desde la década de los 90s se ha buscado una forma eficiente de utilizar su potencial osteogénico en la terapéutica. Hasta el momento las que mayor capacidad osteogénica han demostrado son la BMP2, 4, 6 y la 9. Las BMPs no se limitan al tejido óseo, estas tienen un importante papel en el desarrollo embrionario de diferentes tejidos y órganos, incluyendo cartílago, epitelios, sistema nervioso central, corazón, hígado, gónadas y riñón.^{14, 16}

La BMP-2 recombinante (rhBMP-2) fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para su uso clínico en 2004, especialmente en fracturas de tibia expuesta. Otra BMP clínicamente usada es la BMP-7, mostrando una mejor formación ósea en defectos de hueso segmentados. El potencial osteogénico de ambas BMPs ha sido comparado *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, las dos incrementan la producción de fosfatasa alcalina (ALP), la cual indica diferenciación osteogénica. Se ha reportado que la producción de ALP es más estimulada con la rhBMP-2; sin embargo *in vivo*; la rhBMP-7 produce mayor cantidad de hueso con mayor contenido mineral.¹⁶

Una alternativa para el tratamiento con los homodímeros BMP-2 o BMP-7, es el uso de los heterodímeros BMP-2/7. (14) Esos heterodímeros han mostrado en ensayos *in vivo* un incremento en el potencial osteogénico comparado con los homodímeros de las BMPs, mejorando la fusión espinal¹⁷ y en defectos en fémur en modelos animales.¹⁸

1.5 Terapia génica. Vectores adenovirales.

En un proceso normal del desarrollo y reparación del hueso, los factores de crecimiento osteoinductivos juegan un papel principal para reclutar células progenitoras osteogénicas en el sitio de formación del hueso y promover su diferenciación. Por lo tanto, la aplicación de ciertos factores que incluyen los factores de crecimiento recombinantes, en grandes áreas de hueso dañado, aumentaría la formación de nuevo hueso formado. Sin embargo, el problema es que los factores de crecimiento recombinantes tienen una vida media muy corta que limita su aplicación en el tejido dañado. Para cubrir esta limitación, se ha desarrollado la estrategia de transferencia de genes usando acarreadores celulares que mantengan el suministro de factores osteogénicos en el área del daño. La manipulación genética de las CMMs puede ser llevada a cabo por transducción con vectores virales, tales como los adenovirus (Ad), o transfección por vectores no virales como los liposomas.⁸ Los vectores adenovirales poseen los mejores índices de eficiencia de transducción. La mayoría están basados en

el adenovirus humano tipo 5 y dichos vectores son construidos con deleciones parciales o totales en los genes e1-a, e1-b y e3, necesarios para la replicación viral. La terapia adenoviral se ha usado *in vivo* o *ex vivo* y en ambas modalidades se han probado con éxito en mamíferos pequeños; sin embargo, la terapia *in vivo* en mamíferos grandes ha sido infructuosa, ya que la respuesta inmune que despiertan los adenovirus es tal que la osificación se inhibe casi totalmente. La terapia *ex vivo*, que en teoría limitaría esta respuesta, no ha sido probada en mamíferos mayores.

1.6 Soportes o andamios para formar implantes.

Las células madre son implantadas o sembradas en una estructura capaz de soportar la formación de tejido tridimensional. Estas estructuras, llamadas por lo general andamios, son importantes, tanto *ex vivo* como *in vivo*, para mantener un ambiente adecuado que permita que las células interactúen con su microambiente y deben ajustarse al defecto anatómico en estructuras en 3D. Esto se puede lograr a través de la experiencia quirúrgica o en el diseño de sistemas computarizados altamente sofisticados. Se debe proporcionar soporte de carga temporal hasta que se forme el nuevo tejido. La biodegradabilidad es a menudo un factor esencial, ya que los andamios deben ser absorbidos por los tejidos circundantes, sin la necesidad de una cirugía para su remoción. La velocidad a la que se produce la degradación tiene que coincidir tanto como sea posible con

la tasa de formación del tejido; esto significa que las células, mientras fabrican su propia estructura de matriz natural a su alrededor, el andamio sea capaz de proporcionar la integridad estructural dentro del cuerpo y con el tiempo se degrade dejando el nuevo hueso formado que se hará cargo de la carga mecánica.^{5, 19, 20} Existen en el mercado diferentes tipos de materiales con los que están hechos los andamios (naturales y sintéticos, biodegradables o permanentes). Ejemplos de estos materiales son el colágeno y algunos poliésteres. En términos generales, dentro del grupo de los materiales naturales están los derivados de hueso, que llegan a ser los de mayor utilidad, ya que cuentan con una pequeña fracción intrínseca de BMPs y son fácilmente reabsorbibles. La matriz ósea desmineralizada (MOD), es producida por la desmineralización (usando extracción ácida) de un aloinjerto que contiene colágeno tipo I, proteínas no colágenas y pequeñas cantidades de factores de crecimiento. Una gran cantidad de formulaciones de MOD están disponibles en el mercado, diferenciándose en los procesos de fabricación, ya que están disponibles en diferentes presentaciones como gránulos, tiras, masas, geles y en polvo seco congelado.^{21, 22}

1.7 Aplicación de implantes óseos en modelos animales.

Los modelos animales en investigación biomédica son cruciales para la generación de conocimiento en ciencia básica y aplicada que permiten

fundamentar y diseñar estudios clínicos. Aun teniendo el diseño experimental y planeación adecuados, si no se tiene un modelo animal preciso para la terapia que se quiere probar, 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 de probar en especies pequeñas. Los modelos ovinos han sustituido al trabajo en perros en ortopedia. Esto se debe sobre todo a la anatomía del hueso y articulaciones y la embriogénesis de estos artiodáctilos. Las ovejas son animales domésticos que pueden manejarse fácilmente y semejan a los humanos en cuanto a la carga que los huesos de las patas deben soportar continuamente. También poseen un tamaño adecuado para manipulación y múltiples procedimientos experimentales y son relativamente fáciles de estabular.²³

1.8 Antecedentes del grupo de trabajo.

Los principales retos en el área de implantes óseos son la generación de un material que acelere la osificación con una densidad ósea adecuada. A este reto de ingeniería tisular se ha adicionado el uso de células y genes para mejorar la calidad de los implantes. Un implante que albergue células para promover la

osificación es más ventajoso. Al menos tres factores son esenciales para el diseño de un implante "vivo": una matriz para andamiaje del tejido, células comprometidas a la diferenciación en osteocitos y la secreción activa de factores inductores de osteogénesis. Con este concepto, se han realizado trabajos preliminares en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular y en la Unidad de Terapia Génica y Celular del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), utilizando un implante de tres componentes, denominado I-3C, el cual consiste en un bloque de matriz ósea desmineralizada (MOD) embebida con células madre mesenquimatosas (CMMs) modificadas genéticamente para la secreción de proteínas morfogenéticas de hueso (se usó BMP2). Ensayos preclínicos en un modelo canino de distracción mandibular mostraron resultados muy promisorios.²⁴ Se pretendió generar un I-3C mejorado con CMMs transducidas con diferentes combinaciones de BMPs (usando vectores adenovirales). En una fase inicial se realizaron ensayos *in vitro* con un modelo tridimensional de cultivo, que permite estudiar los efectos de las combinaciones de transducción de las CMMs con dos tipos distintos de BMPs (combinaciones pareadas de las BMPs 2, 7 y 9) para determinar la combinación más efectiva para la diferenciación ósea (analizada mediante estudios de expresión de marcadores de tejido óseo maduro como colágeno tipo 1, osteocalcina, etc. y de calcificación de la matriz extracelular). Estos estudios se realizaron con técnicas moleculares, histológicas e inmunohistoquímicas. Los ensayos *in vivo* se realizaron en un modelo ovino con lesión diafisaria transtibial (lesión de carga). Se usó este modelo, porque en

este tipo de investigación los verdaderos retos terapéuticos para una extrapolación a la especie humana deben ser evaluados en una lesión sometida a carga en un mamífero.²⁵⁻³⁴

1.9 Justificación

La regeneración de tejidos es una meta ambiciosa y cada vez más plausible. En el caso de los huesos, esta habilidad se reduce prácticamente a la reparación de pequeñas fracturas y fisuras, pero cuando el deterioro es mayor no son capaces de reaccionar. La única alternativa para los pacientes con problemas en estas estructuras es su sustitución quirúrgica por prótesis. Los estudios terapéuticos con células madre adultas han impactado muy positivamente al área de la salud por su capacidad de diferenciarse a osteocitos y sintetizar una matriz adecuada para la regeneración ósea. Además, si éstas son modificadas genéticamente con genes osteoinductores y embebidas en una matriz extracelular, se puede plantear que ocurra una disminución significativa en el tiempo de consolidación ósea y una mejoría en la calidad del hueso neoformado. La creación de un implante de tres componentes constituido por CMMs autólogas modificadas genéticamente y embebidas en una matriz ósea desmineralizada, permitirá el desarrollo de un esquema de tratamiento que mejore la consolidación de lesiones óseas comunes (lesiones traumáticas) o de difícil tratamiento (osteoporosis), neoplásicas, periodontales o reconstructivas (defectos congénitos).

1.10 Objetivo general.

Probar un implante de tres componentes (matriz ósea, CMMs autólogas y genes para BMPs) con características biológicas y biomecánicas similares a las del hueso sano, que acelere la regeneración ósea en una lesión sometida a carga en el mamífero (*Ovis aries*).

1.11 Objetivos específicos.

- Aislar y caracterizar células madre mesenquimales de tejido adiposo de *Ovis aries*
- Evaluar la combinación de células mesenquimales, vectores adenovirales y matriz de hueso que resulte en una mejor diferenciación osteogénica.
- Evaluar el efecto del implante de 3 componentes seleccionado en una lesión tibial de mamífero (*Ovis aries*).
- Realizar estudios de bioseguridad y toxicidad, relacionados con el uso de adenovirus.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Equipo, materiales y reactivos.

2.1.1 Equipo.

- 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)
- OneStep Real Time PCR System 48W (Applied Biosystems Inc)
- Citómetro de flujo modelo CyAn ADP marca Dako (Carpenteria)
- Quirófano e instrumentación 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)
- Tomógrafo 3D marca GE
- Molino especial para hueso marca Retsch SM 100 Germany

2.1.2 Materiales y reactivos.

Cultivo celular. 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 200 mM 100X (GIBCO). Los materiales que se utilizaron para el cultivo celular fueron: botellas de cultivo de 25 cm² (Corning. Costar City, NY), botellas de cultivo de 75 cm² (Corning), botellas de cultivo de 150 cm² (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).

Estudios in vitro. Caracterización de CMMs y marcadores osteogénicos.

La Inmunofenotipificación de las CMMs se llevó a cabo con los siguientes marcadores de superficie: CD271-PE (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania), MSCA-1 (W8B2)-APC (Miltenyi Biotec GmbH), y CD45-FITC (Beckman Coulter, Brea, CA).

Para extraer el RNA a partir del cultivo primario de las CMMs se empleó el protocolo del reactivo TRIzol® (Invitrogen). El cDNA fue sintetizado a partir del RNA total usando SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix y hexámeros (Invitrogen). Cien nanogramos del cDNA sintetizado se utilizaron como templado para la amplificación por PCR en 25 µL de volumen de reacción utilizando Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI) y 500 nM de oligonucleótidos gen-específicos. Los marcadores que se analizaron para la caracterización de las CMMs por PCR en tiempo real fueron: CD45⁻, CD34⁻, CD166⁺, CD73⁺ y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) como gen endógeno. La secuencia de los oligonucleótidos y los tamaños de los productos están listados en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los genes utilizados para la PCR en tiempo real.

Gen	Oligonucleótidos 5'→3'	tm	Producto PCR (pb)
CD166*	F: CGCAATGCAACAGGAGACTA R: GGCTAGATCGAAGCTTGACG	60	217
CD73*	F: CTGAGACACCCGGATGAGAT R:ACTGGACCAGGTCAAAGGTG	60	160
CD34*	F: GGTGGCTGATACCGAACTGT R: TCAGCATCTTGGCTGTATGC	60	280
CD45*	F: CCACGGGTATTCAGCAAGTT R: CCCAGATCATCCTCCAGAAA	60	244
Col I	F:GGTGACAGGAAGTCCCAGAA R: CCATCGTAGGTGACGCTGTA	60	167
GAPDH	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: AAGCAGGGATGATGTTTTGG	60	194
Osteocalcina	F: GCAGCGAGGTGGTG R: CTCCTGGAAGCCGATGTG	60	148

*Secuencia diseñada sobre el genoma de *Bos Taurus* debido a que el genoma de *Ovis aries* no está ensamblado para este gen.

Para los ensayos de diferenciación osteogénica se emplearon los marcadores osteocalcina y colágeno tipo I (Col I). Tabla 1.

Vectores adenovirales. Se construyeron vectores adenovirales de primera generación, serotipo 5 con E1 y E3-deletado, que contiene una secuencia del promotor de CMV para el control de la expresión de las diferentes BMPs humanas. Para generar preparaciones con títulos altos, los vectores recombinantes fueron amplificados en células HEK-293 y purificados mediante tres gradientes sucesivos de cloruro de cesio. Posteriormente fueron dializados con Tris-ácido clorhídrico 10 mM, pH 7.4, cloruro de sodio 150 mM, cloruro de magnesio 10 mM, y sacarosa 4%, las preparaciones fueron distribuidas en alícuotas y almacenadas a -80°C. Los títulos virales fueron determinados mediante densidad óptica (O.D. 260 nm) y el método de TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50).

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 isofluorano (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% paca de sorgo a libre demanda.

Pruebas de toxicidad. Se utilizaron para cada borrego 2 tubos de tapa morada (BD Vacutainer® K₂EDTA 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 (McCormick Scientific Paraplast) después de una deshidratación acetona (CTR Scientific. Monterrey, México).

Histoquímicas e inmunohistoquímicas. Para realizar las inmunohistoquímicas se realizó un desenmascaramiento de antígenos con 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). 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), fucsina 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).

2.2 Métodos.

2.2.1 Aislamiento de CMMs ovinas de tejido adiposo.

Los animales se manejaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para el Manejo de Animales de Laboratorio (**NOM-062-ZOO-1999**) en las instalaciones de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL para la estabulación, alimentación, cuidados necesarios antes y después de las cirugías, así como el seguimiento postquirúrgico de las ovejas. También se contó con la aprobación del Comité de Ética del Hospital Universitario de la UANL con el número **BI12-003**.

Para extraer las células madre de ovejas, se llevó a cabo una lipectomía a partir de tejido adiposo de esternón, la cual consistió en lo siguiente: el borrego se anestesió completamente con ketamina 1 mL por cada 10 kg de peso. El área de cirugía se rasuró y desinfectó con isodine y posteriormente se cubrió con un

campo estéril. A partir de una incisión de alrededor de 5 cm, se obtuvieron aproximadamente 4 g de grasa subcutánea. Este tejido fue colocado en un tubo estéril con buffer PBS adicionado con antibiótico y antimicótico y transportado en hielo para su procesamiento en el laboratorio.

El proceso de extracción de CMMs se llevó a cabo en el laboratorio en condiciones completamente estériles en una campana de flujo laminar. La grasa se colocó en una caja de petri y con una navaja de bisturí se realizaron cortes lo más pequeño posible, tratando de eliminar restos de tejido y eritrocitos. Los trozos de grasa se colocaron en un recipiente estéril de plástico de boca ancha con tapa. Se agregaron 10 mL de PBS estéril y 5 mL de colagenasa I al 0.1 % en PBS estéril para disgregar la grasa a 37°C por 90 min en agitación media y constante. Posteriormente se recolectó la capa inferior del disgregado y se centrifugó por 10 min a 1500 rpm. Se retiró el sobrenadante con mucho cuidado de no tomar del precipitado que contiene las CMMs y se eliminó. Por otra parte se realizaron 2 lavados con PBS estéril al recipiente que contenía el disgregado para recuperar lo más posible las células atrapadas en la grasa y se juntaron con el precipitado anterior que contenía las células madre. El precipitado se resuspendió y colocó en una botella de cultivo de 75 cm², se agregaron 10 mL de medio de cultivo Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) que contenía 10% de suero bovino fetal (SBF) y 4X de antibiótico y antimicótico y se incubó a 37°C y 5% CO₂. El medio fue cambiado al tercer día e incubado hasta alcanzar una confluencia del 80% (7 a 12 días) para realizar los ensayos.

2.2.2 Caracterización de CMMs.

2.2.2.1 Citometría de flujo.

Las CMMs fueron levantadas con Tripsina 1X e incubadas por 15 min a 37°C. Las células fueron lavadas con PBS, se contaron 1×10^7 células y fueron entonces incubadas con anticuerpos monoclonales en contra de CD271-PE, MSCA-1 (W8B2)-APC y CD45-FITC. La Inmunofenotipificación fue desarrollada en un citómetro modelo CyAn ADP de Dako (CA).

2.2.2.2 PCR en tiempo real.

Las CMMs fueron levantadas con buffer de fosfatos salino (PBS) + EDTA e incubados por 15 minutos a 37 °C. Las células se caracterizaron a partir del primer pasaje, con una alícuota de 1×10^6 células analizando marcadores de expresión por PCR en tiempo real (CD45⁻, CD34⁻, CD166⁺, CD73⁺). Para ello el RNA se extrajo del cultivo primario de las CMMs. El cDNA fue sintetizado a partir del RNA total y 100 ng del cDNA sintetizado se utilizaron como templado para la amplificación por PCR en 25 µL de volumen de reacción utilizando Taq DNA polimerasa y 500 nM de oligonucleótidos gen-específicos.

2.2.3 Ensayos *in vitro* para evaluar la diferenciación osteogénica de CMMs.

2.2.3.1 Ensayos de transducción y co-transducción con vectores adenovirales AdBMP2, AdBMP7 y AdBMP9.

Se evaluó la expresión y producción de osteocalcina y colágeno tipo I por PCR en tiempo real y por western blot, además de estudios histológicos para observar morfología celular y la producción, estructura y localización de materia amorfa de la matriz extracelular (fibras de colágeno) a los tiempos 0, 4, 8, 16 y 32 días post-transducción. Los ensayos de transducción fueron divididos así: AdBMP2, AdBMP9, AdBMP7, AdBMP2/7, AdBMP2/9 a una multiplicidad de infección (MOI) de 100 para las pruebas de cada vector y 50 MOI para los ensayos de combinación.

Se sembraron 90,000 CMMs por pozo en placas de 6 pozos y se dejaron incubando durante toda la noche. Luego se llevaron a cabo transducciones con AdBMP2, AdBMP9, AdBMP7, AdBMP2/9, AdBMP2/7. Los adenovirus fueron resuspendidos en 1 mL de medio DMEM y se dejaron incubando en contacto con las células durante 3 h. Para estos ensayos se tomaron en cuenta diferentes controles: células estimuladas con medio osteogénico (medio DMEM Advanced suplementado con 10% de SFB, 50 μ M de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerol-fosfato y 100 nM de dexametasona) y un control más de células sin estímulo.

Después de las transducciones, se realizaron extracciones de RNA a los tiempos 0, 4, 8, 16 y 32 días con Trizol (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Además se extrajeron proteínas para los ensayos de Western blot.

2.2.3.2 Ensayos de expresión de los marcadores osteogénicos, osteocalcina y colágeno tipo I por PCR tiempo real, cuantificación relativa.

Después de realizados los ensayos de transducción y extracciones de RNA a los 0, 4, 8, 16 y 32 días, se cuantificó el RNA y se procedió a realizar la síntesis de cDNA con el estuche SSIII First-Strand Super Mix (Invitrogen), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este procedimiento está descrito para utilizar desde 1 pg hasta 5 µg de RNA total. Se evaluó la expresión de los genes de GAPDH como gen endógeno, osteocalcina y colágeno tipo I, con una mezcla de los cDNAs correspondientes a los diferentes tratamientos a una concentración de cDNA de 100 ng/µL. La reacción se realizó con el estuche SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix (Invitrogen). La PCR en tiempo real fue desarrollada en un equipo OneStep Real Time PCR System 48W (Applied Biosystems Inc).

Para la interpretación de los resultados, los valores obtenidos de las células sin transducir (control negativo), se restaron a los valores de los grupos experimentales. Las reacciones se llevaron a cabo por triplicado y los niveles de

expresión fueron calculados por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta Ct = (\text{promedio de Ct muestra}) - (\text{promedio de Ct endógeno})$, y $\Delta\Delta Ct = (\text{promedio de } \Delta Ct \text{ muestra}) - \Delta Ct \text{ negativo}$).

2.2.3.3 Ensayos de Western blot.

Los ensayos de WB se realizaron para verificar la producción de la proteína osteocalcina y colágeno tipo I en las CMMs estimuladas con el vector AdBMP2 y la combinación AdBMP2/AdBMP7, así como el control positivo. Las células del día 16 fueron lisadas para extraer las proteínas y cuantificadas por el método de Bradford.

2.2.3.4 Análisis histológico de la osteogénesis *in vitro* de CMMs transducidas con las BMPs.

CMMs extraídas de tejido adiposo de borrego se aislaron y transdujeron con los vectores adenovirales generándose los siguientes grupos experimentales: control negativo CMMs en DMEM adicionado con 10% de suero bovino fetal; control positivo CMMs en medio osteogénico (dexametasona 100nM); grupo A CMMs transducidas con AdCMVBMP2h; grupo B CMMs transducidas con AdCMVBMP9h; grupo C CMMs transducidas con la combinación BMP2h/BMP7h; grupo D CMMs transducidas con la combinación BMP2h/BMP9h. Las

transducciones se hicieron a una MOI de 100. Se analizó la morfología celular y colágeno (T. Masson), depósitos de calcio (von Kossa) y producción de colágenos tipos I y II (IHQ) a los 1, 8, 16 y 32 días post-transducción.

2.2.4 Obtención de la Matriz de Hueso Desmineralizado (MOD).

La MOD fue obtenida a partir de hueso esponjoso de ovino. Los huesos se trituraron en un molino especial para hueso. Se eliminaron por completo los restos de sangre y grasa con una solución de H₂O₂ 3% y agua destilada, estéril y caliente. Posteriormente se llevó a cabo la desmineralización del hueso con una solución de HCl 0.6 N por 24 horas. Se hicieron lavados con agua destilada y estéril y se neutralizó con una solución amortiguadora de fosfatos a un pH 7.0. El hueso molido y desmineralizado fue liofilizado a -0.070 mbar a -45°C por 24 horas y posteriormente esterilizado con radiación gamma.

2.2.5 Ensayos de adherencia celular.

Por otra parte se realizaron ensayos de adherencia celular sembrando 1×10^6 CMMs transducidas con AdGFP y después de 24 h de incubación fueron adicionadas a MOD. Fueron observadas por microscopía de fluorescencia a las 24, 48, 72 y 96 h.

2.2.6 Modelo animal.

Se utilizaron ovejas de la raza pelibuey, hembras entre 4 y 6 meses de edad y un peso entre 15 a 20 kilogramos.

2.2.6.1 Grupos experimentales y tamaño de la muestra.

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

Grupo control 1: Sin implante **(S-I)**

Grupo control 2: Implante con Células Madre Mesenquimales **(I-CMMs)**

Grupo implante de 3 componentes: implante con células madre mesenquimales modificadas genéticamente con AdBMP2/7 **(I-3C)**

Para determinar el número de animales de experimentación requeridos para este estudio se realizó el siguiente planteamiento estadístico: con una proporción calculada de 86% (6/7) de encontrar hueso neoformado (I-3C) y una proporción calculada de 43% (3/7) de no encontrar hueso neoformado (G2) con alfa de 5% y beta de 80% y dos direcciones, se requieren 7 individuos por grupo.

Estudio con una proporción

$(Z_a(\sqrt{p_0(1-p_0)}) - Z_b(\sqrt{p_1(1-p_1)})) / (\sqrt{p_0 - p_1})^2$
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 proceso de selección se llevó a cabo de una forma aleatorizada: se realizaron 21 sobres con los números de las ovejas y con el grupo correspondiente y se fueron abriendo conforme se realizaban las cirugías para asignar las ovejas a los grupos experimentales.

2.2.7 Implantes autólogos.

La extracción de las células madre de cada uno de las ovejas fue descrita en párrafos anteriores. Las células fueron sembradas y expandidas en medio de cultivo DMEM, 10% de suero bovino fetal y antibiótico 1X hasta obtener una cantidad de 10 millones de CMMs, que es la cantidad que se colocó en cada implante. Alcanzada dicha cantidad, las CMMs fueron resuspendidas en 3 mL de medio de expansión y sembradas en aproximadamente 1 cm³ de la matriz de hueso desmineralizado (tamaño de la lesión) en una placa de 24 pozos.

Inmediatamente este implante se llevó al quirófano de la Facultad de Veterinaria y Zootecnia donde se realizó la cirugía para su implante.

2.2.8 Cirugía de distracción ósea.

2.2.8.1 Anestesia.

Se preparó al animal mediante un proceso pre-anestésico administrando ketamina (1 mL por cada 10 kg) y posteriormente xilazina (0.5 mL por cada 1 kg). Ya que el animal estaba sedado, se procedió a intubarlo con laringoscopio y sonda intratraqueal del calibre adecuado dependiendo del borrego. Una vez intubado, se administró inicialmente isoflurano al 5% y se continuó la administración del anestésico durante la cirugía con 1-2 % de oxígeno.

2.2.8.2 Osteotomía diafisaria de tibia + fijación interna con placa DCP y tornillos.

Previo protocolo de asepsia y antisepsia con el animal en decúbito lateral. Se realizó abordaje en la cara medial de la diáfisis tibial posterior. Se retiró periostio de cara medial de tibia, se identificó centro de la diáfisis tibial, se retiró un bloque óseo de 10 mm de longitud con la ayuda de una sierra manual, se regularizaron los bordes. Posteriormente se colocó una placa DCP 3.5 mm de 9 orificios en la

cara medial de la tibia, se verificó que se mantuviera la distracción ósea de 10 mm en la tibia. Posteriormente se realizaron perforaciones en la tibia con una broca de 2.8 mm, se colocaron 4 tornillos proximales y 4 distales a la osteotomía. Se suturó la piel con puntos continuos de Vycril 2-0. Al final de la cirugía las ovejas fueron colocadas en jaulas metabólicas individuales durante el proceso de recuperación postquirúrgica aproximadamente por 7 días.

2.2.9 Ensayos de regeneración ósea.

2.2.9.1 Análisis radiográfico y tomografía 3D.

La posición correcta del implante fue confirmada por radiografía inmediatamente después de la intervención quirúrgica y un seguimiento cada 3 semanas por 10 semanas, para observar la formación de nuevo hueso en el sitio de la lesión. Se obtuvieron 5 radiografías a los diferentes tiempos de seguimiento para cada una de las ovejas. Las ovejas fueron sacrificadas a las 10 semanas de observación por la administración intravenosa de una solución de fenobarbital-KCl; se escindió la zona del hueso donde se realizó la lesión para evaluar la calidad del hueso neoformado. Primeramente para corroborar los hallazgos encontrados por las radiografías, se realizó una tomografía computarizada del fragmento en la zona de la lesión de las ovejas de cada grupo. Las imágenes de la tomografía muestran a detalle la forma, estructura y la densidad del hueso nuevo formado

que presenta cada grupo en estudio, lo cual se discutirá con más detalle en el capítulo de resultados.

2.2.9.2 Ensayos de resistencia biomecánica.

También se hicieron cortes del área del hueso tratado y consolidado de cada grupo para ensayos de resistencia biomecánica (ensayos de compresión) que se realizaron en la Facultad de Ingeniería Mecánica y Eléctrica de la UANL, en el laboratorio de Biomateriales, donde cuentan con un equipo que mide la resistencia a la compresión del hueso neoformado y poder así comparar su grado de deformación con respecto al hueso original.

2.2.9.3 Análisis histológico.

Las áreas de hueso tratadas se fijaron con formalina y glutaraldehído por 7 días, se descalcificaron con ácido fórmico 10% por dos semanas y HCl 2N por 24 h. Posteriormente fueron deshidratadas en alcohol e incluidas en parafina para tinción de HyE, tricrómico de Masson (replamamiento celular y síntesis de matriz colágeno, respectivamente). Para las inmunohistoquímicas se realizó un pretratamiento de las muestras en buffer de citratos pH 6 que 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) y colágeno II (cartílago hialino).

2.2.10 Estudios de bioseguridad y toxicidad.

Los análisis de seguridad se llevaron a cabo para evaluar el posible efecto de los vectores adenovirales sobre los animales, (lesiones hepáticas inflamatorias). Se realizaron perfiles de función hepática y biometrías hemáticas a cada animal un día antes de la toma de tejido adiposo y 20 días después de la cirugía de implante. Para cada uno de los borregos se hicieron dos tomas de sangre a partir de la vena yugular. En cada toma se llenaron dos tubos: uno de sangre completa para hacer la biimetría hemática y otro sin anticoagulante para separar el suero y hacer el perfil de función hepática.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Caracterización de las CMMs.

3.1.1 Microscopía en campo claro.

Las características morfológicas de las CMMs fueron observadas al día 14 de cultivo por microscopía de campo claro, en donde se pudo apreciar la forma fibroblastoide característica de las células inmaduras. Figura 1

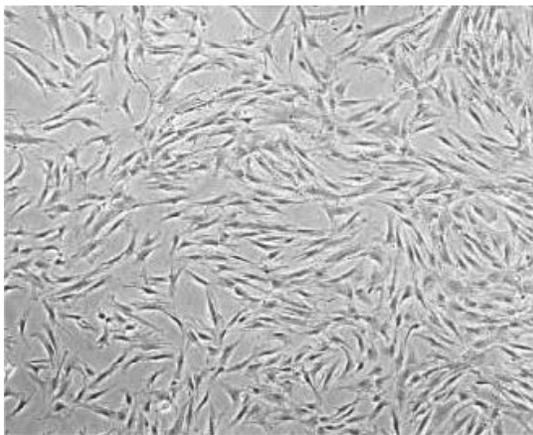


Figura 1. CMMs 80% confluencia al día 14 de cultivo

3.1.2 Citofluorometría y PCR en tiempo real.

El fenotipo de las CMMs fue confirmado por análisis citofluorométrico. Las CMMs aisladas constituyeron el 85% de la población doble positiva para los antígenos de superficie CD271 y MSCA-1. Se concluyó que dicho porcentaje fue suficiente para confirmar el fenotipo de esas células para los subsecuentes experimentos.

Figura 2

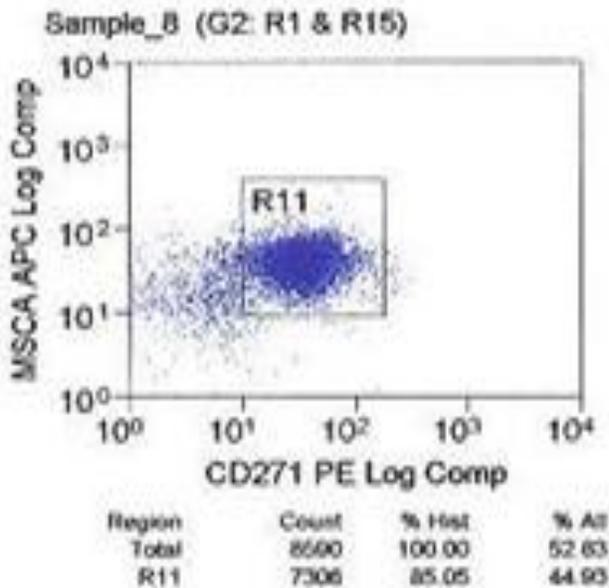


Figura 2. Diagrama de MSCA vs CD271, demostrando la doble positividad de los antígenos de superficie características de las células inmaduras.

Además la caracterización de las CMMs por qPCR demostró la presencia de marcadores de expresión característicos de esas células: CD45⁻, CD34⁻, CD166⁺ y CD73⁺. Figura 3.

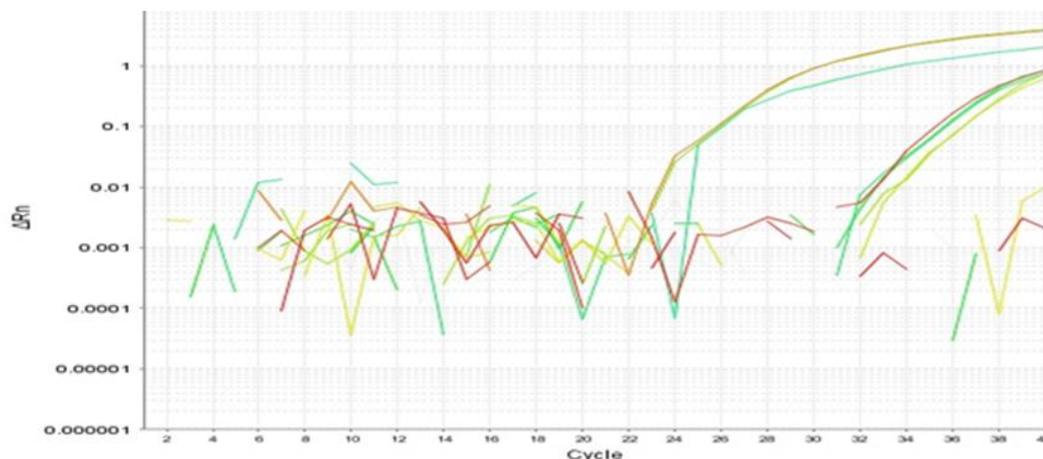


Figura 3. Marcadores de expresión de células madre mesenquimales por PCR en tiempo real: CD45⁻, CD34⁻, CD166⁺, CD73⁺.

3.2 Ensayos de expresión por PCR en tiempo real.

En las células estimuladas con medio osteogénico (CP control positivo) se observó que en general la expresión de ambos genes aumentó al incrementar el tiempo. La expresión con colágeno tipo I fue mayor que la expresión de osteocalcina, pero ambas proteínas mostraron el mismo comportamiento en cuanto a tiempo y tratamiento con adenovirus: al día 16, la BMP9 mostró una mayor expresión que el resto de las BMPs, sin embargo la combinación de BMP2/BMP7 es la que mantuvo su expresión por mayor tiempo en los dos genes incluso hasta el día 32. Figura 4

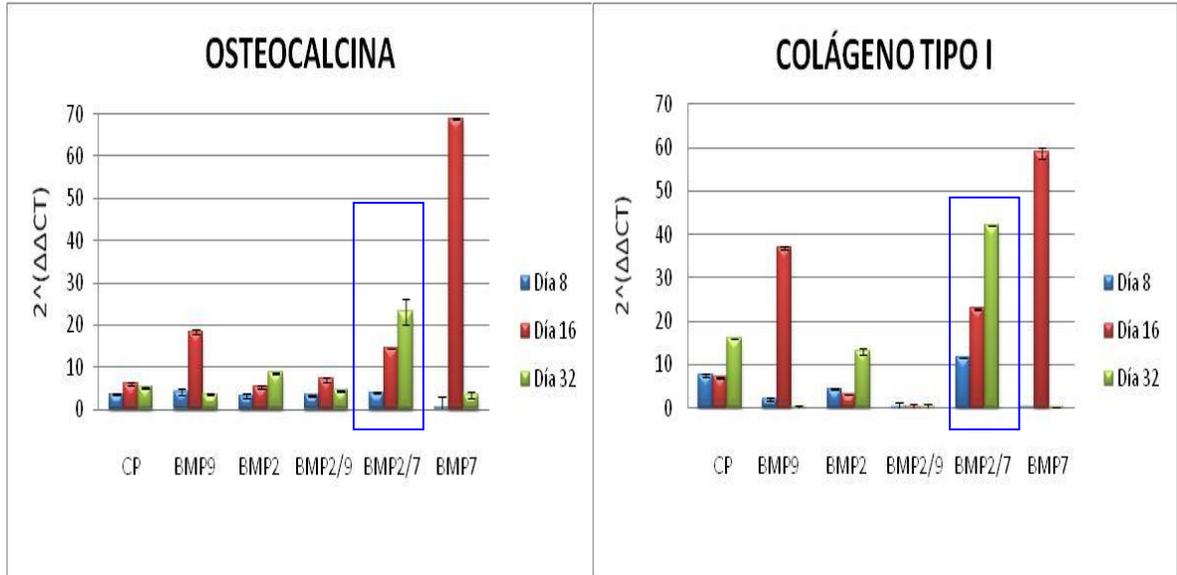


Figura 4. Ensayos de expresión por PCR en tiempo real para marcadores de hueso (osteocalcina y colágeno tipo I), de diferentes tratamientos a diferentes tiempos.

Como se discutirá más adelante, se observó efecto citotóxico en el tratamiento con BMP9 desde el día 16, lo cual explica las bajas expresiones de los genes blancos en los días 16 y 32 en las células tratadas con el vector AdBMP9 solo o en combinación.

3.3 Ensayos de Western blot.

Los ensayos de WB demostraron la presencia de proteínas que son marcadores de diferenciación osteogénica, osteocalcina y colágeno tipo I en las CMMs estimuladas con el vector AdBMP2 y la combinación AdBMP2/AdBMP7, así como el control positivo. Figura 5

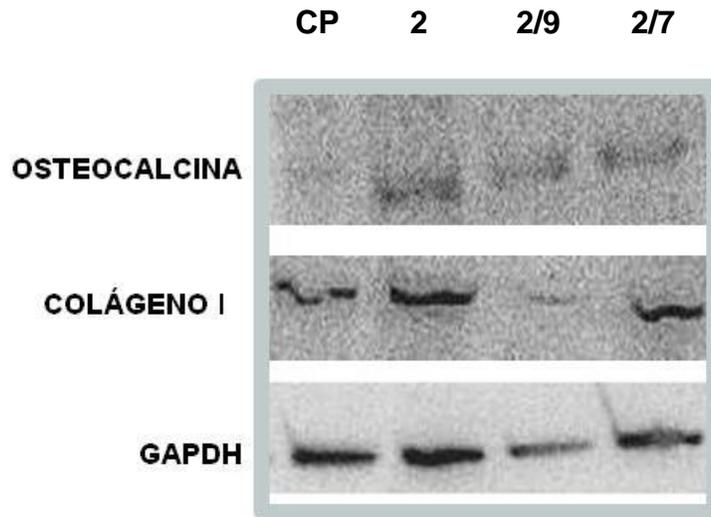


Figura 5. Ensayos de Western blot. Se analizó la producción de osteocalcina y colágeno tipo I en las CMMs estimuladas con el vector AdBMP2 y la combinación de AdBMP2/7 y AdBMP2/9, así como el control positivo al día 16 de cultivo. GAPDH se utilizó como control.

3.4 Análisis histológico *in vitro*.

Es evidente la inducción de osteogénesis debida a la transducción con BMPs, esto comparando con los controles positivo y negativo. Al día 32 se observó una notable tinción azul por el método T. Masson que denota la presencia de colágeno. Este cambio se observó principalmente en CMMs transducidas con BMP2. Se observaron mallas de colágeno I que cubren a las células a partir del T16. La malla presente en las CMMs transducidas con BMP9 es más nítida. Sin embargo, en la combinación BMP2/BMP9 la malla de colágeno cubre una mayor área, lo que denota una mayor producción de colágeno I. Figura 6

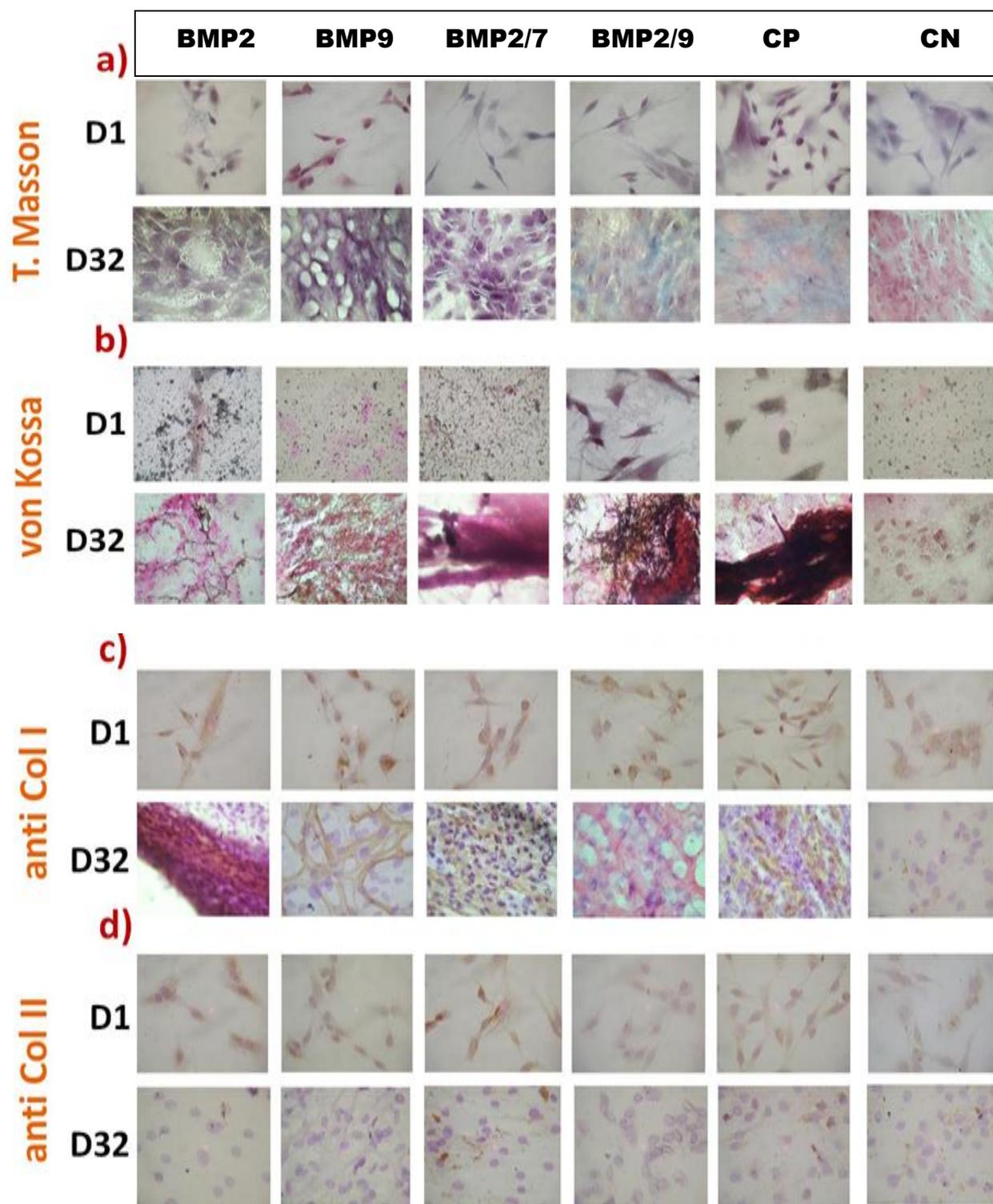


Figura 6. Micrografías del día 1 y 32 de cultivo. **a)** Tricrómico de Masson identificación de colágeno y materia amorfa. **b)** von Kossa para apreciar calcificaciones. **c)** Inmunotinción para colágeno I. **d)** Inmunotinción para colágeno II.

En la tinción de von Kossa el calcio que se identificó disperso en los cubreobjetos al día 4, se comenzaron a localizar de acuerdo a la organización celular al día 32, observándose mayormente en los tratamientos de las combinaciones de las BMPs. Figura 6

En cuanto a la inmunohistoquímica, se demostró la presencia de colágeno tipo I al día 32, denotado por una malla de color café que rodea a las células, sobre todo en las combinaciones de las BMPs, no así para el colágeno tipo II. Figura 6

3.5 Análisis radiográfico.

Los resultados de regeneración ósea, evaluados por el seguimiento radiográfico, demostraron que en el grupo I-3C ocurrió una consolidación ósea en menor tiempo, ya que para la semana 7, el espacio donde se realizó la lesión, se observó llenado completamente por hueso nuevo. Por el contrario el grupo S-I y I-CMMs lo hizo hasta la semana 10 e incluso algunos no alcanzan su completa consolidación en el período de seguimiento. Figura 7. Además en las radiografías se pudo apreciar que en los grupos control se formó un hueso calloso que creció de manera desordenada en la región de la lesión y que ocasionó la deformidad del hueso. En el grupo I-3C, el llenado de tejido óseo fue de una manera uniforme, dejando el hueso de aspecto y consistencia parecido al hueso sano. En la Figura 8, se muestra una radiografía representativa de cada grupo a la semana 10 donde

se pudo observar la completa consolidación del grupo del implante de tres componentes.

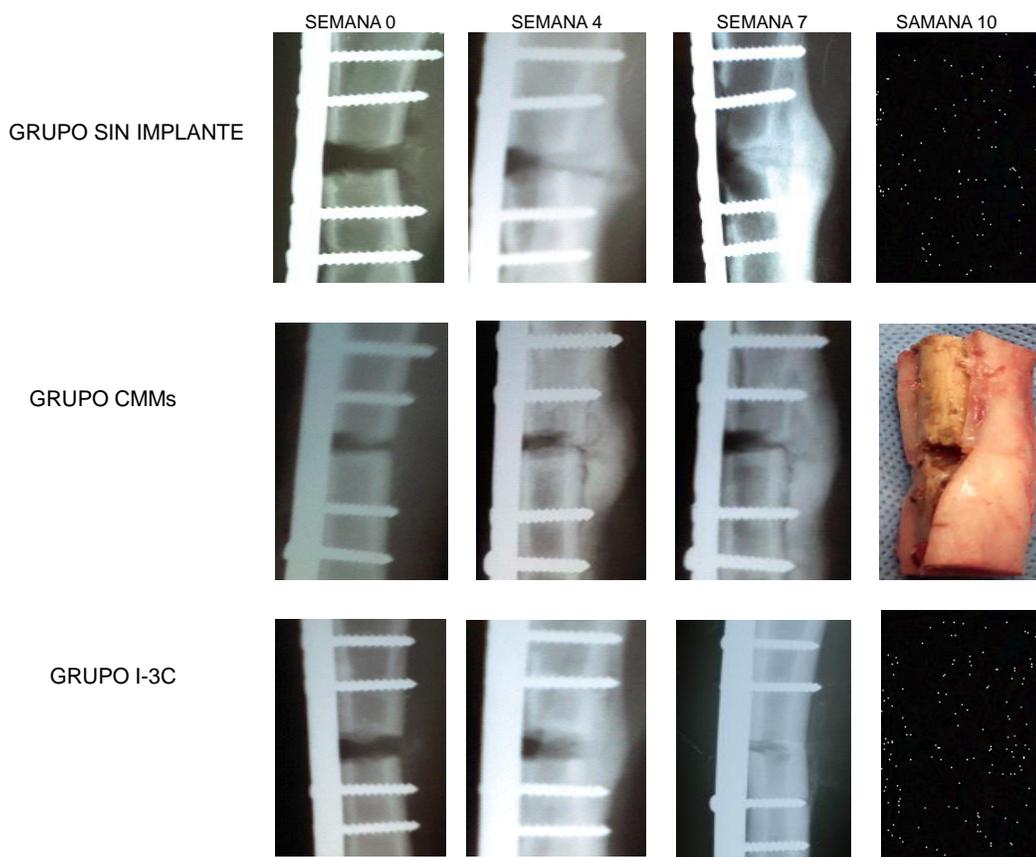


Figura 7. Radiografías y fotografías de un miembro representativo de cada grupo desde el día de la cirugía hasta la semana 10 del sacrificio.

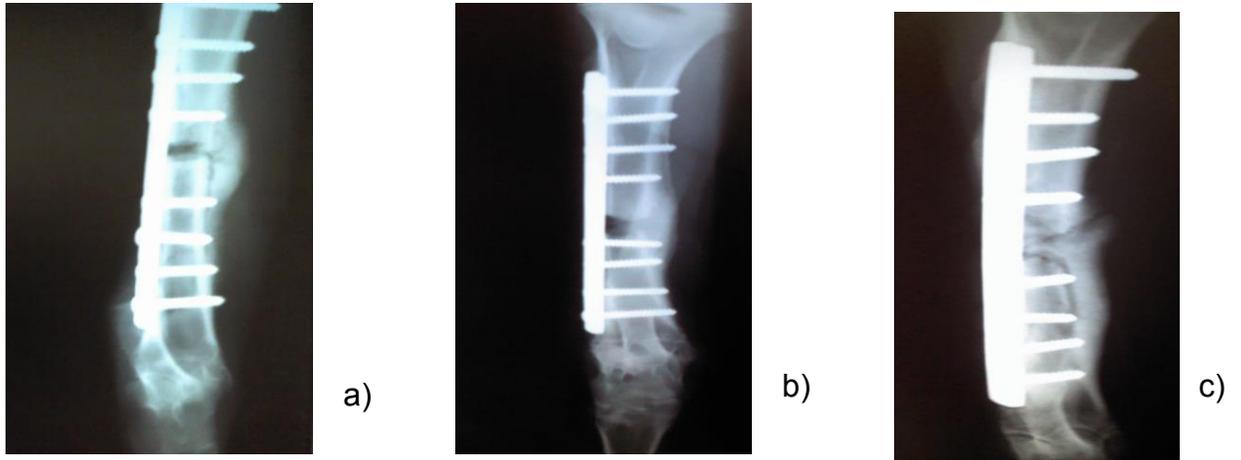


Figura 8. Radiografías representativas de cada grupo de experimentación a la semana 10 de seguimiento: a) Grupo S-I; b) Grupo I-CMMs y c) Grupo I-3C.

3.6 Tomografía computarizada.

La Figura 9 corresponde a un corte sagital de los huesos de cada oveja por grupo. Se observó que en las tibias normales (no fueron sometidas a cirugía), su estructura fue uniforme, simétrica y se observó una zona bien definida entre la zona cortical y la zona medular. En el grupo S-I y I-CMMs, se observó que los huesos están totalmente deformados por la formación de callosidad en la zona de la lesión, no hay una proporción definida entre la zona cortical y la medular con respecto a las tibias normales. En el grupo con el implante de tres componentes, los huesos fueron más uniformes, de aspecto y tamaño parecidos a las tibias normales. Figura 10

Evaluación de un Implante de Células Madre Mesenquimales Modificadas Genéticamente con Proteínas Morfogenéticas de Huesos para la Osteogénesis en Ovis aries

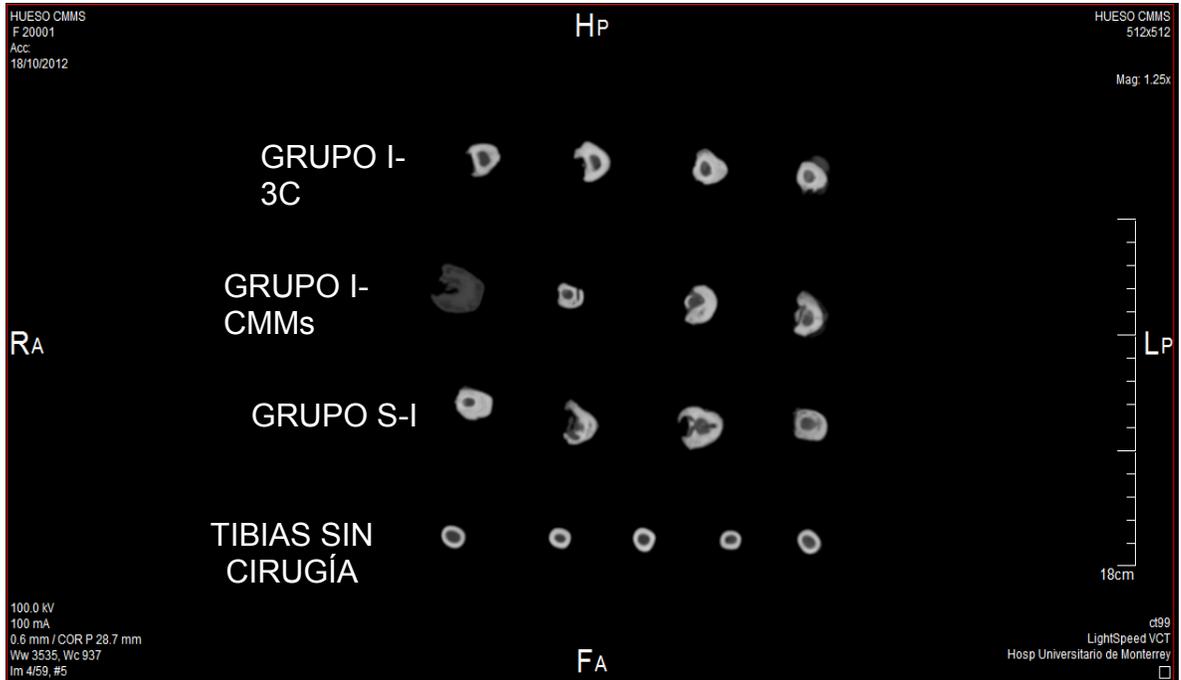


Figura 9. Tomografía computarizada de corte sagital de los huesos de oveja a la semana 10 de la cirugía representadas por cada grupo en estudio.



Figura 10. Tomografía computarizada 3D de la zona de la lesión de cada oveja por grupo de estudio a la semana 10 de la cirugía.

3.7 Ensayos de compresión.

Para evaluar la resistencia a la compresión del hueso neoformado, se construyeron las gráficas de esfuerzo vs. deformación de la zona del hueso donde se encontraba la lesión de cada una de las ovejas y poder así comparar su grado de deformación con respecto al hueso original. Figura 11. En la Tabla 2 se muestran los resultados del análisis de comparación múltiple donde la variable dependiente es la elasticidad.

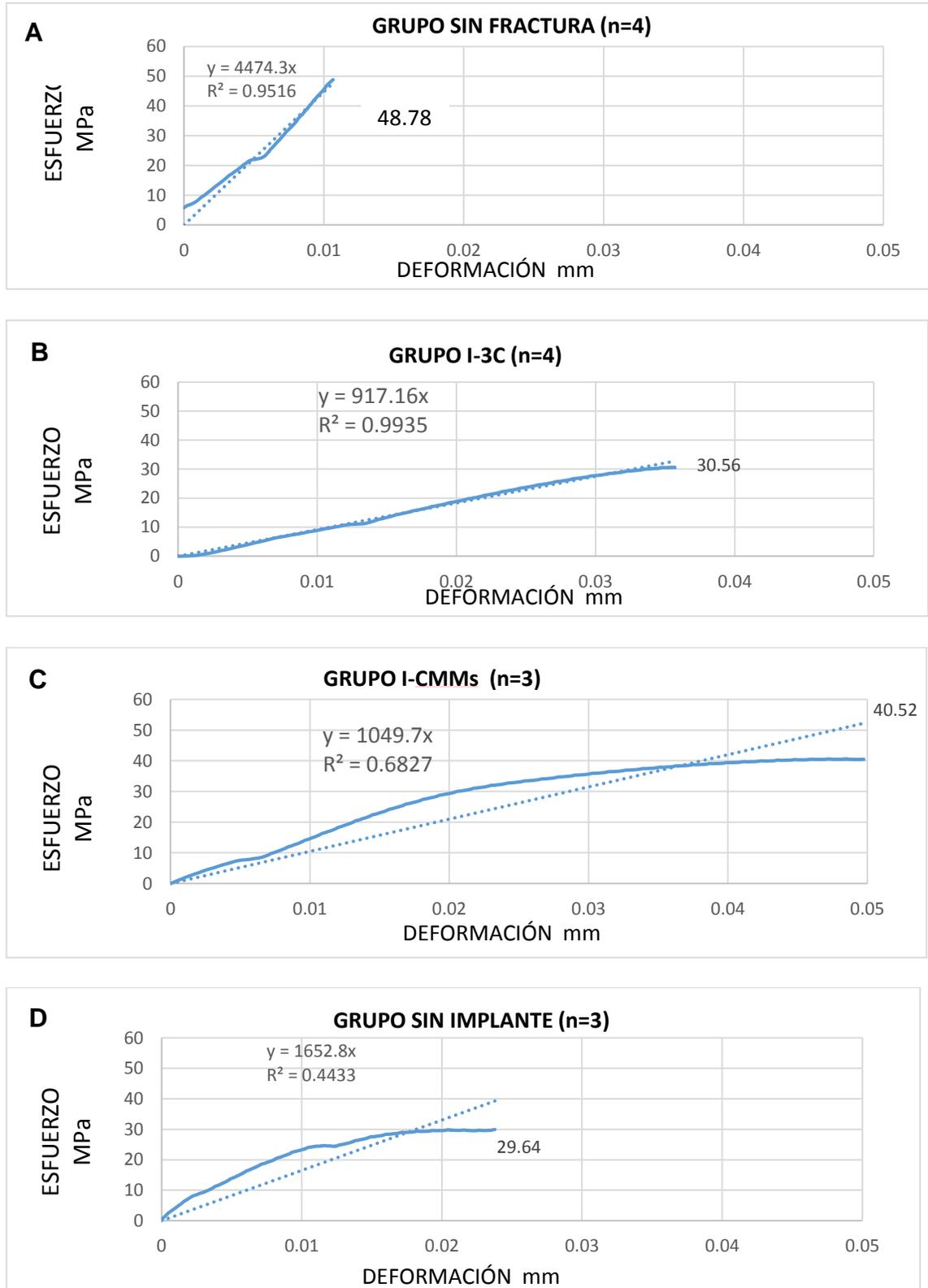


Figura 11. Gráficas representativas de cada grupo en estudio para evaluar la de resistencia a la deformación. Esfuerzo vs. Deformación: A, grupo sin fractura; B, grupo I-3C; C, grupo I-CMMs; D, grupo sin implante.

Tabla 2. Prueba de hipótesis de comparación múltiple donde la variable dependiente es la elasticidad (pendiente del ajuste lineal) de cada grupo en estudio.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: elasticidad

	(I) id grupo	(J) id grupo	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Scheffe	1.00	2.00	797.24909	970.99389	.877	-2388.1883	3982.6864
		3.00	-1684.7922	891.91484	.359	-4610.8032	1241.2188
		4.00	45.04647	970.99389	1.000	-3140.3909	3230.4838
	2.00	1.00	-797.24909	970.99389	.877	-3982.6864	2388.1883
		3.00	-2482.0413	1015.48972	.174	-5813.4514	849.3688
		4.00	-752.20262	1085.60418	.921	-4313.6299	2809.2246
	3.00	1.00	1684.79220	891.91484	.359	-1241.2188	4610.8032
		2.00	2482.04129	1015.48972	.174	-849.3688	5813.4514
		4.00	1729.83867	1015.48972	.443	-1601.5715	5061.2488
	4.00	1.00	-45.04647	970.99389	1.000	-3230.4838	3140.3909
		2.00	752.20262	1085.60418	.921	-2809.2246	4313.6299
		3.00	-1729.8387	1015.48972	.443	-5061.2488	1601.5715

3.8 Ensayos histológicos *in vivo*

En la Figura 12 observamos la tinción de HyE a la semana 10 de la cirugía. El inciso **(A)**, corresponde a un corte histológico del grupo sin fractura donde se observó una delgada “membrana conjuntiva” que corresponde al Periostio. El tejido óseo bien preservado, mostró una matriz ósea (MO) muy compacta y uniforme, constituida por osteocolágena, inmersa en ella se ven lagunas de células óseas (osteocitos) y vasos sanguíneos del sistema laminar óseo. En el grupo S-I, el periostio se engrosó y la corteza ósea se compone principalmente de hueso trabecular con áreas que mostraron tejido fibroso denso. Hacia el interior, la fibrosis fue abundante, con poco hueso esponjoso, no hay cartílago

hialino y predomina el material amorfo y fibrilar. Además se observó infiltrado de linfocitos, plasmocitos y algunos macrófagos **(B)**. El grupo I-CMMs, presentó engrosamiento del periostio y la corteza ósea mostró la formación de tejido fibrocolagenoso muy vascularizado. Se presentaron pequeñas áreas de cartílago hialino hipertrófico en el centro de la lesión y amplias zonas constituidas de tejido fibroso **(C)**. En el grupo I-3C, el periostio fue delgado y poco fibroso, presentó abundantes células estrelladas y fusiformes en diferenciación. Se observó abundante hueso esponjoso con buena consolidación del tejido presentando una matriz uniforme y compacta, no presentó cartílago. La proporción de tejido óseo compacto fue mayor **(D)**.

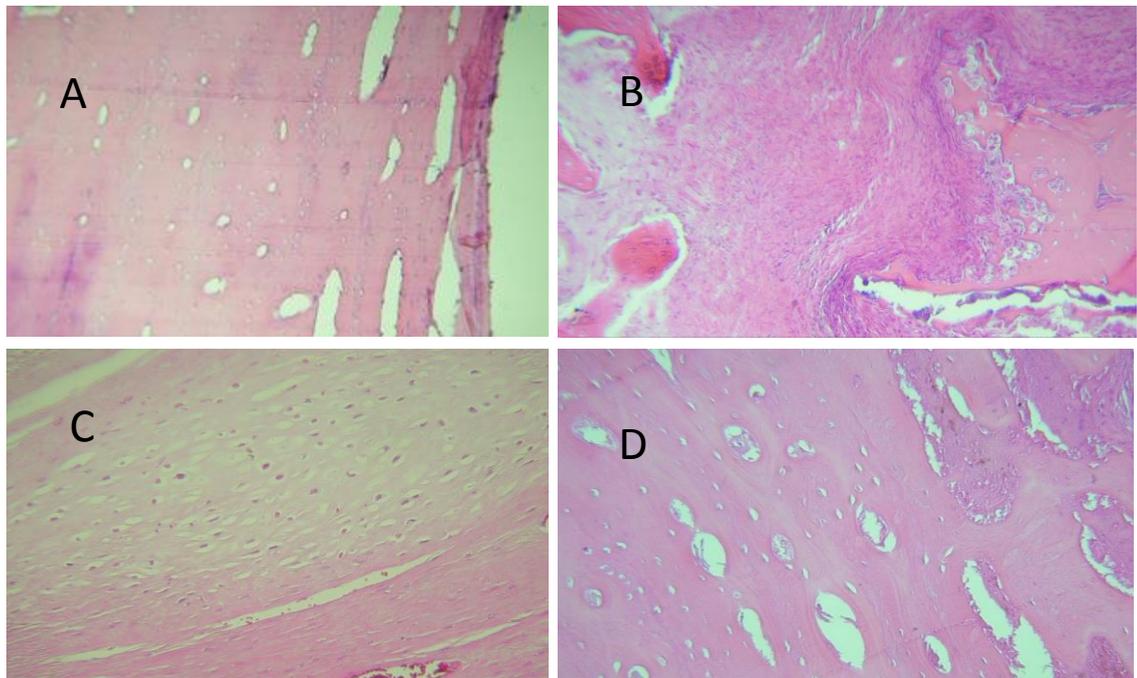


Figura 12. Evaluación histológica de la zona de la lesión; tinción de HyE a 10 semanas de la cirugía. A, grupo sin fractura; B, grupo sin implante; C, I-CMMs; D, I-3C. 10X

La Figura 13 corresponde a la tinción de tricrómico de Masson para demostrar la producción de matriz de colágeno. En el grupo I-3C **(D)** hubo mayor formación de tejido óseo, la matriz ósea muy compacta y uniforme a diferencia del grupo sin implante que en su mayoría presentó tejido fibroso y materia amorfa **(B)**.

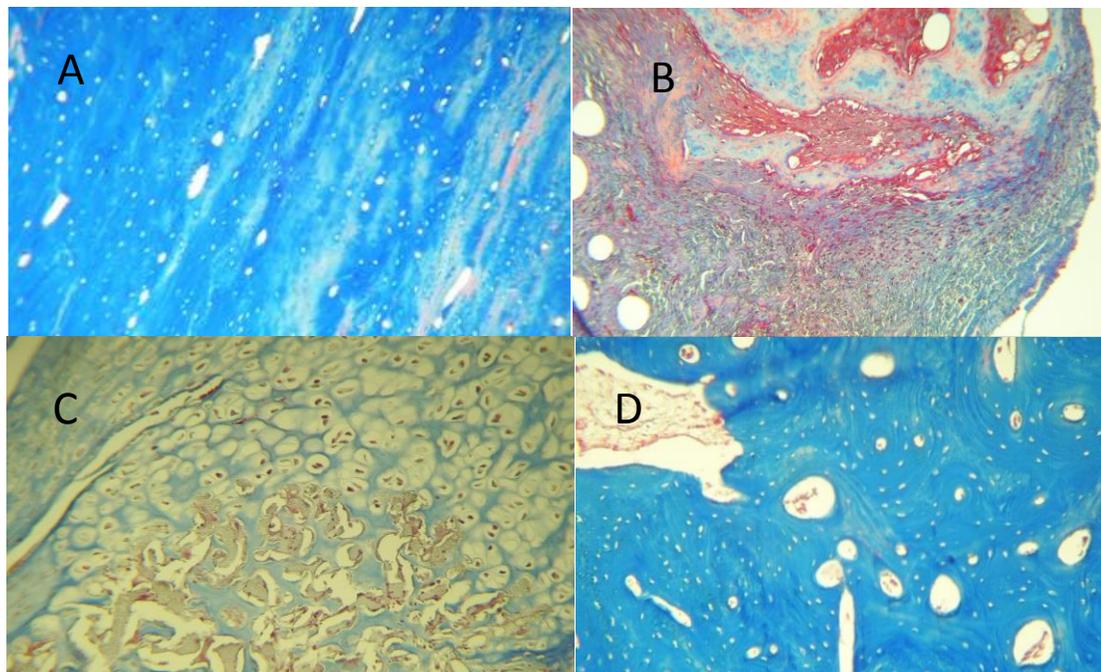


Figura 13. Evaluación histológica de la zona de la lesión; tinción de tricrómico de Masson a 10 semanas de la cirugía. A, grupo sin fractura; B, grupo sin implante; C, I-CMMs; D, I-3C.

Las reacciones inmunohistoquímicas para colágeno tipo I fueron positivas en los tres grupos y para el colágeno II fue muy escasa en las áreas focales de cartílago hialino del grupo I-CMMs.

3.9 Estudios de bioseguridad y toxicidad

En cuanto a los estudios realizados para evaluar la seguridad con el uso de adenovirus en muestras sanguíneas, en la Tabla 3 se muestran las pruebas de laboratorio que se realizaron antes y tres semanas después de la cirugía. Observamos que en general todos los resultados se mantuvieron dentro de los valores normales reportados para esa especie, demostrando que no hubo procesos inflamatorios ni alteraciones en las pruebas de funcionamiento hepático que mostraran algún daño a nivel sistémico.

Tabla 3. Estudios de toxicidad relacionados con el uso de vectores adenovirales

		GRUPO SIN IMPLANTE		GRUPO MATRIZ + CMMs		GRUPO IMPLANTE 3C	
		PRE CX	POST CX	PRE CX	POST CX	PRE CX	POST CX
PARÁMETRO ANALÍTICO	RANGO DE REFERENCIA	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO	PROMEDIO
Leucocitos (μL)	4000–12000	5507.5 \pm 0.3	11086 \pm 0.3	9748.3 \pm 0.3	8375 \pm 0.2	11251.7 \pm 0.5	8758.3 \pm 0.3
Hemoglobina (g/dL)	9–15	11.9 \pm 0.2	9.72 \pm 0.1	10.2 \pm 0.2	10.3 \pm 0.1	10.7 \pm 0.1	10.1 \pm 0.1
Plaquetas (miles / μL)	220–680	376.2 \pm 0.5	832.2 \pm 0.3	470.3 \pm 0.2	779.3 \pm 0.4	684.1 \pm 0.4	720.8 \pm 0.5
PT (g/dL)	6.0–7.9	6.36 \pm 0.1	6.68 \pm 0.1	6.1 \pm 0.0	7.1 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1	6.8 \pm 0.1
Albúmina (g/dL)	2.4–3.0	3.46 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	3 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1
Globulina (g/dL)	3.5–5.7	2.86 \pm 0.1	3.76 \pm 0.2	3.05 \pm 0.1	4.2 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2	3.5 \pm 0.2
AST (UI/L)	66-194	146.4 \pm 0.4	174.6 \pm 0.3	131.5 \pm 0.3	140.3 \pm 0.6	112.1 \pm 0.1	104.3 \pm 0.2
ALT (UI/L)	12.0-37.0	17.8 \pm 0.3	27 \pm 0.9	19 \pm 0.5	16.7 \pm 0.3	15 \pm 0.6	16.5 \pm 0.4
Bilir. Total (mg/dL)	0.0–1.0	0.108 \pm 0.4	0.032 \pm 0.4	0.1 \pm 0.6	0.04 \pm 1.1	0.06 \pm 0.6	0.04 \pm 0.8
Bilir. Directa	0.0–0.2	0.03 \pm 0.2	0.002 \pm 2.2	0.02 \pm 0.7	0.003 \pm 1.5	0.02 \pm 0.8	0.001 \pm 0.4
Bilir. Indirecta	0.0–1.0	0.076 \pm 0.6	0.03 \pm 0.4	0.1 \pm 0.8	0.1 \pm 1.2	0.04 \pm 1.0	0.1 \pm 0.7
Fosf. Alcalina (UI/L)	68-387	305.8 \pm 0.5	134.4 \pm 0.2	167.5 \pm 0.6	188.5 \pm 0.3	198 \pm 0.4	211.3 \pm 0.3
GGT(UI/L)	36-102	53.8 \pm 0.2	51.8 \pm 0.1	68.2 \pm 0.3	73.7 \pm 0.3	49.7 \pm 0.2	58.0 \pm 0.4

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Las BMPs son excelentes objetivos para el tratamiento de diversos trastornos clínicos. Han demostrado ser clínicamente benéficas en el tratamiento de una variedad de condiciones, incluyendo BMP-2 y BMP-7.^{35, 36}

Se construyó un implante de tres componentes: CMMs que fueron modificadas genéticamente con vectores adenovirales transducidos ex vivo, que expresan las BMPs y que se encuentran embebidas en una matriz de hueso desmineralizado. Se utilizó la terapia celular a base de CMMs derivadas de tejido graso, obtenido por medio de una lipectomía de la zona del esternón de una oveja de 4 a 6 semanas de edad. La grasa fue disgregada con colagenasa I para extraer las CMMs, sembrarlas y expandirlas para realizar los ensayos *in vitro*. Una vez que se demostró la presencia de las células madre en cultivo por su morfología, observadas por microscopía de luz y demostrando las antígenos de superficie característicos de células inmaduras por técnicas de citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), realizamos las

transducciones con los adenovirus que expresan las BMPs 2, 7, 9 y la combinación de la 2/7 y 2/9. Las BMPs, especialmente la 2 y 7 han demostrado tener mayor potencial osteogénico.²⁴ Se realizaron ensayos *in vitro* para seleccionar cuál de ellas, solas o en combinación, demostraba tener mayor expresión génica y mayor producción de proteínas osteoinductoras. La osteocalcina y el colágeno tipo I, son proteínas marcadoras que demuestran la presencia de hueso. Los resultados demostraron que la combinación de las BMPs 2/7 presentó mayor expresión génica por RT-qPCR y se demostró presencia de estas proteínas inductoras de hueso por WB. Cabe mencionar que los tratamientos con el AdBMP9 solo y en combinación, mostraron muy buena expresión al día 16, sin embargo, al observar los cultivos a los días posteriores, había muerte celular en todas las cajas, por tal motivo ya no fue posible determinar su expresión y producción de proteínas marcadoras en los días posteriores. Estos hallazgos se confirmaron por tinciones histológicas e inmunohistoquímicas.

El tercer componente del implante, la MOD, fue construido siguiendo los protocolos del Servicio de Banco de Huesos y Tejidos del hospital Universitario de Nuevo León. Las células transducidas con las BMP2/7, fueron embebidas en la matriz, para formar el implante de tres componentes que probamos en un modelo *in vivo*.

Con este concepto, se realizaron trabajos preliminares utilizando un implante de tres componentes, denominado I-3C, el cual consistió en un bloque de matriz ósea desmineralizada (MOD) embebida con células madre mesenquimales (CMMs) modificadas genéticamente para la secreción de proteínas morfogenéticas de hueso o BMPs (se usó BMP2). Ensayos preclínicos en un modelo canino de distracción mandibular mostraron resultados muy promisorios.²⁴ En este trabajo generamos un I-3C mejorado con CMMs transducidas con diferentes combinaciones de BMPs en un modelo ovino con lesión diafisaria transtibial. Se utilizó este modelo, porque en este tipo de investigación los verdaderos retos terapéuticos para una extrapolación a la especie humana deben ser evaluados en un mamífero sometido a una lesión, en una región donde el hueso esté sometido a carga.

La recuperación post-operatoria de todas las ovejas fue satisfactoria. El uso de adenovirus para la transducción ex vivo de las células madre mesenquimales no implicó ningún daño a nivel hepático en el grupo de experimentación.

Los **estudios radiológicos** demostraron que la consolidación ósea completa en el grupo I-3C, se logró en un menor tiempo (7 a 10 semanas), a diferencia del resto de los grupos de experimentación donde la consolidación no se alcanzó y hubo deformación del hueso. Shi-Wu⁶ y colaboradores, reportaron que a la semana 12 después de una lesión en la extremidad anterior del radio derecho en conejos, se lograba una completa consolidación ósea en el grupo donde utilizaron

CMMs transfectadas con un adenovirus recombinante pAd-Cbfa1. En el modelo canino, donde se probó anteriormente esta metodología, el seguimiento radiográfico demostró completa consolidación en la mandíbula tratada con el implante de tres componentes en la semana 6 después de la distracción. Esos resultados indicaron una marcada reducción en el tiempo necesario para la consolidación comparado con el periodo de consolidación normal cuando se emplearon CMMs modificadas genéticamente.

Hallazgos post-mortem

Macroscópicos: En el grupo I-3C se observaron huesos más completos y bien formados. En el resto de los grupos se observaron con deformación y la zona de la lesión no se alcanzó a llenar completamente. En la tomografía 3D computarizada se observó que la forma, volumen y estructura del grupo I-3C es muy similar a las del grupo sin cirugía, con respecto a los grupos con CMMs sin modificación genética y el grupo sin implante.

Microscópicos: La tinción HyE demostró la repoblación celular en el hueso nuevo formado en todos los grupos de experimentación. El tricrómico de Masson demostró la producción de matriz de colágeno. En el grupo I-3C hubo mayor formación de tejido óseo, la matriz ósea muy compacta y uniforme a diferencia del grupo sin implante que en su mayoría presentó tejido fibroso y materia amorfa. Los ensayos de inmunohistoquímica en todos los grupos de experimentación

dieron positivo para colágeno tipo I, que es la proteína característica de tejido óseo, corroborando la presencia de hueso nuevo formado. Solo el grupo de I-CMMs dio positivo para colágeno tipo II lo cual sugiere la presencia adicional de tejido cartilaginoso. Estos resultados concuerdan con los reportados por Shi-Wu Dong⁶, ya que aunque ellos utilizaron un factor de transcripción para la diferenciación osteoblástica (Cbfa1), reportaron un incremento significativo en el área del nuevo hueso formado en el grupo que utilizó ésta proteína en combinación con CMMs.

Ensayos de compresión: las propiedades mecánicas describen como se comporta un material cuando se le aplican fuerzas externas.³⁷⁻⁴⁰ Para propósitos de análisis las fuerzas externas que se aplican sobre un material se clasifican así:

1. Fuerzas de tensión: la fuerza aplicada intenta estirar al material a lo largo de su línea de acción.



2. Fuerzas de compresión: la fuerza aplicada intenta comprimir o estirar al material a lo largo de su línea de acción.



3. Fuerza en cortante: las fuerzas se aplican de tal forma que intentan cortar o seccionar el material.



4. Fuerza de torsión: la fuerza externa aplicada intenta torcer al material (d).



Cualquier fuerza externa que se le aplique a un material causa su deformación.^{39,}

⁴⁰ La deformación del material se define como el cambio en la longitud a lo largo de la línea de aplicación de la fuerza. Para estudiar la reacción de los materiales a las fuerzas externas que se les aplican, se utiliza el concepto de esfuerzo. En el sistema métrico decimal el esfuerzo se mide en Pascales (N/m²).

$$\text{Esfuerzo} = \frac{\text{Fuerza aplicada}}{\text{Área sobre la cual se le aplica la fuerza}}$$

De la curva de esfuerzo vs. deformación obtenemos varias propiedades de los materiales principalmente la **resistencia**, que es el valor del esfuerzo que debe aplicarse sobre el material para iniciar su deformación. En la Figura 14 se muestran las gráficas correspondientes a dos diferentes materiales (cristal y polímeros).

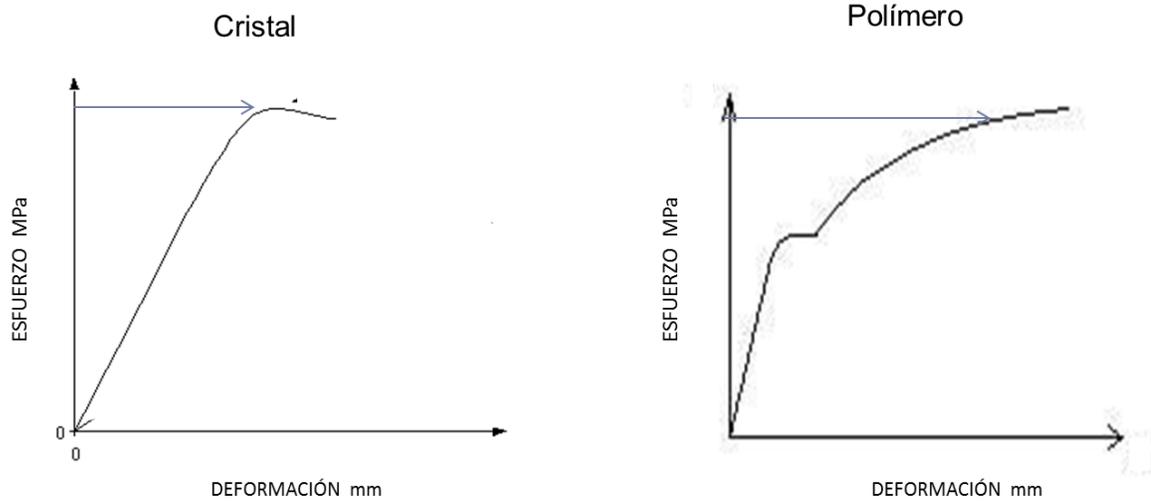


Figura 14. Gráficas representativas de resistencia a la deformación Esfuerzo vs. Deformación de un cristal y un polímero

Los ensayos de compresión realizados en este trabajo demostraron que los huesos presentaron gráficas parecidas al de un cristal y las gráficas de elasticidad o deformación generaron líneas rectas, mientras que los tejidos fibrosos y elásticos se comportaron como polímeros y generaron curvas parabólicas. Por lo tanto los huesos no fracturados y el grupo I-3C, sí tienen un parecido entre sí, que los diferencia de los otros dos grupos, es decir, el esfuerzo y la resistencia a la deformación del hueso en el grupo I-3C fueron las más cercanas a las del hueso normal; mientras que en el resto de los grupos estos valores se alejaron más de este comportamiento siendo la diferencia significativa en cuanto a la elasticidad de los huesos, la cual designa la propiedad mecánica de ciertos materiales a sufrir deformaciones reversibles cuando se encuentran sujetos a la acción de fuerzas exteriores y de recuperar la forma original si estas fuerzas

exteriores se eliminan. Esto pudo deberse a la deformidad de algunos huesos (sobre todo los del grupo S-I y el de I-CMMs), el área fue muy diferente y los estudios de compresión se deben realizar sobre sólidos muy uniformes. La finalidad del estudio era saber si aumentaba o no la resistencia del hueso o si el hueso se hacía más elástico debido a la formación de tejido fibroso, como quedó demostrado por los ensayos histológicos en el grupo sin implante.

Finalmente, algunos estudios previos han demostrado que el uso de las BMPs aumenta la diferenciación osteogénica, particularmente la BMP2 y BMP7.¹³⁻¹⁶ Para realizar el implante con un mayor potencial osteogénico, se realizaron ensayos *in vitro* para seleccionar cuál de las proteínas daba mejor resultado. La combinación de BMP2 y BMP7 fue la que mayores niveles de expresión presentó. En el 2004 Wei Zhu y Wang Qing en el 2012, demostraron que el uso de esta combinación presentó mayor grado de diferenciación osteogénica y proporcionaba una nueva estrategia de tratar los defectos óseos.

En los experimentos *in vivo*, el modelo ovino ha sido utilizado para evaluar diferentes terapias para el tratamiento de defectos de hueso. Algunos estudios solo evalúan la regeneración ósea con un seguimiento radiográfico utilizando solamente una doble placa de metal²⁶. Otros además realizan ensayos histológicos para evaluar el repoblamiento celular en la zona de la lesión, demostrando que el uso de CMMs sin modificación genética, ayuda en la regeneración ósea.^{28 y 32} Uno de los trabajos más completos para evaluar la

regeneración ósea fue el de Dong⁶ donde evaluaron también ensayos de compresión. Los resultados fueron comparables con los obtenidos en este trabajo (con la diferencia que ellos realizaron sus estudios en conejos). En el presente trabajo la formación de hueso fue mayor en términos de cantidad y calidad de nuevo hueso formado, evaluado por seguimiento radiográfico; también en los ensayos histológicos la producción de fibras de colágeno en el grupo del implante con CMMs modificadas genéticamente fue mayor. En los ensayos de compresión mecánica, no hubo diferencia significativa entre el grupo sin fractura y el grupo de implante; en contraste con nuestros resultados, entre los grupos con CMMs sin modificar, sí hubo una diferencia significativa con respecto al grupo sin fractura.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

Se logró desarrollar un implante de tres componentes: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo de Ovis aries y caracterizadas por citometría de flujo y PCR en tiempo real. Las CMMs fueron modificadas genéticamente con una combinación de proteínas morfogenéticas de hueso 2 y 7, que resultó ser la de mayor potencial osteogénico, evaluado por ensayos in vitro (histológicos y moleculares). Estas células fueron sembradas en una matriz de hueso desmineralizado que realizamos y probamos para su eficacia, antes de realizar los ensayos in vivo. Una vez desarrollado el implante de tres componentes, lo probamos en una lesión sometida a carga en un modelo animal Ovis aries. La consolidación ósea de acuerdo a los estudios radiológicos, se logra en un menor tiempo, así como también en la tomografía computarizada, la estructura y la densidad ósea demuestran la eficacia de nuestro implante con respecto a los grupos con CMMs sin modificación genética y el grupo sin

implante. Además demostramos que el uso de adenovirus para la transducción de las células madre mesenquimales no implicó ningún daño a nivel hepático en las ovejas del grupo de experimentación.

5.2 Perspectivas

Este implante aún no ha sido descrito y cubre la mayoría de los aspectos arquitectónicos, celulares y moleculares requeridos para la regeneración ósea que nos permitirá continuar con los estudios clínicos necesarios para evaluar principalmente defectos en huesos y enfermedades relacionadas con el sistema óseo.

CAPÍTULO 6

BIBLIOGRAFÍA

1. Eijiro Jimi, Shizu Hirata, Kenji Osawa, Masamichi Terashita, Chiaki Kitamura, and Hidefumi Fukushima. **The Current and Future Therapies of Bone Regeneratio to Repair Bone Defects**. International Journal of Dentistry. Volume 2012, 7 pages (2012).
2. J Ai, S Ebrahimi, A Khoshzaban, TS Jafarzadeh Kashi, D Mehrabani. **Tissue Engineering Using Human Mineralized Bone Xenograft and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Allograft in Healing of Tibial Fracture of Experimental Rabbit Model**. Iran Red Crescent Med J **14**(2):96-103 (2012).
3. Joana Caetano-Lopes, Helena Canhao, Joao Eurico Fonseca. **Osteoblasts and Bone Formation**. Acta Reum Port. **32**:103-110 (2007).
4. Polo Tonelli, Marco Duvina, Luigi Barbato, Eleonora Biondi, Niccoló Nuti, Leila Brancato, Giovana Delle Rose. **Bone Regeneration in Dentistry**. Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism. **8**(3): 24-28 (2011).
5. E.G. Khaled, M. Saleh, S. Hindocha, M. Griffin and Wasim S. Khan. **Tissue Engineering for Bone Production- Stem Cells, Gene Therapy and Scaffolds**. The Open Orthopediacs Journal. (Suppl 2-M10) 289-295 (2011).
6. Shi-Wu Dong, Da-Jun Ying, Xiao-Jun Duan, Zhao Xie, Zi-Jiang Yu, Chu-Hong Zhu, Bo Yang, and Jian-Sen Sun. **Bone Regeneration Using an Acellular Extracellular Matrix and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Expressing Cbfa1**. Biosci. Biotechnol. Biochem. **73** (10), 2226-2233, (2009).
7. Silvia Panseri, Carla Cunha, Teresa D'Alessandro, Monica Sandri, Alessandro Russo, Gianluca Giavaresi, Maurilio Marcacci, Clark T. Hung, Anna Tampieri. **Magnetic Hydroxyapatite Bone Substitutes to Enhance Tissue Regeneration: Evaluation In Vitro Using Osteoblasst-Like Cells and In Vivo in a Bone Defect**. Plos One. Vol. 7, Issue 6, (2012).

8. Elham Zomorodian and Mohamadreza Baghaban Eslaminejad. **Mesenchymal Stem Cells as a Potent Cell Source for Bone Regeneration.** Stem Cells International. Volume 2012, (2012).
9. Jenny Andrea Arévalo Romero. Bcl, Diana Marcela Páez Guerrero. Bcl, Viviana Marcela Rodríguez Pardo. Bcl. MSc. **Células Madre Mesenquimales: Características Biológicas y Aplicaciones Clínicas.** Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas-ISSN: 1794-2470 Vol. 5, (2007).
10. Andrea Schmitt, Martijn van Griensven, Andreas B. Imhoff, and Stefan Buchmann. **Application of Stem Cells in Orthopedics.** Stem Cells International. Volume 2012, (2012).
11. N.I. Kalinina, V. Yu. Sysoeva, K. A. Rubina, Ye. V. Parfenova, V. A. Tkachuk. Mesenchymal **Stem Cells in Tissue Growth and Repair.** Acta Naturae. Vol. 3 No. 4(11) (2011).
12. Marcus Jager, Philippe Hernigou, Christoph Zilkens, Monika Herten, Xinning Li, Johannes Fischer, Rudiger Krauspe. **Cell Therapy in Bone Healing Disorders.** Orthopedic Reviews. **2:e20** (2010).
13. Grace L. Lin and Kurt D. Hankenson. **Integration of BMP, Wnt, and Notch Signaling Pathways in Osteoblast Differentiation.** Journal of Cellular Biochemistry. **112:3491-3501** (2011).
14. Claude Laflamme, Séverine Curt, Mahmoud Rouabhia. **Epidermal Growth Factor and Bone Morphogenetic Proteins Upregulate Osteoblast Proliferation and Osteoblastic Markers and Inhibit Bone Nodule Formation.** Archives of Oral Biology. **55: 689-701** (2010).
15. F. Wegman, A. Bijenhof, L. Schuijff, F.C. Öner, W.J.A. Dhert and J. Alblas. **Osteogenic Differentiation as a Result of BMP-2 Plasmid DNA Based Gene Therapy *In Vitro* and *In Vivo*.** European Cells and Materials. Vol. 21. 230-242 (2011).
16. Suzanne N. Lissenberg-Thunnissen, David J.J. de Gorter, Cornelis F. M. Sier, Inger B. Schipper. **Use and Efficacy of Bone Morphogenetic Proteins in Fracture Healing.** International Orthopedics (SICOT). **35: 1271-1280** (2011).
17. Wei Zhu, Bernard A Rawlins, Oheneba Boachie-Adjei, Elizabeth R Myers, Jun Arimizu, Eugene Choi, Jay R Lieberman, Ronald G Crystal, and Chisa Hidaka. **Combined Bone Morphogenetic Protein-2 and -7 Gene Transfer Enhances Osteoblastic Differentiation and Spine Fusion in**

- a Rodent Model.** Journal of Bone and Mineral Research. Volume 19, No. 12 (2004).
18. Wang Qing, Chen Guang-Xing, Guo Lin, and Yang Liu. **The Osteogenic Study of Tissue Engineering Bone with BMP2 and BMP7 Gene-Modified Rat Adipose-Derived Stem Cells.** Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2012, ID 410879 (2012).
 19. Shinji Kuroda, Dale R Sumner and Amarjit S Viridi. **Effects of TGF- β 1 and VEGF-A Transgenes on the Osteogenic Potencial of Bone Marrow Stromal Cell *in Vitro* and *In Vivo*.** Journal of Tissue Engineering. 3(1) (2012).
 20. Jianqun Ma, Kyle Holden, Jinhong Zhu, Haiying Pan, and Yong Li. **The Application of Three-Dimensional Collagen-Scaffolds Seeded with Myoblasts to Repair Skeletal Muscle Defects.** Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2011, ID 812135 (2011).
 21. G.M. Calori, E. Mazza, M. Colombo, C. Ripamonti. **The Use of Bone-Graft Substitutes in Large Bone Defects: Any Specific Needs?** Injury Int. J. Care Injured. **42:** S56-S63 (2011).
 22. Chuangjian Wang, Guolin Meng, Laquan Zhang, Zuo Xiong, and Jian Liu. **Physical Properties and Biocompatibility of a Core-Sheath Structure Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering *In Vitro*.** Journal of Biomedicine and Biotechnology. Volume 2012, ID 579141 (2012).
 23. José Caeiro Potes, Joana da Costa Reis, Fernando Capela e Silva, Carlos Relvas, António Silvério Cabrita and José António Simoes. **The Sheep as an Animal Model in Orthopaedic.** Experimental Pathology and Health Sciences. 2(1): 29–32 (2008).
 24. Yanko Castro-Govea, Víctor H. Cervantes-Kardasch, Gissela Borrego-Soto, Herminia G. Martínez-Rodríguez, Marcela Espinoza-Juárez, Víktor Romero-Díaz, Iván A. Marino-Martínez, Alejandro Robles-Zamora, Eduardo Álvarez-Lozano, Gerardo R. Padilla-Rivas, Rocío Ortiz-López, Jorge Lara-Arias, José Vázquez-Juárez, and Augusto Rojas-Martínez. **Human Bone Morphogenetic Protein 2-Transduced Mesenchymal Stem Cells Improve Bone Regeneration in a Model of Mandible Distraction Surgery.** The Journal of Craniofacial Surgery. Volume 23, No.2 (2012).
 25. RS Carpenter, LR Goodrich, DD Frisble, JD Kisiday, B Carbone, CW McIlwraith, CJ Centeno, and C Hidaka. **Osteoblastic Differentiation of Human and Equine Adult Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem**

Cells when BMP-7 Homodimer Genetic Modification is Compared to BMP-2/7 Heterodimer Genetic Modification in the Presence and Absence of Dexamethasone. *J. Orthop Res.* **28(10)**: 1330-1337 (2010).

26. Joachim A Hahn, Tanja S Witte, Daniel Arens, Alexandra Pearce and Simon Pearce. **Double-Plating of Ovine Critical Sized Defects of the Tibia: a Low Morbidity Model Enabling Continuous *In Vivo* Monitoring of Bone Healing.** *BMC Musculoskeletal Disorders.* **12**: 214 (2011).
27. Johannes C. Reichert, Siamak Saifzadeh, Martin E. Wullschleger, Devakara R. Epari, Michael A. Schütz, Georg N. Duda, Hanna Schell, Martijn van Griensven, Heinz Redl, Dietmar W. Hutmacher. **The Challenge of Establishing Preclinical Models for Segmental Bone Defect Research.** *Biomaterials.* **30**: 2149-2163 (2009).
28. Matheus Levi Tajra Feitosa, Leandro Fadlél, Patricia Cristina Baleeiro Beltrao-Braga, Cristiane Valverde Wenceslau, Irina Kerkis, Alexandre Kerkis, Eduardo Harry Birgel Júnior, Joao Flávio Panattoni, Daniele Dos Santos Martins, María Angélica Miglino, Carlos Eduardo Ambrósio. **Successful Transplant of Mesenchymal Stem Cells in Induced Osteonecrosis of the Ovine Femoral Head. Preliminary Results.** *Acta Cirúrgica Brasileira.* Vol.25 (5) (2010).
29. Nimrod Rozen, Tova Bick, Alon Bajayo, Ben Shamian, Michal Schrift-Tzadok, Yankel Gabet, Avner Yayon, Itai Bab, Michael Soudry, Dina Lewinson. **Transplanted Blood-Derived Endothelial Progenitor Cells (EPC) Enhance Bridging of Sheep Tibia Critical Size Defects.** *Bone* **45**: 918-924 (2009).
30. Xiaowen Jiang, Shujuan Zou, Bin Ye, Songsong Zhu, Yurong Lui, Jing Hu. **bFGF-Modified BMMSCs Enhance Bone Regeneration Following Distraction Osteogenesis in Rabbits.** *Bone* **46**: 1156-1161 (2010).
31. Sanjay Kumar, Chao Wan, Girish Ramaswamy, Thomas L. Clemens and Selvarangan Ponnazhagan. **Mesenchymal Stem Cells Expressing Osteogenic and Angiogenic Factors Synergistically Enhance Bone Formation in a Mouse Model of Segmental Bone Defect.** *The American Society of Gene & Cell Therapy.* Vol. 18 No. 5 1026-1034 (2010).
32. Philipp Niemeyer, M.D., Thomas S. Schönberger, M.D., Joachim Hahn, B.V. Sc., Philip Kasten, M.D., Joerg Fellenberg, Ph.D., Norbert Suedkamp, M.D., Ph.D., Alexander T. Mehlhorn, M.D., Stefan Milz, Ph.D., and Simon Pearce, B. V. Sc., Ph.D. **Xenogenic Transplantation of Human Mesenchymal Stem Cells in a Critical Size Defect of the Sheep Tibia for Bone Regeneration.** *Tissue Engineering: Part A.* Volume 16. No. 1 (2010).

33. Philipp Niemeyer, Katharina Fechner, Stefan Milz, Wiltrud Richter, Norbert P. Suedkamp, Alexander T. Mehlhorn, Simon Pearce, Philip Kasten. **Comparison of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow and Adipose Tissue for Bone Regeneration in a Critical Size Defect of the Sheep Tibia and the Influence of Platelet-Rich Plasma.** *Biomaterials*. **31**: 3572-3579 (2010).
34. Avellanet, R., R. Cuenca, J. Pastor y J. Jordana. **Parámetros Hematológicos y Bioquímicos Clínicos en la Raza Ovina Xisqueta.** *Arch. Zootec.* **56** (Sup. 1): 497-501. (2007).
35. Xiaoning He, Rosemary Dziak, Xue Yuan, Keya Mao, Robert Genco, Mark Swihart, Debanjan Sarkar, Chunyi Li, Changdong Wang, Li Lu, Stelios Andreadis, Shuying Yang. **BMP2 Genetically Engineered MSCs and EPCs Promote Vascularized Bone Regeneration in Rat Critical-Sized Calvarial Bone Defects.** *PLOS ONE* Volume 8 Issue 4 April. (2013).
36. Meejung Kim and Senyon Choe. **BMPs and their clinical potentials.** *BMB Rep*; 44(10): 619–634 October (2011).
37. Arun K. Nair, Alfonso Gautieri, Shu-Wei Chang & Markus J. Buehler. **Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone.** *NATURE COMMUNICATIONS* | 4:1724 | DOI: 10.1038. (2013).
38. Amira I Husseina, Paul E Barbonea, and Elise F. Morgan. **Digital Volume Correlation for Study of the Mechanics of Whole Bones.** *Procedia IUTAM*; 4: 116–125. (2012).
39. Y. ZHAO, K. A. ROBSON BROWN, Z. M. JIN, and R. K. WILCOX. **Trabecular Level Analysis of Bone Cement Augmentation: A Comparative Experimental and Finite Element Study.** *Annals of Biomedical Engineering*, Vol. 40, No. 10, pp. 2168–2176. October (2012).
40. Jacqueline H. Cole PhD, Marjolein C. H. van der Meulen PhD. **Whole Bone Mechanics and Bone Quality.** *Clin Orthop Relat Res* 469:2139–2149. (2011).

CAPÍTULO 7

ANEXOS

7.1 ANEXO 1: MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

7.1.1 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.

7.1.2 MEDIO DE MANTENIMIENTO PARA CÉLULAS HEK 293

Se utiliza medio DMEM 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.

7.1.3 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.

7.2 ANEXO 2: TÉCNICAS

7.2.1 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 µL con la micropipeta de 100 µL.

- 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.

7.2.2 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.

7.2.3 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 acetona gradual 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.

7.2.4 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 acuso 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.

7.2.5 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.