

**Universidad Nacional
Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela de Medicina Veterinaria**

Establecimiento e implementación de un protocolo de extracción, aislamiento, cultivo y reimplantación de células madre mesenquimales para el tratamiento de tendinitis y desmitis en equinos.

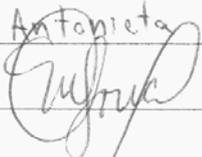
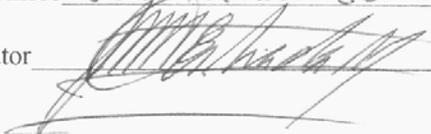
Modalidad: Tesis de grado

Roberto Estrada McDermott

**Trabajo Final de Graduación para optar por el
Grado Académico Licenciatura en Medicina
Veterinaria**

**Campus Presbítero Benjamín Núñez
2007**

TRIBUNAL EXAMINADOR

Nombre María Antonieta Corrales, Msc.Vicedecana Nombre Carlos Jiménez, DMVDirector Carlos JiménezNombre Juan Manuel Estrada, DMV, Msc.Tutor Nombre Pilar Salas, MicrobiólogaTutora ma del Pilar Salas ChavesNombre Javier Montero, DMVLector Nombre Ricardo Estrada, DMVLector Fecha: 16/2/07

DEDICATORIA

A mis padres Juan Ml. Estrada y Betty McDermott por darme la vida y enseñarme que si uno se esfuerza y se empeña a alcanzar una meta lo puede lograr.

A ellos y a mis hermanos Manuel, Jorge y Pedro por estar conmigo en los momentos buenos y malos como una familia.

A mi novia Adriana Castillo por todo el apoyo que me ha dado en los últimos meses.

A todos mis amigos que han estado siempre a mi lado.

A Dios por darme salud y fuerza para seguir adelante y no aflojar.

Además quiero dedicar este esfuerzo a toda la gente que me criticó y no creyó en mi porque me impulsaron a luchar todavía mas fuerte.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Ml. Estrada y a José Vargas de la Cátedra de Especies Mayores de la Escuela de Medicina Veterana, UNA, por todo el apoyo con los casos clínicos y las cirugías y reimplantaciones respectivas. Y además por siempre apoyarme incondicionalmente en las buenas y en las malas.

A la Cátedra de Reproducción, Escuela de Medicina Veterinaria, UNA, por facilitar el equipo de ultrasonido.

A la Dirección de la Escuela de Medicina Veterinaria y a la Administración del Hospital por no cobrar el pago obligatorio de los casos clínicos.

A la Dra. Pilar Salas por creer en mis ideas cuando nadie pensó que fuera posible y por ayudarme a desarrollar el protocolo de aislamiento y cultivo en este estudio.

Al apoyo inicial del Laboratorio de Virología Médica de la UCR, en especial a Francisco Vega por todo su esfuerzo y dedicación.

A Víctor Castillo del INISA por la preparación de reactivos para los cultivos.

A la Dra. Patricia Venegas del Laboratorio de Citogenética, Hospital de Niños por su gran apoyo en los cultivos celulares y su entusiasmo científico en pro de aplicar esta terapia en humanos.

A la Dr. Berta Valverde del Laboratorio de Investigación del Hospital de Niños por toda la paciencia y la ayuda brindada.

A la Dra. Silvia Santamaría y al Dr. Alfonso Carranza del Laboratorio de Patología del Hospital de Niños y al Dr. Constantino Lianoi del Laboratorio de Patología del Hospital México por el apoyo en lo que respecta a la interpretación de las tinciones. En especial agradecerle a Martín Sánchez por su gran colaboración y entusiasmo con las tinciones realizadas. Además por toda su colaboración.

Al Dr. Ricardo Estrada y el Dr. Bruno Lomonte por su apoyo con materiales y animales de laboratorio para distintas pruebas.

Al Dr. Javier Montero por su cooperación con casos clínicos y su entusiasmo para aplicar esta terapia a campo.

Al Dr. Alexis Berrocal por la cooperación en lo que respecta a interpretación de las tinciones.

A los dueños y a sus caballos que al participar en este estudio por ser los pioneros de una nueva era terapéutica.

Y a tantas otras personas que han cooperado conmigo y se me escapan en este momento.

Gracias a todos por creer en un sueño

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE CUADROS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes	1
1.2. Justificación	5
1.2.1 Importancia	6
1.3. Objetivos	8
1.3.1. Objetivo General	8
1.3.2. Objetivos Específicos	8
1.4. Revisión Bibliográfica	9
1.4.1. Clasificación, caracterización, y propiedades de las células madre	9
1.4.1.1. Clasificación	9
1.4.1.2. Caracterización	12
1.4.1.3. Propiedades	15
1.4.2. Propiedades mecánicas y patofisiología del tendón y ligamento	16
1.4.2.1. Propiedades mecánicas	16
1.4.2.2. Respuesta del tendón y ligamento a la lesión y su reparación	17
1.4.3. Revisión de las opciones terapéuticas para el tratamiento de las lesiones de tendón y ligamento	19
1.4.3.1. Tratamientos tradicionales	20
1.4.3.2. Tratamientos nuevos	20

2. MATERIALES Y MÉTODOS	24
2.1. Descripción de los casos y clasificación de las lesiones	24
2.2. Temporalidad de la lesión	25
2.3. Extracción del tejido adiposo	25
2.4. Aislamiento, cultivo y recuperación de las células	26
2.5. Preparación y reimplantación de las células aisladas	29
2.6. Identificación de las células aisladas	30
2.6.1. Morfología de las células en cultivo	30
2.6.2. Tinciones histopatológicas	31
2.6.3. Cartometría de flujo	32
2.6.4. Formación de teratomas en ratones	32
3. RESULTADOS	33
3.1 Aislamiento, cultivo y recuperación de las células	33
3.2 Identificación de las células aisladas	33
3.2.1 Morfología de las células en cultivo	33
3.2.2 Tinciones histopatológicas	33
3.2.3 Citometría de Flujo	33
3.2.4 Formación de teratomas en ratones	34
4. DISCUSION	35
4.1. Conclusiones	50
4.2. Recomendaciones	51
4. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de las células aisladas de tejido adiposo en este estudio, vistas en microscopio de contraste de fases.	38
Figura 2. Morfología de MSC aislados a partir de distintos tejidos en diferentes estudios.	39
Figura 3. Colonias celulares altamente concentradas en cultivo.	41
Figura 4. Células aisladas tenidas con Giemsa.	43
Figura 5. Células aisladas positivas a la Tinción PAS.	43
Figura 6. Células aisladas positivas a la Tinción Metacromática.	43
Figura 7. Citometría de flujo de las células aisladas.	44

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de los resultados obtenidos en la investigación.	34
---	-----------

INDICE DE ABREVIATURAS

MSC: Células madres mesenquimales.

ADSC: Células madre mesenquimales de origen adiposo.

MO: Medula ósea.

SCU: Sangre de cordón umbilical.

TA: tejido adiposo.

FVIII: Anticuerpo monoclonal para células endoteliales.

SMA: Anticuerpo monoclonal para actina de musculo liso.

ASO2: Anticuerpo monoclonal específico a fibroblastos y células de origen mesenquimal.

SVF: Fracción vascular estromal.

PLA: Lipoaspirado procesado.

COMP: Proteína Oligomérica de Matriz Cartilaginosa.

DMM: Diámetro de masa media.

GAGs: Glicosaminoglicanes.

PSGAG: Glicosaminoglicanes polisulfatados.

MHZ: Mega hertz.

ES: puntaje de ecogenicidad.

FAS: puntaje del alineamiento de fibras.

IGF- I: Factor insulínico de crecimiento -1.

TGF -B: Factor de crecimiento transformador -beta.

DMEM: Medio Eagle Modificado por Dulbecco.

PBS: Salina Bufferada Fosfato.

SFB: Suero Fetal Bovino.

H/E: Hematoxilina / eosina.

PAS: Acido periódico de Schiff.

AcMo: Anticuerpos Monoclonales.

IV: Intravenosa

RESUMEN

Como respuesta medica alas frecuentes recaídas que presentan los equinos al ser tratados por medio de las terapias tradicionales después de sufrir una lesión de tendón y ligamento que van de un 43% a 93% de los casos (Dahlgren, 2005; Crowe, 2004; Dyson, 2004; Kasashima et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Smith et al., 2003; Stashak, 2002; Becker et al., 1998; Gibson et al., 1997; Dyson, 1991 a, b; Gaughan et al., 1991); nace la necesidad de determinar si en el país es técnica y tecnológicamente factible realizar aislamientos de células madre de origen adiposo (ADSC) con fine~ terapeuticos en el país.

El estudio se basa en la capacidad (comprobada por medio de estudios *in vivo*) que este tipo de células presentan para regenerar el tejido tendinoso y producir una estructura biomecánicamente funcional. Además de esto las ADSC presentan un efecto antiinflamatorio significativo (Dahlgren, 2005; Nixon & Dahlgren, 2004; Smith et al., 2003; Young et al., 1998). La reparación normal en contraste, produce cicatriz no elástica, que a su vez favorece que se presenten recidivas en las lesiones una vez que el animal se somete a la carga completa de trabajo (Dyson, 2004; Hinchcliff et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002).

La presente tesis consiste en el establecimiento de un protocolo de aislamiento y cultivo de ASDC. Además la implementación de un protocolo de extracción de la muestra de tejido adiposo y reimplantación de las ADSC intralesionalmente en casos clínicos referidos a la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Por otro lado se trato de identificar a las células aisladas por medio de sus características morfológicas, su comportamiento *in vitro* e *in vivo*, tinciones básicas e histoquímicas y su inmunofenotipo. Además se evaluó clínica y ultrasonográficamente los casos tratados para determinar su evolución.

Mediante esta investigación se obtuvo un protocolo de aislamiento altamente específico células morfológicamente muy similares a las ADSC y células madre mesenquimales (MSC) aisladas en otros trabajos, las cuales mantienen su morfología sin importar el medio de cultivo en el que estén, someterse a varios pasajes y congelación, que presentan características morfológicas similares a células primitivas o progenitoras, que son positivas a tinciones histoquímicas que comúnmente tiñen tejidos de origen mesenquimal, que no forman ningún tipo de masa en ratones inmunosupresos similar a lo reportado por Rubio et al., 2005 y que además han producido una mejoría clínica en los casos tratados (Rubio et al., 2005; Strem et al., 2005; Gimble & Guilak, 2003; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001).

Todos estos hallazgos en conjunto permitieron determinar que las ADSC comparten características importantes con las células aisladas en este estudio, siendo indicativa de que a partir del protocolo que se ha planteado en esta investigación realmente se puede conseguir aislar y cultivar células madre mesenquimales de origen adiposo para fines terapéuticos, en este caso en específico para tratar lesiones en tendón y ligamento.

ABSTRACT

As a medical response for the frequent reinjury that is presented in horses when they are treated with the traditional therapies after tendon and ligament lesion that goes from 43% to 93% of the cases (Dahlgren, 2005; Crowe, 2004; Dyson, 2004; Kasashima et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Smith et al., 2003; Stashak, 2002; Becker et al., 1998; Gibson et al., 1997; Dyson, 1991 a, b; Gaughan et al., 1991); the necessity of determining if in the country is technical and technologically possible to isolate adipose derived stem cells (ADSC) for therapeutic purposes was born.

The study is based in the capacity (confirmed by *in vivo* studies) that this type of cells present for regenerating the tendinous tissue and to produce a biomechanically functional structure. It also was demonstrated that the ADSC present a significant anti-inflammatory effect (Dahlgren, 2005; Nixon & Dahlgren, 2004; Smith et al., 2003; Young et al., 1998). All this in contrast with the normal healing of the tendon in which a less elastic S.CM tissue is formed promoting reinjury once the animal is exposed to full work (Dyson, 2004; Hinchcliff et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002).

This thesis work consists in the establishment of an isolation and culture protocol for ADSC. Also, the implementation of a protocol for extraction of the adipose tissue and a protocol for the reimplantation of the ADSC intralesionally of the clinical cases referred to the School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

The isolated cells were identified by the morphological characteristics, the cell behavior *in vivo* and *in vitro*, basic pathological stains and histochemistry and also by the

immunophenotype. Also the treated cases were evaluated clinically and ultrasonographically to follow up the evolution.

Summarizing, we obtained, using an isolation protocol highly specific proved by other studies, cells morphologically similar to the ADSC and mesenchymal stem cells (MSC) isolated in other investigations, these cells maintain the aforementioned morphology in different culture mediums, after several passages and post thaw, they also present primitive or progenitor cells characteristics, they are positive to histochemistry stains for mucopolisaccharids (normally found in mesenchymal tissue), they doesn't form tumors in immunosuppress mice as reported by Rubio et al. and they produce clinical improvement in the treated cases (Rubio et al., 2005, Strem et al., 2005, Gimble & Gullak, 2003, Zuk et al., 2002, Zuk et al., 2001).

All the findings together determine that the ADSC share important characteristics with the cells isolated in this study, being this indicative that by using the established protocol, we can really isolate and culture adipose derived mesenchymal stem cells for therapeutic purposes, and in these specific case for the treatment of tendon and ligament injuries.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Por décadas las lesiones de tendón y ligamentos en equinos han sido una causa importante de descarte de animales en la mayoría de los deportes ecuestres. Aunque las investigaciones en esta área han sido extensas, la incidencia de lesiones recurrentes es muy alta. Cuando se realizan tratamientos tradicionales y luego se exponen los tendones y los ligamentos a los esfuerzos del entrenamiento y la competencia, se han alcanzando porcentajes de recurrencia que pueden variar de un 42.5 a un 93% (Dahlgren, 2005; Crowe, 2004; Dyson, 2004; Kasashima et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Smith et al., 2003; Stashak, 2002; Becker et al., 1998; Gibson et al., 1997; Dyson, 1991 a, b; Gaughan et al., 1991).

A causa de esto, veterinarios alrededor del mundo continúan investigando nuevas alternativas para el tratamiento de estas patologías. Este fue el caso del Dr. Herthel del Álamo Pintado Equine Hospital, California, Estados Unidos, quien condujo un estudio en el cual inyectó bajo anestesia general, médula ósea autóloga directo a lesiones de núcleo en el ligamento suspensorio de 100 caballos, con la idea de llevar a este sitio células madre mesenquimales (MSC) y factores de crecimiento, para así estimular la formación de fibroblastos productores de matriz extracelular y tenocitos (Dahlgren, 2005; Smith et al., 2003; Ross & Dyson, 2003).

En este experimento después de 6 meses de rehabilitación, el 84% de estos animales estaban sanos y con la carga de trabajo completa, comparado al 15% de un grupo de animales tratados tradicionalmente. No se especificó el o los miembros afectados ni tampoco la zona de la lesión, que determina el pronóstico del caso (Smith et al., 2003).

Dichos resultados crearon una gran expectativa en esta línea de terapia, pero estudios subsecuentes revelaron ciertos problemas: la inyección de grandes cantidades de médula ósea dañaban fibras tendinosas sanas; las espículas óseas, los glóbulos rojos y las células grasas, afectaban el proceso de regeneración tendinosa y además se determinó que existía una baja concentración de MSC en médula ósea (2 por cada 100000 células) (Smith et al., 2003).

En respuesta a estos problemas el Colegio Real de Veterinarios y VetCell Ltd. (Inglaterra), iniciaron un experimento para realizar un cultivo y expansión *in vitro* de MSC extraídas de médula ósea para luego re-implantar estas células en el sitio de la lesión.

En este caso se obtuvo buenos resultados clínicos pero el proceso de expansión de las células era muy costoso y además el método de extracción de la médula ósea del esternón podía tener ciertas complicaciones como pleuritis o pericarditis (Smith et al., 2003).

Mientras tanto, otras investigaciones revelaban que las MSC de tejido adiposo tenían la capacidad de diferenciarse en varias líneas celulares (Strem et al., 2005; Gimble & Guilak, 2003; Huang et al., 2002; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001; Hicok et al., ca.1999; Stashower et al., 1999) y que existían concentraciones mayores de MSC en grasa comparado a médula ósea (1 por cada 50 células), haciendo más fácil y barato el cultivo y aislamiento de las mismas (Smith, 2004; Zuk et al., 2002).

Además otros estudios determinaron que las MSC necesitaban factores de inducción específicos, estimulación mecánica, contacto con las células en las cuales se deben transformar y con su matriz para diferenciarse a la línea celular deseada (Abousleiman et al., 2006; Smith et al., 2003; Zuk et al., 2002, Zuk et al., 2001). Al necesitar todos estos estímulos las MSC deben ser colocadas en el sitio de la lesión del órgano que se desea regenerar, esto para alcanzar su máximo potencial de diferenciación (Smith, 2004).

Por otro lado se comprobó que es menos efectivo si las MSC se diferencian *in vitro* en los tejidos deseados (con el fin de reimplantar este nuevo tejido en el sitio de la lesión), ya que se pierde parte de su potencial de diferenciación (Smith, 2004).

Young et al. demostraron que al implantar células madre mesenquimales autólogas en lesiones inducidas con colagenasa en tendón de Aquiles en conejos, después de 4,8 y 12 semanas se daba una mejoría significativa en la biomecánica de las estructuras tratadas comparadas con el control.

Se presentó un aumento significativo en la capacidad de soportar carga mecánica ($p < 0,5$), hubo un aumento significativo en los materiales de la estructura relacionados con soportar la carga mecánica ($p < 0,05$), además de un mejor alineamiento de las fibras de colágeno (Young et al., 1998).

Por estas razones una compañía californiana llamada Vetstem Inc. inició estudios al respecto, entre ellos un estudio clínico controlado conducido por el Dr. Alan Nixon y la Dra. Linda Dahlgren del Laboratorio de Ortopedia Comparativa, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Cornell, New York, Estados Unidos (Nixon & Dahlgren, 2004).

En este se tomaron 8 equinos a los cuales se les inyectó colagenasa para inducir una lesión en el tendón flexor digital superficial de uno de sus miembros anteriores, después de 48 horas de cultivo celular se trataron 4 animales con MSC extraídas de tejido adiposo montadas en Salina Bufferada Fosfato (PBS) y los otros 4 con PBS como control. Las lesiones de tendón se siguieron ultrasonográficamente cada semana por 7 semanas, tiempo en el cual los animales fueron sacrificados y sus tendones extraídos para su estudio (Nixon & Dahlgren, 2004).

El experimento reveló que existía mejoría estadísticamente significativa en cuatro parámetros: infiltrado de células inflamatorias, uniformidad de las fibras de colágeno, patrón

de ondulación y puntaje de regeneración global del tendón (Dahlgren, 2005; Nixon & Dahlgren, 2004).

Otros parámetros reportados como tendencias en el estudio fueron; el alineamiento de las fibras de colágeno, la forma y densidad de las células tendinosas, la disminución de las hemorragias, la disminución del tamaño y grado ultrasonográfico de la lesión y mejora del alineamiento ultrasonográfico (iniciando con valores equivalentes o peores a los controles) (Dahlgren, 2005; Nixon & Dahlgren, 2004).

Además de esto se realizaron análisis bioquímicos de los tendones, encontrando que esta línea de terapia aumentaba significativamente la expresión genética de la Proteína de Matriz Oligomérica Cartilaginosa (COMP), que cumple una función importante catalizando los eventos iniciales de la formación de las fibras de colágeno (acelera fibrilogénesis), además organiza la matriz tendinosa uniendo el colágeno fibrilar por medio de un mecanismo dependiente de zinc (Dahlgren, 2005; Hinchcliff et al., 2004). Esto es vital para la reestructuración del tendón ya que el 80% de su peso seco es colágeno tipo I (Hinchcliff et al., 2004).

Abousleiman et al. determinaron en un modelo de tendón creado por medio de ingeniería tisular que en donde se implantaban MSC y además se sometía a cargas mecánicas cíclicas la estructura, se presentaba hasta un 90% más de resistencia tensil que en los modelos estáticos. Además presentaban 60% más celularidad y las fibras colágenas se orientaban paralelamente a diferencia de la orientación desordenada en los modelos estáticos (Abousleiman et al., 2006).

Todo lo anterior favorece a la normalización de la arquitectura tendinosa devolviéndole a estos sus propiedades mecánicas que son las que al final van a hacer que el tendón soporte la

presión repetida del ejercicio con una mucho menor reincidencia de las lesiones (Dahlgren, 2005), versus la formación de cicatriz desordenada y no flexible propensa a recaídas que se forma normalmente en estos casos aunque se realicen tratamientos tradicionales (Dyson, 2004; Hinchcliff et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002).

Es por eso que en este momento Vetstem Inc. está realizando tratamientos contra tendinitis y desmitis usando MSC de origen graso en cientos de equinos en los Estados Unidos, con excelentes resultados clínicos. Según datos facilitados por la compañía Vetstem Inc. en caballos de carrera, han obtenido resultados favorables o muy favorable en 80% de los casos al primer, tercer y sexto mes después del tratamiento al ser estudiados ultrasonográficamente, además de que el 75% de los animales vuelven a carga de trabajo completa 6 meses después de la terapia (Anónimo, 2004).

1.2 Justificación

En Costa Rica la industria ecuestre ha ido creciendo en cantidad y calidad de ejemplares en los últimos años, profesionalizándose en ciertos deportes e inclusive compitiendo internacionalmente. Esto ha hecho que los eventos se vuelvan más competitivos aumentándose de esta manera la presión sobre los animales y sus sistemas. Y aunque no existen estudios sobre la prevalencia de lesiones de tendones y ligamentos equinos en nuestro país, en la práctica profesional es relativamente frecuente encontrar lesiones en estas estructuras en deportes como resistencia ecuestre, polo y salto. Igual que en otras partes del mundo, también son frecuentes las recidivas después de tratamientos tradicionales (Estrada & Montero, 2006).

Es por esto que nace la necesidad de realizar tratamientos especializados de alta

tecnología con los cuales podemos aumentar las posibilidades de que el caballo vuelva a competencia en el menor tiempo posible y disminuya las recaídas. De esta manera se permite aprovechar el potencial de animales lesionados de alto valor genético y económico que de otra forma serían desaprovechados o eliminados.

1.2.1 Importancia

En este nuevo milenio la posibilidad de tratamiento de patologías en todos los sistemas corporales por medio de terapias celulares va a permitir alcanzar la regeneración de las células afectadas, logrando de esta manera un funcionamiento igual o similar al que presentaba el órgano antes de la lesión (Smith et al., 2003; Huang et al., 2002; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001; Hicok et al., ca.1999).

En el ámbito deportivo y específicamente en lesiones de tendones y ligamentos daría la posibilidad de tener tejido nuevo, organizado y funcional; algo que realmente era difícil de lograr con otras líneas de terapia, por las características anatómicas y fisiológicas los tendones y ligamentos (Dyson, 2004; Hinchcliff et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002; Adams, 1974).

Los tendones y ligamentos presentan un difícil acceso para los medicamentos, su capacidad de regeneración es baja presentándose reparación cicatrizal (no elástica) en la mayoría de los casos, sobretodo si está localizado intrasinovalmente, además las fuerzas tirantes a las que se ven sometidos son muy altas, más aún en el caso de los equinos (Dyson, 2004; Hinchcliff et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002; Adams, 1974).

Se debe definir claramente en este punto, que el fin de este estudio no es determinar si las células madre regeneran las lesiones de tendón (ya que esto ya ha sido probado como efectivo por otros investigadores fuera de Costa Rica) sino más bien desarrollar un protocolo de aislamiento y cultivo para que las células madre equinas puedan ser utilizadas en nuestro país como una alternativa para la terapia de lesiones de tendón y ligamento.

Es importante hacer ver que este tipo de terapia solo se está realizando en USA y Europa por empresas privadas que tienen los derechos reservados sobre estos protocolos. Por lo tanto al no ser de conocimiento público, el autor y sus colaboradores tratarán de establecer e implementar un protocolo, haciendo uso de la literatura disponible al respecto y la experiencia en aislamientos primarios que existe en el país.

Cabe mencionar que este estudio sería pionero en Latinoamérica, ya que el autor desconoce que esta línea de tratamiento haya sido utilizada hasta el momento en la zona geográfica mencionada. Además con el desarrollo de este protocolo se da pie a otras investigaciones en equinos, no solo en tendones y ligamentos sino en otras estructuras como músculo, hueso, cartílago y nervios. También es importante considerar que en un futuro cercano estos estudios puedan ser extrapolados a otras especies, incluyendo al humano.

1.3 Objetivo

1.3.1 Objetivo general

Establecer e implementar un protocolo de extracción, aislamiento, cultivo e implantación de células madre mesenquimales autólogas de origen adiposo, para el tratamiento de casos subagudos de tendinitis y desmitis en equinos.

1.3.2 Objetivos específicos

- Implementar un protocolo quirúrgico de extracción del tejido adiposo de la base de la cola de los equinos que se someterán a la terapia celular.
- Establecer un protocolo de aislamiento y cultivo in vitro de células madre mesenquimales multipotentes de origen adiposo de equino.
- Implementar un protocolo de reimplantación guiado por ultrasonido hacia la lesión en los tendones y ligamentos afectados.

1.4. Revisión Bibliográfica

1.4.1. Clasificación, caracterización y propiedades de las células madre

1.4.1.1. Clasificación

Las células madre se caracterizan por su habilidad de renovación y su potencial de diferenciación, y pueden ser clasificadas en dos grandes grupos las embrionarias y las adultas. En el caso de las embrionarias se derivan de las células del blastocisto, las cuales tienen el potencial de diferenciarse en todas las líneas celulares, generando de esa manera un organismo (totipotenciales). En el caso de las células madres adultas son poblaciones celulares menores que se encuentran en los órganos de animales adultos, no tienen el potencial de formar un organismo completo pero se pueden diferenciar en líneas celulares específicas y las células madre mesenquimales (MSC) pertenecen a este grupo (Rubio et al., 2005)

Las MSC poseen mucho potencial en la aplicación clínica por su capacidad de expansión *in vitro* e *in vivo* y de diferenciarse en varias líneas celulares, incluyendo osteocitos, condrocitos, miocitos, cardiomiocitos, adipocitos, tenocitos, vasos sanguíneos y neuronas (Rubio et al., 2005; Strem et al., 2005; Shahdadfar et al., 2005; Ji Gang et al., 2004; Gimble & Guilak, 2003; Huang et al., 2002; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001).

La ingeniería tisular ofrece una opción prometedora para la reparación o regeneración de tejidos dañados o enfermos. Aun así la fuente ideal para obtener este tipo de células no está definida, y puede depender de la aplicación que se le quiera dar. Entre las propiedades que hacen que las MSC adultas sean bien vista en la medicina regenerativa están: fáciles de recolectar por medio de transplantes autólogos, tasas de proliferación altas en expansiones *ex vivo* y capacidad de diferenciación multilinear (Strem et al., 2005).

En los pasados 25 años las células madre de médula ósea han sido sujeto de una considerable cantidad de estudios. Estas células tienen muchas propiedades que sugieren su considerable potencial para utilización en la terapia celular de diferentes enfermedades (Strem et al., 2005).

Como la médula ósea, el tejido adiposo se deriva del mesodermo, y contiene una población microvascular de células endoteliales, músculo liso y células madre. Estas pueden ser enzimáticamente extraídas del tejido adiposo y separados de los adipositos por centrifugación y filtración. Una vez realizado este procedimiento una población más homogénea emerge en condiciones de cultivo celular. Esta población (llamada Células Madre Derivadas de Tejido Adiposo, ADSC por sus siglas en inglés) comparten muchas características de su contraparte en médula ósea incluyendo su potencial proliferativo y su habilidad de diferenciación multilinear (Boquest et al., 2006; Strem et al., 2005; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001).

Se ha logrado determinar que el número de MSC encontradas en médula ósea va a variar de entre 1 por cada 25 000 a 1 por cada 100000, entre los factores que pueden afectar su concentración están la edad, sexo, osteoporosis, y exposición previa a quimioterapia o radiación.

En el caso del tejido adiposo se ha logrado determinar que el promedio de ADSC en el lipoaspirado procesado es de un 2% de la población celular. Lo que es consistente con otros estudios que determinaron que existen 5000 unidades formadoras de colonias (CFU-F) por cada gramo de tejido adiposo. Esto se puede comparar con el aproximado de 100 a 1000 CFU-F por mililitro de la médula ósea. Además existen estudios que han determinado que existe una concentración hasta 40 veces más células madre en una muestra de grasa que en una de

médula ósea (Boquest et al., 2006; Strem et al., 2005).

La significancia de esta diferencia entre la extracción de grasa o MO para terapias celulares es clara: el dolor agudo y crónico por la extracción, las infecciones, los sangrados, el bajo número de células y la morbilidad del donador limita la cantidad de médula ósea que se puede obtener y esto extiende el tiempo de cultivo requerido para obtener una dosis terapéutica de células (Boquest et al., 2006; Kern et al., 2006; Strem et al., 2005; Barker et al., 2005; Ji Gang et al., 2004, Zuk et al., 2001). Se ha reportado que en muchos casos para obtener la cantidad de médula ósea requerida se debe someter al paciente a anestesia general aumentando de esta manera la morbilidad (Strem et al., 2005).

Por otro lado se presenta la posibilidad de obtener MSC de cordón umbilical, pero esta fuente de células madres presenta varios inconvenientes. Kern et al. desarrollaron un estudio comparando la morfología, el aislamiento, frecuencia de colonias, la expansión potencial, la capacidad de diferenciación y el inmunofenotipo de las células madre mesenquimales de cordón umbilical (SCU), medula ósea (MO) y tejido adiposo (TA). Se logró determinar que en el caso de MO y TA se obtenían aislamientos en un 100% de los casos mientras que en el caso de SCU se aislaban en un 63% de los casos. En lo que respecta a la frecuencia de las unidades formadoras de colonias los de la SCU fueron las que tuvieron menor cantidad mientras que los de TA fueron los que tuvieron una mayor cantidad. Aún así se demostró que las MSC de SCU podían ser cultivadas por tiempos más prolongados y presentaban una capacidad de proliferación mayor comparado a las MSC de MO que fueron las que presentaron los parámetros más bajos en este caso. En lo que respecta a la capacidad de diferenciación las MSC de SCU no presentaron capacidad de diferenciación hacia tejido adiposo mientras que las otras células si lo tuvieron (Kern et al., 2006). Por otro lado se puede

inferir que se aumentan los costos del tratamiento por el hecho de tener que almacenar en congelación los cordones umbilicales por largos periodos de tiempo hasta su eventual utilización, si el cordón es para uso individual.

1.4.1.2. Caracterización

Las células madres se han tratado de tipificar de distintas maneras por lo que a continuación se realizará una revisión de lo citado por la literatura actual.

En primer lugar las ADSC presentan una morfología típica de fibroblasto (Boquest et al, 2006; Rubio et al., 2005; Strem et al., 2005; Zuk et al., 2001;) y es importante mencionar que es una característica que refleja la homogeneidad de la población celular es que esta morfología no va a variar después de la expansión en el cultivo, ni van a aparecer otros tipos de células en el cultivo (Zuk et al., 2001). Por otra parte en lo que respecta al inmunofenotipo de la superficie celular las ADSC son similares a las MSC aisladas de médula ósea. Es en esta área de los marcadores celulares donde existe mayor controversia ya que hay criterios encontrados en diferentes estudios.

Según Strem et al. entre los marcadores que se han reportado más comúnmente están el CD105, STRO-1 y CD166 estos normalmente se utilizan para marcar células con potencial de diferenciación multilinear y son expresados consistentemente por las ADSC y las otras MSC.

Aún así el CD117 ha demostrado ser expresado por células pluripotentes incluyendo células madre embrionarias, hematopoyéticas, MSC y ADSC. Además se ha reportado que las ADSC y las otras MSC expresan el CD29 (beta integrina), CD 44 (receptor del hyaluronato), el CD49e (integrina) y altos niveles de CD54 (inmunoglobulinas). Los marcadores que normalmente no son expresados son CD3, CD4, CD11c, CD14, CD15, CD16, CD19, CD31,

CD33, CD34, CD38, CD56, CD62p, CD104, y CD144. En el caso de CD49d es solamente expresado por las ADSC y la CD106 es únicamente expresado por las MSC de médula ósea (Strem et al., 2005).

Rubio et al. reporta que los antígenos de superficie expresados más comúnmente por ADSC son el CD13, CD90, CD105 y el CD106 en niveles bajos. Este autor hace la acotación de que las ADSC después de estar en periodos largos de cultivo (aproximadamente 2 meses), las células van a pasar por una etapa de crisis en la que se van a dar cambios morfológicos y genéticos, además de que van a expresar los marcadores CD34 y CD90. Se menciona además que después de esto las células presentan características tumorales (Rubio et al., 2005).

Por su parte Zuk et al. confirma la especificidad del CD49d por las ADSC y del CD106 a las MSC de médula ósea. Además determina que ambas tipos de células madre expresan CD13, CD29, CD44, CD71, CD90, CD105, y STRO-1. En contraste en este estudio no se expresaron marcadores de líneas hematopoyéticas como el CD31, CD34 y CD45. Tampoco expresan CD14, CD16, CD56, CD61, CD62, CD104 y CD106. Esta autora menciona que las células se mantiene estables a lo largo del cultivo morfológica e inmunofenotípicamente (Zuk et al., 2002).

En lo que respecta a anticuerpos monoclonales las ADSC después de ser procesadas de la grasa presentan las siguientes características: tinción positiva a FVIII (anticuerpo monoclonal para células endoteliales) en un 25% del total de las células, y en el caso del SMA (anticuerpo monoclonal para actina de músculo liso) el 29% de las células positivas.

Por otro lado el 85% del total de las células se tiñó positivamente para ASO2 (específico a fibroblastos y células de origen mesenquimal) y el 63% del total de las células fué positivo a vimetina (filamento intermedio encontrado predominantemente en células de

origen mesenquimal). Todo esto unido sugiere que las ADSC son una población relativamente homogénea de células mesodérmicas o mesenquimales con una baja contaminación de células endoteliales, pericitos, y células de músculo liso (Zuk et al., 2001)

Por otra parte se ha podido determinar que los clones de las ADSC que se desarrollaran al expandirse en el cultivo van a exhibir diferenciación por lo menos a una de las tres líneas mesodérmicas examinadas (osteogénica, adipogénica, y condrogénica) por medio de histoquímica. Inclusive en algunos casos los clones exhibieron diferenciación en las tres líneas celulares siendo positivas para Fosfatasa Alcalina (AP), Aceite Rojo O y Azul Alsaciano (Zuk et al., 2002). De esta manera se ha podido determinar que dentro de las mismas ADSC se van a encontrar células con menor capacidad de diferenciación que otras. En el caso de esta otra población presentaron un potencial dual de diferenciación (osteogénico / adipogénico, y osteogénico / condrogénico) y en algunos casos solo presentaron potencial para diferenciar en una línea específica (adipogénica). (Zuk et al., 2002)

Por su parte Guilak et al. reportan que el 81% de los clones derivados de ADSC progenitoras se diferencian en al menos una de las líneas celulares. Además el 52% de los clones se diferencian en dos o más líneas celulares. Mas clones expresaron fenotipos de osteoblasto (48%), condrocito (43%) y células nerviosas (52%) que de adipositos (12%), probablemente por la pérdida de la habilidad adipogénica debido a los subcultivos repetidos. La diferenciación de cada línea celular se realizó por medio de análisis histológicos y bioquímicos. Estos hallazgos son consistentes con la hipótesis de que las ADSC son una población multipotente y no simplemente una población mezclada de células progenitoras unipotentes. (Guilak et al., 2006)

1.4.1.3. Propiedades

Como se dijo con anterioridad las ADSC van a ser células pluripotenciales las cuales tiene la capacidad de diferenciarse en distintas líneas celulares, teniendo esto un gran potenciales en lo que se refiere a terapias celulares.

Existe controversia sobre el momento en el que se deben de cultivar las células. Por un lado Zuk et al. reporta que este tipo de célula va a mantener su morfología y sus características inmunofenotípicas a través del periodo de cultivo, y que lo que hay que cuidar es que las células alcancen niveles subconfluentes para que las ADSC no se diferencien espontáneamente (Zuk et al., 2001).

Por otro lado Rubio et al. reportó que las ADSC van a presentar cambios morfológicos e inmunofenotípicos después de 2 meses de estar en cultivo, en este caso lo más interesante es que se reporta que después de estos cambios estas células van a presentar características tumorales produciendo metástasis a la hora de ser inyectadas intravenosamente en ratones (Rubio et al., 2005)

En lo que respecta a la diferenciación de las ADSC en los tejidos deseados, estudios han determinado que estas células necesitan factores de inducción específicos, estimulación mecánica, contacto con las células en las cuales se deben transformar y con su matriz para diferenciarse a la línea celular deseada (Smith et al., 2003; Zuk et al., 2002, Zuk et al., 2001). Al necesitar todos estos estímulos las ADSC deben ser colocadas en el sitio de la lesión del órgano que se desea regenerar, esto para alcanzar su máximo potencial de diferenciación (Smith, 2004).

Por otro lado se comprobó que es menos efectivo si las ADSC se diferencian *in vitro*

en los tejidos deseados (con el fin de reimplantar este nuevo tejido en el sitio de la lesión), ya que se pierde parte de su potencial de diferenciación (Smith, 2004).

En el caso del donador, la mayoría de literatura reporta que para evitar reacciones adversas lo ideal es que el transplante de células madre sea autólogo (Smith, 2004 Smith et al., 2003). McIntosh et al. determinaron que el SVF y las ADSC recién aisladas estimulaban la respuesta de las células T. Pero estas mismas células después del pasaje P1 fallaban en estimular una respuesta de las células T. De hecho, ADSC sometidas a más pasajes suprimían la respuesta linfocítica. Esto soporta teóricamente a futuro los trasplantes heterólogos y los bancos celulares para terapia, por lo que se necesita estudios *in vivo* confirmatorios para esta línea terapéutica (Mc Intosh et al., 2006)

1.4.2. Propiedades mecánicas y patofisiología de tendón y ligamentos

1.4.2.1. Propiedades mecánicas

En términos mecánicos el tendón funciona primariamente como un transmisor de fuerza. Otros atributos descubiertos recientemente son: amplificador dinámico durante contracción rápida muscular, reserva de energía elástica, y atenuador de fuerzas al realizarse movimientos rápidos e inesperados (Hinchcliff, 2004; Stashak, 2002).

En el caso de la reserva de energía, esta va a ser acumulada en el tendón cuando la estructura está en extensión. Para que este sistema maximice su eficiencia el tendón debe de estirarse lo más posible, es por esto que un pequeño deterioro en las propiedades mecánicas va a producir un aumento peligroso del riesgo (Stashak, 2002). Aún así se ha demostrado que el tendón sano puede devolver la energía elástica con una efectividad del 93% (versus un 30% del músculo) lo que provee al equino de un sistema de ahorro de energía altamente eficiente

(Hinchcliff, 2004).

Cortes histológicos de tendón han demostrado que en casos de lesiones agudas y crónicas se va a presentar pérdida del patrón de ondulación, esto debido a la pérdida de la capacidad de rebote al estar expuesto a tensiones muy grandes (Stashak, 2002).

El problema es que estudios han determinado que los tendones se estiran hasta un 16% de su longitud cuando son expuestos a las tensiones de la competencia, y por otro lado se han realizado estudios *in vitro* que indicaron que el límite elástico de estas estructuras es entre 12 y 20%. Por lo tanto se deduce que los tendones trabajan dentro de un margen de seguridad muy bajo cuando son expuestos al peso y a la velocidad del galope (Hinchcliff, 2004).

1.4.2.2. Repuesta de los tendones y ligamentos a la lesión y su reparación

Las lesiones de tendón y ligamento son la patología ortopédica más común en animales deportivos, entiéndase equinos y humanos (Stashak, 2002). El tendón es una estructura que tiene una lenta capacidad de regeneración debido a que presenta un alto contenido de colágeno y un número de células muy bajo. Los fibroblastos tendinosos van ser los responsables de la crítica tarea de mantener la integridad de la matriz que los rodea. Cuando el balance de la degradación de la matriz vieja o dañada y la producción de nuevas moléculas de matriz es alterada, el daño al tendón se acumula, y eventualmente conlleva a los signos clínicos de una disfunción tendinosa o el en peor de los casos a su fallo (Dahlgren, 2005).

Los tendones y ligamentos se pueden lesionar de dos maneras: la primera sería el sobre esfuerzo que se va a presentar cuando se da una sobrecarga súbita de la estructura tendinosa la cuál no soporta la tensión; este tipo de lesión es la más frecuente (Stashak, 2002). En estos casos se sabe que la lesión clínica es precedida por una fase de degeneración, esta

degeneración esta ligada a la fase inicial de la tendinopatía puede llamarse “inflamación molecular”, que no provoca una respuesta en el proceso de reparación, pero que progresivamente debilita el tendón (Stashak, 2002).

La lesión clínica va a variar desde debilitamiento fibrilar, ruptura de uniones cruzadas, a ruptura fibrilar y hasta separación completa de la estructura tendinosa (Hinchcliff, 2004). Una vez producida la lesión clínica con disrupción de la matriz tendinosa se va a producir una hemorragia intratendinosa inicial, seguida rápidamente de una reacción inflamatoria. Esta resulta en aumento del flujo sanguíneo, edema e infiltración de neutrófilos, macrófagos y monocitos, que a su vez van a liberar enzimas proteolíticas (reparación extrínseca). Y aunque esta etapa de la reparación esta diseñada para eliminar el tendón dañado, normalmente causa más daño que beneficio (Hinchcliff, 2004; Stashak, 2002). Es importante denotar que la producción de fibrina y aumento de células inflamatorias va a ser proporcional al tamaño de la lesión y a la cantidad de trauma que se haya producido (Stashak, 2002).

Luego, en los primeros días se va a iniciar la fase reparativa, esto va a producir una pronunciada respuesta angiogénica y en la síntesis de tejido cicatrizal (reparación intrínseca). Este nuevo tejido va a presentar una mayor proporción de colágeno tipo III, GAGs y una menor concentración de COMP. Aunque el colágeno tipo III se transforma gradualmente en tipo I conforme la cicatriz madura, este tendón va a ser una estructura mucho menos elástica que la anterior (Hinchcliff, 2004; Stashak, 2002). Al ser su estructura más rígida compromete su función y predispone a recaídas (Stashak, 2002).

Por esta razón es de vital importancia conocer los factores de riesgo para poder implementar prácticas que disminuyan la prevalencia de estas lesiones. Entre los factores de riesgo más comunes podemos encontrar la velocidad a la que es trabajado el animal, el peso

que el animal carga, la fatiga, el herraje y el terreno.

1.4.3 Revisión de las opciones terapéuticas para el tratamiento lesiones de tendón y ligamento.

Aunque las lesiones de tendón y ligamento son comunes en caballos de deporte y carrera, el tratamiento de estas lesiones de tendón en los equinos es un problema complejo para veterinarios, dueños y entrenadores. Este tipo de lesiones resultan en pérdidas económicas significativas para la industria ecuestre debido a disminución del desempeño del animal, rehabilitaciones prolongadas y enfermedades recurrentes. Es importante mencionar que la recurrencia de los casos de tendinitis después de que los animales se ven expuestos a la carga completa de trabajo normalmente es muy alta (Dalhgren, 2005; Crowe, 2004; Dyson, 2004; Kasashima *et al.*, 2004; Ross & Dyson, 2003; Smith *et al.*, 2003; Stashak, 2002; Becker *et al.*, 1998; Gibson *et al.*, 1997; Dyson, 1991 a, b; Gaughan *et al.*, 1991).

El fin de las terapias tradicionales tanto médicas como quirúrgicas ha sido disminuir la inflamación, prevenir que ocurra más daño al tendón, disminuir las fuerzas tirantes en la estructura tendinosa y aumentar la vascularización en el núcleo de la lesión (Dalhgren, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente las lesiones de tendón tratadas tradicionalmente sanan formando tejido cicatrizal que es mecánica y bioquímicamente de inferior calidad que el tendón normal. Además, no presenta la elasticidad y la resistencia para soportar las altas y repetitivas fuerzas tensiles a las que se ven expuestas estas estructuras (Dalhgren, 2005).

Aunque faltan muchos años de investigación para encontrar una terapia totalmente efectiva, existen varias líneas de terapia prometedoras que están siendo investigadas y utilizadas en la práctica equina internacional (Dalhgren, 2005). El fin de esta revisión es proveer un resumen de las opciones terapéuticas que en la actualidad se tienen nacional e

internacionalmente y que se utilizan en casos de lesiones de tendón en equinos.

1.4.3.1 Tratamientos Tradicionales:

En lo que respecta a tratamientos tradicionales se ha podido determinar por medio de distintos estudios que en la mayoría de los casos lo que se forma después de una lesión de tendón, es una cicatriz no elástica con una alta prevalencia de recaídas. Está fuera del espectro a cubrir por esta tesis repasar una por una cada línea de terapia pero se mencionarán las diferentes líneas de terapia consideradas como tradicionales.

Dentro de los tratamientos tradicionales más utilizados se encuentran: ejercicio controlado, corticosteroides, antiinflamatorios no esteroideos, hyaluronato de sodio, glicosaminoglicanos polisulfatados (PSGAG), beta aminopropionitril fumarato (BAPN), desmotomía de ligamento accesorio superior, disección tendinosa en el sitio de la lesión (“tendon splitting”), terapia láser, terapia con ultrasonido e irritación con químicos o fuego (Dyson et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002; Gaughan et al., 1995).

1.4.3.2 Tratamientos Nuevos:

Como respuesta a los resultados pobres a la hora de utilizar las terapias tradicionales, se ha continuado investigando en otras líneas de terapia que logren devolver la funcionalidad a la estructura tendinosa y ligamentosa, para de esta manera disminuir la prevalencia de recaídas.

Dentro de las terapias de última generación que reporta la literatura se encuentran: terapia de ondas extracorpóreas (Shock Wave Therapy), suplementación de “andamios” (A Cell Vet Powder), factores de crecimiento, inyección de médula ósea autóloga, reimplantación

de MSC autólogas y reimplantación de ADSC autólogas (Dahlgren, 2005; Ji Gang et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Smith et al., 2003)

En lo que respecta a la reimplantación de ADSC autólogas la empresa estadounidense Vetstem Inc. presenta la opción de poder obtener una cantidad substancial de ADSC rápidamente (48h). Estas células se obtienen por medio de la extracción de tejido adiposo de la sección abaxial proximal de la base de la cola por medio de una cirugía sencilla y luego se lleva al laboratorio para ser procesado. Una vez procesado estas células se inyectan al tendón o ligamento guiando la aguja por medio del ultrasonido (Dahlgren, 2005).

En una investigación preliminar usando un modelo tendinitis inducida por medio de colagenasa, se realizó un estudio clínico controlado conducido por el Dr. Alan Nixon y la Dra. Linda Dahlgren del Laboratorio de Ortopedia Comparativa, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Cornell, NY, USA. En este se tomaron 8 equinos a los cuales se les inyectó colagenasa para inducir una lesión en el tendón flexor digital superficial de uno de sus miembros anteriores, después de 48 horas de cultivo celular se trataron 4 animales con MSC extraídas de tejido adiposo montadas en Salina Bufferada Fosfato (PBS) y los otros 4 con PBS como control. Las lesiones de tendón se siguieron ultrasonográficamente cada semana por 7 semanas, tiempo en el cuál los animales fueron sacrificados y sus tendones extraídos para su estudio (Nixon & Dahlgren, 2004).

El experimento reveló que existía mejoría estadísticamente significativa en cuatro parámetros:

1. Infiltrado de células inflamatorias: No existió infiltrado inflamatorio en los caballos tratados, y fue moderado en los no tratados; demostrando de esta manera el efecto antiinflamatorio de esta terapia ($p= 0,01$).

2. Uniformidad de las fibras de colágeno: mejoría significativa en la arquitectura tendinosa mostrando mayor uniformidad del colágeno ($p= 0,01$).
3. Patrón de Ondulación: Mejoría significativa del patrón de ondulación visualizado por medio de luz polarizada, indicando la formación de uniones cruzadas normales en el tendón ($p=0,04$).
4. Puntaje de regeneración global del tendón: Mejoría estadísticamente significativa en los grupos tratados mostrando beneficio generalizado sobre la regeneración del tendón ($p= 0,03$) (Dahlgren, 2005; Nixon & Dahlgren, 2004).

Otros parámetros reportados como tendencias en el estudio fueron; el alineamiento de las fibras de colágeno, la forma y densidad de las células tendinosas, la disminución de las hemorragias, la disminución del tamaño y grado ultrasonográfico de la lesión y mejora del alineamiento ultrasonográfico (iniciando con valores equivalentes o peores a los controles) (Dahlgren, 2005; Nixon & Dahlgren, 2004).

Además de esto se realizaron análisis bioquímicos de los tendones, encontrando que esta línea de terapia aumentaba significativamente la expresión genética de la Proteína de Matriz Oligomérica Cartilaginosa (COMP), que cumple una función importante catalizando los eventos iniciales de la formación de las fibras de colágeno (acelera fibrilogénesis), además organiza la matriz tendinosa uniendo el colágeno fibrilar por medio de un mecanismo dependiente de zinc (Dahlgren, 2005; Hinchcliff et al., 2004). Esto es vital para la reestructuración del tendón ya que el 80% de su peso seco es colágeno tipo I (Hinchcliff et al., 2004). Todo lo anterior favorece a la normalización de la arquitectura tendinosa devolviéndole a estos sus propiedades mecánicas que son las que al final van a hacer que el tendón soporte la

presión repetida del ejercicio con una mucho menor reincidencia de las lesiones (Dahlgren, 2005), versus la formación de cicatriz desordenada y no flexible propensa a recaídas que se forma normalmente en estos casos aunque se realicen tratamientos tradicionales (Dyson, 2004; Hinchcliff et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002).

Cabe mencionar que en este estudio no se revelaron cambios significativos en lo que respecta a análisis bioquímicos de ADN, glicosaminoglicanos, contenido total de colágeno o expresión genética de colágeno tipo I y III o decorin (Dahlgren, 2005).

Es por eso que en este momento Vetstem está realizando tratamientos contra tendinitis y desmitis usando MSC de origen graso, en cientos de equinos en los Estados Unidos con excelentes resultados clínicos. Según datos facilitados por la compañía Vetstem Inc. en caballos de carrera, han obtenido resultados favorables o muy favorable en 80% de los casos al primer, tercer y sexto mes después del tratamiento al ser estudiados ultrasonográficamente, además de que el 75% de los animales vuelven a carga de trabajo completa 6 meses después de la terapia (Anónimo, 2004).

2. METODOLOGÍA: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Descripción de casos y clasificación de las lesiones

Los casos clínicos se seleccionaron de las lesiones de tendón en pacientes equinos referidos al Hospital de Especies Mayores de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, además de otros casos de servicios ambulatorios privados. Los caballos seleccionados presentaron lesiones en ligamento suspensorio, flexor digital superficial y flexor digital profundo.

Es importante recordar que los casos clínicos solo se usaron para poner en práctica el protocolo establecido y no para realizar un estudio caso control, ya que estos han sido realizados en el pasado en otras partes del mundo, comprobándose que la terapia regenera efectivamente los tendones y ligamentos.

El diagnóstico de la claudicación se realizó analizando la anamnesis y los diferentes signos clínicos encontrados por medio de observación, palpación, movimiento, manipulaciones y analgesia diagnóstica si es necesaria (Hinchcliff *et al.*, 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002; Adams, 1974).

Para el diagnóstico definitivo y clasificación final de la lesión se utilizó un ultrasonido marca Aloka con un transductor de 7,5 MHZ, además de un “pad” de silicón marca Aquaflex. Las estructuras tendinosas y ligamentosas se dividieron en las zonas descritas por Rantanen en el libro “Diagnosis and Management of Lameness in the Horse” y por Wrigley en el libro “Adams Lameness in the Horse” (Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002).

Para caracterizar las lesiones se utilizaron los siguientes parámetros: localización de la lesión, extensión de la lesión, alteraciones en la ecogenicidad (ES de 0 a 3) y su patrón , el

puntaje al alineamiento de fibras (FAS de 0 a 3), porcentaje del área seccional transversa (L-CSA) de la lesión (CSA total de la lesión dividido por el total del CSA del tendón o ligamento) y los cambios en las características de la lesión conforme pasa el tiempo (Hinchcliff *et al.*, 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002; Reef, 1998).

2.2 Temporalidad de las lesiones

Luego, las lesiones se agruparon dependiendo de la temporalidad de la lesión, si esta tiene de 0 a 7 días se clasificó como aguda, ya que aunque normalmente se clasifica como aguda de 24 a 48 horas, la lesión puede seguir en proceso de expansión hasta los 7 días post lesión (Hinchcliff *et al.*, 2004) y se trataron por medio de terapia antiinflamatorio no esteroideos sistémicos (Flunixin meglumine o fenilbutazona) a la dosis recomendada y hielo en sesiones de 30 minutos 3 veces al día, además de un vendaje de compresión (Hinchcliff *et al.*, 2004; Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002; Dabareiner *et al.*, 2000). En este periodo no se deben de implantar las células ya que se pueden ver afectadas por el proceso inflamatorio (Smith, 2004).

Si la lesión tiene de 7 a 28 días es subaguda, esta se encuentra en el periodo ideal de implantación de las células ya que en este momento existe una cama vascularizada y factores de crecimiento que van a fomentar el desarrollo de las ADSC. Por otra parte si la lesión tiene 28 o más días se clasificó como crónica; en este caso el pronóstico es reservado y el objetivo es promover la regeneración en las regiones activas (reacción inflamatoria) (Smith, 2004; Ross & Dyson, 2003).

2.3 Extracción del tejido adiposo

Los casos clínicos fueron referidos al Hospital de Especies Mayores de la Escuela de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, para realizar la cirugía de extracción de la grasa, en la Sala de Imágenes y Procedimientos Especiales de la cátedra.

Una vez que animal se trasladó a la sala antes mencionada, se procedió a sedarlo con una dosis de 1.1 mg/kg de xilazina IV, luego de esto se depiló la zona abaxial proximal de la base de la cola y desinfectó preliminarmente para realizar la desensibilización de la región (Dahlgren, 2005). Para esto se utilizó un bloqueo en L invertido con lidocaína al 10% (Turner & McIlwraigh, 1989).

Posterior al bloqueo se preparó quirúrgicamente la zona con alcohol-yodo. Se debe de utilizar un campo estéril con ventana en el sitio de la incisión, además de guantes estériles, gorro y bozal de cirugía. La incisión se realizó en piel y es de aproximadamente de 7 cm. de largo, al llegar al tejido subcutáneo se hace disección roma con unas tijeras Metzembraum para extraer de este manera de 20 a 30 gramos de tejido adiposo (Dahlgren, 2005). El tejido extraído asépticamente se colocó en un medio de transporte para células que contiene PBS 1x con 0,5% de gelatina, penicilina 1000 U/ml y estreptomicina 1000 ug/ml y anfotericina B a 50 ug/ml, además el paquete se debe mantener en refrigeración hasta que se lleva al laboratorio a procesar (Herrero & Hun, 2002).

La incisión se cierra utilizando vicryl o ácido poliglicólico 2-0 en el subcutáneo y nylon o ácido poliglicólico 1 en piel. Además se medicó al animal con antibióticos de amplio espectro por 3 días como profiláctico (Turner & McIlwraigh, 1989).

2.4 Aislamiento, cultivo y recuperación de las células

Después de la cirugía el autor transportó la muestra de grasa al laboratorio donde se

procederá a extraer las ADSC tomando como base los protocolos descritos por la Dra. Zuk y el Dr. R.K. Smith en sus respectivos artículos, además de otros aspectos tomados del Manual de Procedimientos de Virología Médica. A estos protocolos se les realizaron las modificaciones necesarias para tratar de mejorar el crecimiento celular (Smith et al., 2003, Herrero & Hun, 2002; Zuk et al., 2001).

La muestra de tejido adiposo con el medio de transporte se manipuló dentro de un ambiente controlado en una cámara de flujo laminar. Ahí se extrae la muestra del medio de transporte y se procedió a picarla en pequeños trozos para facilitar de esta manera el efecto de la colagenasa.

Los trozos obtenidos se lavaron extensivamente con PBS, después de esto la muestra se procesó a 37°C por treinta minutos con colagenasa al 0,075%. Al finalizar esto se centrifugó a 1200 x g por 10 minutos descartando posteriormente el sobrenadante para obtener así el botón celular (Zuk et al., 2001).

El botón celular se resuspendió en 10ml de medio de crecimiento (Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con 10% Suero Fetal Bovino (SFB)) para poder filtrarlo y además inactivar la colagenasa residual. Una vez en el medio se procedió a pasarlo por un filtro de gasa estéril para de esta manera remover los detritos celulares. Una vez filtrado se centrifugó nuevamente para concentrarla. El botón celular obtenido es conocido como Fracción Estromal Vascular (SVF). El SVF se resuspendió en 5ml de DMEM y se colocó en una botella de 25 cm² incubándose a 37°C / 5% CO₂ por 18 horas (Zuk et al., 2001). Luego de la incubación se deben realizar lavados extensivos con PBS para remover los eritrocitos residuales no adherentes. La población restante es conocida como Lipoaspirado Procesado (PLA) para distinguirlo del SVF obtenido del tejido adiposo extraído.

Las células del PLA se mantuvieron a 37°C/5% CO₂ en el medio de crecimiento Ham's F12 complementado con 2mM de L-glutamina ajustado para que contenga 1,5 g/L de Bicarbonato de Sodio y suplementado con 0,1mg/ml de heparina y 0,03 mg/ml de suplemento de crecimiento celular endotelial y 10% de SFB. Las células se mantuvieron en este medio hasta que haya confluencia de las mismas.

Con este protocolo de cultivo las células alcanzaron confluencia aproximadamente 13 a 15 días después de que se inicia el cultivo celular. Por los conteos realizados con la Cámara de Neubauer para las implantaciones en los animales tratados sabemos que se alcanzaron aproximadamente 3 millones de células por botella de 25 cm² una vez que fueron confluentes, aun así se han logrado concentraciones de hasta 6 millones de células por botella de 25cm².

Una vez confluentes se procedió a tripsinizar las células de la botella de la siguiente manera: se decantó el sobrenadante de la botella y las células adheridas se lavaron con 5ml de PBS 1x. Las células adheridas a la botella se lavaron con 5 ml de tripsina, hecho esto se descartaron 4ml y se incubaron por 5 minutos a 37°C (Zuk et al., 2001).

Las células tripsinizadas se resuspendieron en medio de cultivo descrito anteriormente para de esta manera inactivar la enzima. Luego de esto se montaron en la cámara Neubauer y se procedió a contar las MSC y de esta manera lograr la concentración deseada (Herrero & Hun, 2002; Zuk et al., 2001.). Las células aisladas se colocaron en 1ml o 1,5 ml PBS en una jeringa y se mantuvieron en refrigeración hasta que se implantaron en el tendón o ligamento afectado (Dahlgren, 2005).

Es importante denotar que no se recomienda utilizar más de 1,5 ml en una lesión de núcleo ya que el fluido inyectado podría producir disrupción de las fibras sanas. Aproximadamente deben de haber un mínimo de 50,000 células cada 0,1 ml para obtener los

resultados deseados de regeneración de la estructura (Smith *et al.*, 2003)

2.5 Preparación y reimplantación de las MSC

Para la reimplantación se sedó el animal con xilazina utilizando la misma dosis que se mencionó anteriormente. Además se realizó un bloqueo anestésico regional para minimizar el riesgo de que el animal reaccione bruscamente a la inyección y pueda derramar y perderse las ADSC, en el caso del miembro anterior se realiza el bloqueo lateral palmar y en el miembro posterior se bloquearán los nervios tibial y perineal superficial y profundo según la técnica descrita en la literatura (Ross & Dyson, 2003; Stashak, 2002; Adams, 1974).

El sitio de la lesión debe depilarse y prepararse quirúrgicamente para realizar la inyección asépticamente. El transductor de 7,5 MHz se introdujo en un guante estéril con gel por la parte interna y se anudó a la cabeza del transductor, luego se procedió a utilizar gel de ultrasonido estéril o alcohol externamente y en la extremidad para realizar el ultrasonido palmar de la zona afectada y así localizar el sitio exacto de la lesión (Dabareiner *et al.*, 2000).

Luego de esto se introdujo una aguja calibre 18 de 1,5 pulgadas de largo hacia la lesión guiándola por medio del ultrasonido. Se dejó un poco de gas en la jeringa para poder liberarlo dentro de la estructura y así localizar con mayor facilidad la aguja, esto debido a las características ecogénicas del gas. Una vez en el sitio se dejó que drenara el fluido o suero acumulado, después las células se reimplantaron en el tendón (Dabareiner *et al.*, 2000).

Al finalizar el procedimiento se realizó un vendaje de Robert Jones Modificado con un apósito estéril en el sitio de la inyección, esto se mantuvo en el lugar por aproximadamente 1 semana (Dabareiner, 2000). Se utilizó penicilina-estreptomicina por 3 días para evitar cualquier infección secundaria al procedimiento, además se utilizó Flunixin Meglumine a la dosis recomendada por 2 días para evitar la inflamación y el dolor por la penetración de la

aguja en la estructura tratada.

2.6. Identificación de las células aisladas

2.6.1 Morfología de las células en cultivo

Para determinar la morfología y el comportamiento de las células en cultivo se procedió a comparar la morfología de los diferentes cultivos a lo largo de su expansión en la botella de 25cm² y después de los pasajes. Esto fue realizado con la cooperación de la Dra. Patricia Venegas del Laboratorio de Citogenética del Hospital de Niños y Francisco Vega del Laboratorio de Virología Médica de la UCR.

Las células se implantaron en el medio de crecimiento antes mencionado y además en un medio DMEM 10% SFB, 2mmol de L- Glutamina, 1% ATB y Ham's F10, 10% SFB, 2mmol de L- Glutamina y 1% ATB. Para observar su morfología y comportamiento se utilizaron un microscopio de luz invertido y un microscopio de contraste de fase. Esta parte es importante ya que se reporta en diferente literatura científica que las ASDC presentan una morfología tipo fibroblasto y que esta morfología se mantiene constante a lo largo de varias semanas de cultivo y pasajes (Rubio et al., 2005; Strem et al., 2005; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001). Esta característica es muy importante ya que el cultivo de ASDC normalmente es muy homogéneo y no presenta otros tipos de células (Zuk et al., 2001)

En el caso de Rubio et al. reportan que después de aproximadamente dos meses en cultivo y someterse a varios pasajes, si van a haber cambios morfológicos (células pequeñas y compactas) e inmunofenotípicos que se van a reflejar en características tumorales de las células (Rubio et al., 2005)

2.6.2 Tinciones histopatológicas

Para la identificación de la ADSC se procedió a diferentes tinciones básicas e histoquímicas para tratar de caracterizar las células. En lo que respecta a la identificación de las células se refirieron al Laboratorio de Patología del Hospital de Niños (Dra. Silvia Santamaría y el Dr. Alfonso Carranza) y del Hospital México (Dr. Constantino Lianoi), las células después de ser tripsinizadas fueron montadas en PBS, una vez en suspensión se centrifugaron y se prepararon de manera que se formara una monocapa. En algunos casos también se realizó citología por medio de frotis simples.

Una vez montadas en un portaobjetos se procedió a realizar un panel de distintas tinciones entre las que están Hematoxilina / Eosina, Giemsa, PAS, Azul Alsaciano, Azul de Toluidina (metacromática), esto con el fin de observar sus características morfológicas primeramente y en segundo lugar determinar si las células eran positivas a tinciones para algunos tejidos de origen mesenquimal.

En el caso de la H \ E y el Giemsa son tinciones básicas que se realizaran con el fin de determinar sus características morfológicas. En el caso de la tinción de PAS se realizó ya que van a teñirse como positivos (color magenta) a ella carbohidratos y complejos carbohidrato-proteína que se encuentran normalmente en estructuras como glicosaminoglicanes, mucoproteínas, matriz de cartílago y otros. Luego se procedió a realizar la tinción metacromática y el azul alsaciano los cuales tiñen mucopolisacáridos y en el caso de la metacromática específicamente mucopolisacáridos ácidos, son positivas a estas tinciones histoquímicas secreciones celulares como matriz cartilaginosa u ósea, tejido conjuntivo y mucina (Banks, 1986).

2.6.3 Citometría de Flujo

Con el fin de caracterizar inmunofenotípicamente las células aisladas por medio de una citometría de flujo se procedió a enviar una muestra de células al Laboratorio de Investigación del Hospital de Niños con el fin de que fueran analizados por la Dra. Berta Valverde. La caracterización de las células se realiza mediante técnica de doble y triple marcaje de inmunofluorescencia directa empleando AcMo combinados con fluoresceína, ficoeritrina, PerCP y APC. El análisis se efectuó en un Citómetro de Flujo (FACScalibur, Becton Dickinson, San José, CA.) mediante los programas CELLquest y PAINT-A-GATE (Becton Dickinson, San José, CA.) explorándose al menos 10.000 células por antígeno (Porrás, 2006).

El panel de AcMo incluye los siguientes anticuerpos monoclonales al diagnóstico: CD34, CD13, CD44 y CD45; siendo los tres primeros marcadores reportados como positivos para las ADSC según la literatura científica y el último un control negativo ya que es específico de células hematológicas (Rubio et al., 2005; Strem et al., 2005; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2002).

2.6.4 Formación de teratomas en ratones

En otro intento de identificar las células y su pluripotencialidad se procedió a inyectar ADSC subcutáneamente en ratones inmunodeficientes con el fin de determinar si se formaba algún tipo de teratoma, como lo que reporta Przyborski et al. utilizando células de origen embrionario. En este caso se contó con la colaboración de los Drs. Ricardo Estrada y Bruno Lomonte del Instituto Clodomiro Picado.

En este experimento se inyectaron 250000 ADSC con 4 pasajes subcutáneamente en

ratones inmunosupresos con corticosteroides. Después se esperaría un tiempo prudencial para determinar si se formaba algún tipo de masa para luego estudiarla histológicamente.

3. RESULTADOS

3.1 Aislamiento, cultivo y recuperación de las células

Después de aplicar el protocolo de aislamiento a las muestras de grasa, las células presentan una morfología redondeada. Una vez en cultivo, después de aproximadamente 5 días las células aisladas se elongaron, presentando morfología tipo fibroblasto. Aproximadamente 13 días después las células alcanzaron confluencia en la botella de 25cm². Al realizar los conteos con la Cámara de Neubauer se obtuvo en promedio una concentración de 3 millones de células por botella.

3.2 Identificación de las células aisladas

3.2.1 Morfología de las células en cultivo

Una vez en cultivo se presentaron como una población homogénea de células elongadas, filiformes, granulares y con digitaciones (tipo fibroblasto). Estas mantuvieron su morfología por periodos de cultivo relativamente prolongados (1 mes).

3.2.2 Tinciones histopatológicas

Al realizar las tinciones de H/E y Giemsa se pudo determinar que se trataban de células de gran tamaño, granulares, núcleos grandes, y nucleolos prominentes. Al realizar histoquímica con las tinciones de PAS, Azul Alsciano y Azul de Toluidina, las células fueron teñidas positivamente.

3.2.3 Citometría de Flujo

Luego de realizar un panel de AcMo con CD34, CD13, CD44 y CD45, se obtuvieron los siguientes resultados: células autofluorescentes, viables, altamente granulares, y de gran tamaño.

3.2.4 Formación de teratomas en ratones

Al implantar subcutáneamente las células en los ratones inmunosupresos no se presentó la formación de ningún tipo de masa tumoral.

Cuadro 1. Resumen de los resultados obtenidos en la investigación.

<u>RESULTADOS</u>	
Características Morfológicas	Células elongadas con digitaciones(tipo fibroblasto)
Características de Cultivo	Cultivos con poblaciones celulares homogéneas. Mantienen morfología estable por periodos prolongados de cultivo, en diferentes medios de cultivo y post-congelación.
Tinciones histopatológicas	<i>H/E</i> y <i>Giemsa</i> : células de gran tamaño, granulares, núcleos grandes y nucleolos prominentes. <i>PAS</i> , <i>Azul Alsaciano</i> y <i>Azul de Toluidina</i> : positivas a todas las tinciones.
Citometría de flujo	Células autofluorescentes, viables, granulares y de gran tamaño.
Formación de teratomas en ratones	Negativo
Resultados clínicos	Efecto antiinflamatorio, disminución de la distensión de la vaina sinovial, mejoramiento de alineamiento de fibras y el puntaje ecográfico (US), y mejoramiento del grado de claudicación.

4. DISCUSION

Como se ha mencionado anteriormente, la motivación de los investigadores a nivel mundial de seguir desarrollando líneas de terapia nuevas para casos de tendinitis y desmitis en equinos, ha sido definitivamente los deficientes resultados que se han obtenido a lo largo de los años con las terapias tradicionales, reflejándose esto en la alta recurrencia de las lesiones tratadas. (Dahlgren, 2005; Crowe et al., 2004; Dyson, 2004; Kasashima et al., 2004; Ross & Dyson, 2003; Smith et al., 2003; Stashak, 2002; Becker et al., 1998; Dyson, 1991 a, b; Gaughan et al., 1991).

Las estructuras tendinosas y ligamentosas tienen una lenta capacidad de regeneración ya que presenta un alto contenido de colágeno y un número de células muy bajo. Como se mencionó con anterioridad, los fibroblastos tendinosos van ser los responsables de la crítica tarea de mantener la integridad de la matriz que los rodea. Cuando el balance de la degradación de la matriz vieja o dañada y la producción de nuevas moléculas de matriz es alterada, el daño al tendón se acumula, y eventualmente conlleva a los signos clínicos de una disfunción tendinosa o el en peor de los casos a su fallo (Dahlgren, 2005).

Las lesiones de tendón tratadas tradicionalmente sanan formando tejido cicatrizal que es mecánica y bioquímicamente de inferior calidad que el tendón normal. Además, no presenta la elasticidad y la resistencia para soportar las altas y repetitivas fuerzas tensiles (estirarse hasta 16% de su longitud) a las que se ven expuestas estas estructuras (Dahlgren, 2005; Hinchcliff, 2004). Si sumamos la pérdida de la funcionalidad de la estructura más altas cargas mecánicas normalmente lo que vamos a obtener son lesiones recurrentes.

Costa Rica no escapa a esta tendencia y por ende el cliente está anuente a utilizar en

sus animales líneas de terapia que vayan en pro de aprovechar el potencial genético de animales que lesionados no lo podrían hacer (Estrada & Montero, 2006). La problemática de esto es que la mayoría de líneas de terapia nuevas que se utilizan alrededor del mundo son muy costosas y difíciles de acceder en nuestro país, saliéndose de esta manera de la realidad nacional (Estrada & Montero, 2006).

Por lo tanto nace esta investigación, con el fin de comprobar que en este país realmente si es posible desarrollar una de las opciones terapéuticas más prometedoras en lo que respecta a la regeneración tisular: tratamiento de lesiones de tendón y ligamentos con células madre derivadas de tejido adiposo. Todo esto a un precio accesible para los dueños y sus pacientes.

En resumen, las células madre mesenquimales van a tener el potencial de producir matriz tendinosa en vez de tejido cicatriz no elástico (Smith et al., 2003). Por otro lado van a tener un efecto antiinflamatorio y van a estimular un aumento significativo de la síntesis de proteínas como la COMP, que se sabe que son vitales catalizando la producción de colágeno (Dalhgren, 2005; Nixon & Dalhgren, 2004) y organizando las fibras longitudinalmente para que la estructura sea realmente funcional (Abousleiman et al., 2006; Dalhgren, 2005; Nixon & Dalhgren, 2004; Young et al., 1998). También se va a aumentar la resistencia del tendón a las fuerzas mecánicas comparado al no tratado (Abousleiman et al., 2006; Young et al., 1998) y la celularidad de la estructura tratada (Abousleiman et al., 2006).

Esto va a ser de vital importancia ya que el 80% del peso seco del tendón va a ser colágeno tipo I, y si este tipo de terapia estimula la cantidad y el alineamiento de las fibra colágenas, (que al final son las que van a cumplir la función mecánica de esta estructura) se va a lograr se tenga de nuevo un tendón o ligamento funcional (Dalhgren, 2005; Hinchcliff, 2004).

Se ha determinado que en el caso específico de los tendones y ligamentos esta terapia ha demostrado tener ventajas comparado a las otras líneas de terapia. Comparándolo con la implantación de medula ósea, se le implantan al animal una concentración de células mucho mayor, en un volumen menor, que no produce disrupción de las estructuras y evitando complicaciones como infecciones, sangrados y dolor crónico que conllevan la invasión al hueso (Dalhgren, 2005; Ji Gang et al., 2004).

Se ha comprobado que los factores de crecimiento que se presentan en la medula ósea estimula a que las MSC a que se diferencien hacia tejido fibroso y no hacia tejido funcional elástico (Dalhgren, 2005). Además las ADSC presentan tiempos de cultivos menores que el de las células madre mesenquimales aisladas de medula ósea; es mucho más accesible, barato y fácil de manejar que los factores de crecimiento como el IGF-1; no se necesitan de aparatos de alto valor como en la terapia con ondas de choque; ni de adquirir el tratamiento de andamios que no son accesibles en el país, y que además de que tiene un alto costo (Dalhgren, 2005).

Por otro lado cuando se comparan las ADSC y las MSC de SCU se sabe que en el cordón umbilical se va a presentar una concentración de MSC baja (Kern et al., 2006; Barker et al., 2005). También se va a presentar un porcentaje de aislamiento y una frecuencia de unidades formadoras de colonia mucho más bajo con respecto a los cultivos de ADSC. Por otro lado las MSC de SCU no tienen potencial adipogénico, que limita de cierto modo el potencial de la terapia dependiendo del caso (Kern et al., 2006).

También los costos de operación para utilizar MSC de SCU son obviamente mayores si lo comparamos a las ADSC o a las MSC de MO, ya que se tiene que tener las condiciones y el equipo para mantener los cordones congelados hasta que el paciente lo necesite, además esto aumenta los costos para el paciente que normalmente tiene que pagar por este servicio. Por

otro lado las personas adultas que no procedieron a congelar su cordón umbilical no tendrían acceso a las MSC de SCU autólogas en el caso que las necesitaran.

Es por estas razones que el autor se vio en la necesidad de explorar la terapia con ADSC en nuestro país, ya que además de ser una línea de terapia que se perfila como el futuro de la medicina regenerativa, esta ha sido respaldada por estudios científicos serios que determinan su efectividad para tratar lesiones tendinosas y ligamentosas en equinos (Abousleiman et al., 2006; Dalhgren, 2005; Nixon & Dalhgren, 2004; Young et al., 1998).

Las células aisladas en este estudio lograron ser cultivadas una vez que se sometió a la grasa a un estricto protocolo con enzimas disgregantes, filtración y centrifugación del cuál se obtuvo en cultivo una población de células tipo fibroblasto (células alargadas con digitaciones, granulares y de núcleo prominente) muy similares morfológicamente a las ADSC reportadas por distintos grupos de investigadores (Boquest et al., 2006; Strem et al., 2005; Rubio et al., 2005; Smith et al., 2003; Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002) (Fig. 1 y Fig. 2).

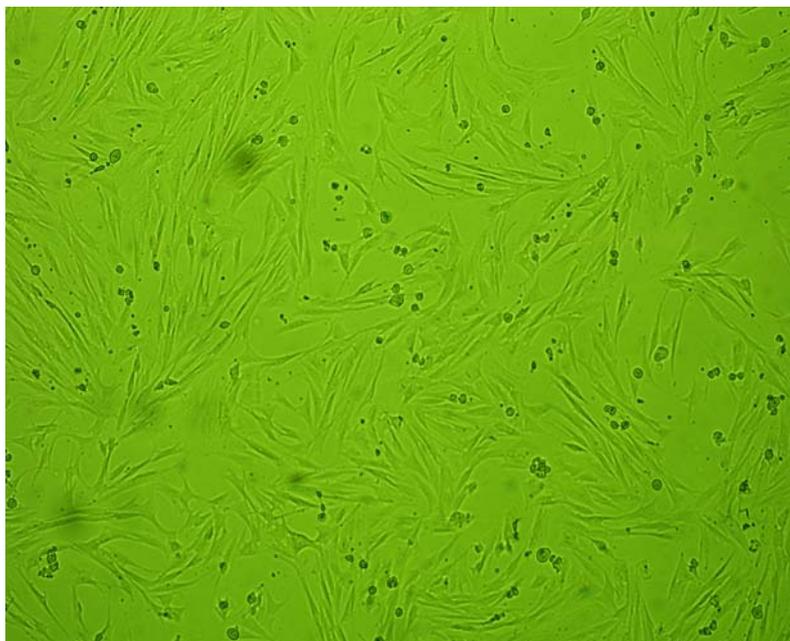


Figura 1. Morfología de las células aisladas de tejido adiposo en este estudio, vistas en

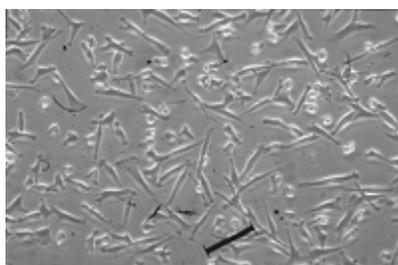
microscopio de contraste de fases.



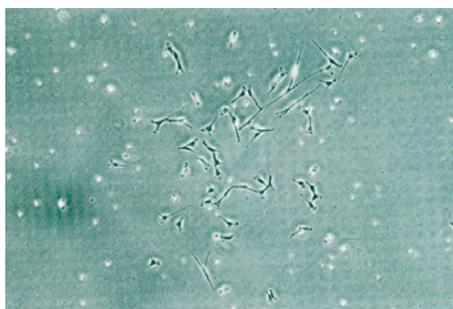
ADSC, Zuk et al., 2001



ADSC, Rubio et al., 2005



MSC de SCU, Lee et al., 2003



MSC de MO, Smith et al., 2003

Figura 2. Morfología de MSC aislados a partir de distintos tejidos en diferentes

estudios.

En este caso es interesante también que Zuk et al. determinaron que después de aplicarse este protocolo disgregante y de filtración al tejido adiposo para obtener el PLA la gran mayoría de las células aisladas (casi un 90%) era positiva al marcador inmunofluorescentes ASO2, que es específico para células de origen mesenquimal. Por otro lado más del 60% de las células fueron positivas a la vimetina, otro marcador de células de origen mesenquimal. Tanto así que Boquest et al. plantea que como método de validación final para determinar si se realizó un aislamiento exitoso de ADSC, es que después de aplicado el protocolo de aislamiento y cultivo, las células que se adhieren a la botella de cultivo adquieran una morfología tipo fibroblasto (Boquest et al., 2006).

Todo esto les llevó a concluir que las células del PLA es una población relativamente homogénea de origen mesenquimal con una baja contaminación de células endoteliales, pericitos y células de músculo liso; determinándose así que este protocolo tiene una alta especificidad para aislar las ADSC (Boquest et al., 2006; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2002). Junto a esto se ha reportado también que las ADSC van a mantener su morfología típica después de realizarse varios pasajes y estando en cultivo por largo tiempo (Boquest et al., 2006; Rubio et al., 2005; Zuk et al., 2001). Esto es congruente con nuestra investigación, la cual se mantuvo a las células en diferentes medios de cultivo y hasta por cuatro pasajes sin variar sus características morfológicas, ni su comportamiento en el cultivo.

Ha sido reportado por Rubio et al. que en este tipo de células la morfología en cultivo si es de vital importancia, ya que cuando las células pasan de tener morfología tipo fibroblasto a tener forma compacta y pequeña esta además de expresar distintos marcadores de superficie van también a presentar potencial metastático (Rubio et al., 2005).

En nuestro estudio es importante destacar que aunque se han utilizado diversos tipos de medios de cultivo (con diferentes concentraciones de sus componentes, y distintos factores de crecimiento) cuando se han tenido crecimientos celulares en el cultivo las células siempre se han mantenido con su misma morfología sin importar su tasa de crecimiento. Esto apoya aun más la especificidad del protocolo de aislamiento y su repetitibilidad. Otro hallazgo interesante es el comportamiento de las células en el cultivo, por ejemplo según la experiencia en cultivo de fibroblastos y queratinocitos por parte de la Dra. Patricia Venegas del Laboratorio de Citogenética del Hospital de Niños normalmente los fibroblastos en cultivo presentan colonias que se elongan en la botella después de cierto tiempo de cultivo (Venegas, 2006). Esto contrasta con las células aisladas en este estudio que aunque presentan una morfología tipo fibroblasto tiene un gran tropismo por formar colonias celulares altamente concentradas. Inclusive en este estudio pudimos determinar que sin importar el medio de cultivo que se utilice las células van a mantener este comportamiento. (Fig. 3).



Figura 3. Colonias celulares altamente concentradas en cultivo

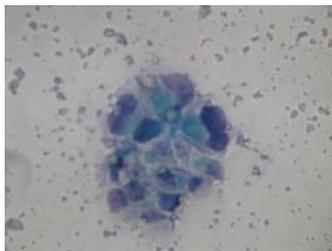
Se logró conseguir la concentración deseada de células en aproximadamente 13 días después de seguir la metodología de cultivo planteada, normalmente se lograban concentraciones de 3 a 6 millones de células después de este periodo. En este caso la duración del cultivo no es mala si se analiza el hecho de que se va a tener acceso a este tipo de terapia

en nuestro país. Aún así en USA reportan que logran conseguir concentraciones similares en 48 horas, esto nos llevó a realizar otro estudio con diferentes medios de cultivo con excelentes resultados preliminares (Smith, 2004). Se ha reportado también que la concentración de las células es importante para el efecto que se desea alcanzar y que obviamente va a depender del tamaño de la lesión. Básicamente se sabe que 500000 ASDC en 1 ml son suficientes para poblar una lesión de núcleo en un tendón, de manera que se obtengan resultados favorables (Smith et al., 2003).

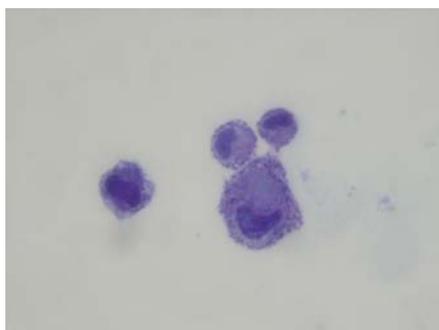
Al evaluar las células histopatológicamente se reportó lo siguiente. De las tinciones básicas con la que se lograron mejores resultados fue con la Giemsa, por medio de esta tinción y un microscopio de luz se pudo determinar que las células aisladas presentaban las siguientes características morfológicas: gran tamaño, núcleos grandes, nucleolos prominentes, y granulaciones citoplasmáticas, siendo todas estas características comúnmente halladas en células primitivas o progenitoras. Su gran cantidad de nucleolos y granulaciones sugieren además que son células muy activas (Fig. 4).

Al realizar la histoquímica se pudo determinar que efectivamente las células fueron positivas a las diferentes técnicas. Estas tinciones van a teñir positivamente muco polisacáridos y en el caso de Azul de Toluidina muco polisacáridos ácidos que normalmente se van a encontrar en tejidos de origen mesenquimal (Banks, 1986) (Fig. 5 y Fig. 6).

Después de realizar el estudio por medio de citometría de flujo se determinó que la mayoría de las células presentaron autofluorescencia, esto hace que la prueba no sea evaluable y normalmente sucede cuando los anticuerpos no reaccionan con las células. Lo más probable sea que al ser los anticuerpos anti-humano no se haya podido montar una respuesta por parte de los anticuerpos a los que las ADSC equinas fueron expuestas (Fig. 7).



Monocapa teñida con Giemsa



Frotis teñido con Giemsa

Figura 4. Células aisladas teñidas con Giemsa.



Figura 5. Células aisladas positivas a la tinción de PAS.

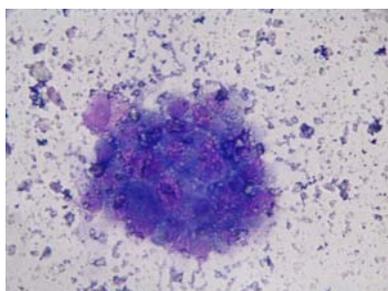


Figura 6. Células aisladas positivas a la tinción metacromática.

Además del conteo de células y tamaño se pudo determinar que eran células muy grandes, granulares y que eran viables. Es interesante también que las células se ubicaron por tamaño completamente afuera de los estándares de las células hemáticas, excluyendo de alguna manera que sean una variante de esta línea de células. esto con el fin de ver si se lograban formar teratomas como reporta Przybroski et al. cuando implantan células de origen embrionario o si no se formaba ningún tipo de masa como reporta Rubio et al. luego de implantar ADSC con menos de 2 meses en cultivo en ratones inmunosupresos.

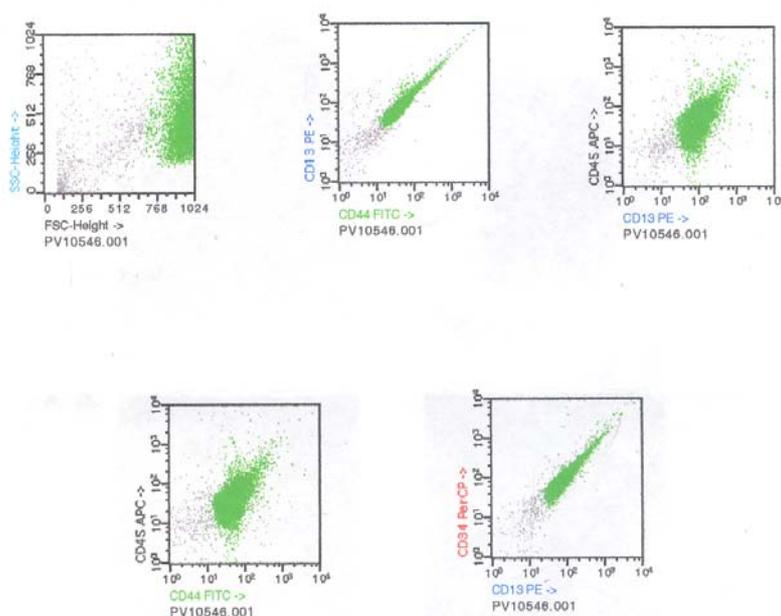


Figura 7. Citometría de flujo de las células aisladas

Luego de que se implantó las células aisladas subcutáneamente en ratones inmunosupresos, sucedió lo siguiente, de los ratones a los que se le implantaron las células madre 2 murieron a los 15 días de haber implantados las células, sin signo alguno de masas en

el sitio de la implantación, por otro lado los otros dos ratones murieron 22 días después de que se implantaran las células sin signo alguno de formación de teratomas o tumoraciones de algún tipo. Esto sugiere que las células aisladas se comportan similar a lo que reporta Rubio et al. en su estudio (Rubio et al., 2005; Przybroski et al., 2005)

Además de todo lo anterior se realizaron 3 tratamientos (2 autólogos y 1 heterólogo) con las células aisladas en animales con lesiones en tendones y ligamento. Y aunque este número de animales probablemente no tengan valor estadístico, los resultados clínicos en lo que respecta a efecto antiinflamatorio, disminución marcada de la distensión de la vaina tenosinovial, alineamiento de fibras en el sitio de la lesión al realizar el ultrasonido, restablecimiento de la función de la estructura y mejoramiento de la claudicación han sido muy alentadoras; todo esto sin reaccionar a las células implantadas. Esto coincide con los hallazgos reportados por Dalhgren y Nixon en su estudio (Nixon & Dalhgren, 2004).

En resumen, tenemos un protocolo de aislamiento altamente específico, células morfológicamente muy similares a las ADSC y MSC aisladas en otros trabajos, que mantienen su morfología sin importar el medio de cultivo en el que estén, varios pasajes o congelación, que presentan características similares a células primitivas o progenitora, que son positivas a tinciones histoquímicas que comúnmente tiñen tejidos de origen mesenquimal, que no forman ningún tipo de masa en ratones inmunosupresos y que además han producido una mejoría clínica en los casos tratados.

Todos estos hallazgos en conjunto nos permiten determinar que las ASDC comparten características importantes con las células aisladas en nuestro estudio, siendo indicativo que a partir del protocolo que se ha planteado en esta investigación realmente se puede conseguir aislar y cultivar células madre mesenquimales de origen adiposo para fines terapéuticos, en

este caso en específico para tratar lesiones en tendón y ligamento.

En lo que respecta a la reimplantación de estas células en el paciente lo que se recomienda es que se realice intralesionalmente después que se ha controlado la fase aguda inflamatoria. Ya que al estar las células en el lugar de la lesión se van a ver expuestas a estímulos como una cama vascular con factores de crecimiento específicos, estrés mecánico y con células del tejido en el cuál se desea que las células se conviertan, cosa que se ha reportado como vital para que las células se diferencien en la línea deseada (Zuk et al., 2001; Smith et al., 2003).

Por ende es muy importante que las células sean reimplantadas en una etapa subaguda de la lesión, ya que si se implantan en una etapa crónica con una cicatriz consolidada, las células no van a poder diferenciarse. En el caso de tendones y ligamentos se ha determinado que la etapa ideal para implantar las ADSC es después de 30 días de que se produjo la lesión, pero la ventana de oportunidad se abre hasta los 90 días con resultados positivos. En el caso que la lesión sea crónica las ADSC se recomiendan cuando la lesión presente focos activos, ya que estas secciones puede regenerar la estructura y hacerla un poco más funcional (Smith, 2004).

Además se ha recomendado por compañías como Vetstem Inc., que han tratado cientos de casos de lesiones de tendón y ligamento en equinos con esta línea de terapia, que las ADSC a implantar sean de origen autólogo para evitar algún tipo de reacción adversa para el paciente (Smith, 2004).

Si se quieren tener más ADSC disponibles en el caso eventual de que el animal se vuelva a lesionar y no se quiera volver a operar al animal para obtener una muestra de grasa, las ADSC se ha reportado que son resistentes a la congelación y descongelación con el fin de

almacenarlas en un banco de células autólogas (Devireddy et al., 2005).

Aun así Mc Intosh et al. han determinado por medio de la Reacción Linfocítica Mixta (MLRs) que las SVF y los ADSC de los primeros pasajes pueden producir cierto tipo de reacción en el paciente, pero que después de varios pasajes las células no estimulan la respuesta de los Linfocitos T. Esto soporta la posibilidad en un futuro de realizar bancos de células madre heterólogas con fines terapéuticos, pero es importante acotar que se deben realizar estudios en modelos animales para determinar el comportamiento de las ADSC heterólogas *in vivo* (Mc Intosh et al., 2006).

En este sentido se tuvo una buena experiencia en el transplante de células madre heterólogas cuando se implantaron las células aisladas en este estudio con 4 pasajes, en un equino con lesión en un tendón sin que hubiera ningún tipo de reacción y con una buena respuesta clínica (Datos no publicados). Se debe recalcar en este punto, que es muy importante que una vez que se implantan las células en el paciente se debe seguir un estricto protocolo de rehabilitación basado en aumentos de cargas de trabajo paulatinos y mucha paciencia; ya que a pesar de todo, esto sigue siendo la piedra angular de cualquier terapia en estas estructuras. Esto es soportado por Abousleiman et al. donde reportaron un aumento significativo en resistencia a la tensión mecánica, mayor celularidad y mejor alineamiento de fibras de colágeno en los modelos tendinosos tratados con MSC y cargas cíclicas tensiles comparados con los tratados con MSC pero estáticos (Abousleiman et al., 2006).

Junto a esto los chequeos periódicos ultrasonográficos son vitales para determinar el avance de la regeneración de la estructura, y determinar si el animal puede volver a competencia (Dalhgren, 2005; Anónimo, 2004; Dabareiner et al., 2000; Reef, 1998). Además otros aspectos como plan de entrenamiento, herraje, montura, limado de muelas, nutrición y

medicina preventiva, no se pueden dejar de lado (Anónimo, 2004).

Muchas de las líneas de terapia en investigación comparten mecanismos de acción complementarios, que al final podrían ser utilizados efectivamente para alcanzar la regeneración de las estructuras tendinosas y ligamentosas. Por supuesto que el mayor fin de esto es que en medicina veterinaria y humana se pueda retornar al individuo a la función atlética con una menor probabilidad de que haya una recaída (Dalhgren, 2005).

Es de vital importancia mencionar que ninguna de las terapias que existen en el presente, ni ninguna con las que se están experimentando para un futuro cercano, tiene la capacidad de aumentar la velocidad del proceso de reparación y regeneración de la estructura tratada. La mayoría de los tejidos blandos continúan necesitando de 6 a 12 meses de reposo o rehabilitación antes de retornar a competición, todo esto dependiendo de la severidad de la lesión original y de la velocidad con la que el individuo repara o regenera el daño (Dalhgren, 2005).

En lo que respecta a los costos de esta línea de terapia, compañías como Vetstem Inc. en USA reportan que los costos de este tipo de tratamiento con ADSC con sus chequeos veterinarios respectivos va de 2000 a 3000 dólares (Smith, 2004). Por los aislamientos que se han realizado y los costos de la medicina veterinaria en nuestro país, realizando un cálculo aproximado se podría dar este servicio en menos de la mitad de lo que se cobra en USA. Además de regeneración en tendones y ligamentos las ADSC han probado tener un gran potencial clínico para la regeneración de cartílago, hueso dañado, meniscos y problemas isquémicos. Otros estudios han determinado su potencial de diferenciación en cardiomiocitos, músculo esquelético, tejido adiposo, células endoteliales y precursores nerviosos (Boquest et al., 2006, Shahdadfar et al., 2005; Strem et al., 2005; Rubio et al., 2005; Ji Gang et al., 2004;

Smith et al., 2003; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001).

Esto hace que esta línea de terapia tenga una gran cantidad de aplicaciones clínicas en el tratamiento de muchas patologías comunes en la práctica médica cotidiana. Esto sería válido no solo para los equinos, sino a muchas otras especies animales, incluyendo al ser humano. Por tanto es el deseo del autor que los conocimientos adquiridos con este trabajo sean la base para que se realicen posteriores investigaciones en esta área enriqueciendo de esta manera la profesión, y dándole al profesional médico costarricense la opción de poder implementar esta línea de terapia de manera que pueda solucionar problemas clínicos de una forma más eficiente.

4.1 Conclusiones

1. Las características de las células aisladas por el protocolo planteado en esta investigación y la mejoría clínica de los animales tratados hacen que sea indicativo que estas sean ADSC.
2. Se debe continuar con la investigación de este tipo de línea de terapia para de esta manera determinar la metodología más adecuada que permita obtener los resultados óptimos con respecto a cuestiones como mejoramiento de los tiempos de cultivo, reimplantación celular y diferenciación celular adecuada *in vivo*.
3. La obtención de las ADSC se podría realizar en nuestro país a un costo mucho menor del que se reporta a nivel mundial, esto en pro de la industria ecuestre costarricense y los equinos afectados.
4. El hecho de que las ADSC soporten la congelación y descongelación abre la posibilidad de tener en un futuro próximo bancos de células autólogas o heterólogas con fines terapéuticos en el país.
5. Este estudio puede ser tomado de base para iniciar a utilizar esta línea de terapia en otros tejidos, y en otras especies, incluyendo al ser humano.

4.2 Recomendaciones

1. Continuar con la investigación en lo que respecta al mejoramiento de tiempos de cultivo y diferenciación de las células *in vivo* para maximizar el potencial de esta terapia en los pacientes.
2. Es de vital importancia realizar estudios en equinos para determinar los efectos a largo plazo de las células madre en los tejidos en los que se implantan.

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

- Abousleiman, R; Mc Fetridge, P; & Vassilios, S. 2006. Mechanically stimulated mesenchymal stem cells from tendon-like tissue. [en línea]. *In* Biomaterials for Tissue Engineering II, AICHE Annual Meeting, San Francisco, CA, USA. <http://aiche.confex.com/aiche/2006/techprogram/P74623.HTM> (Consulta: 17 octubre, 2006).
- Adams, O.R. 1974. Lameness in Horses. 3rd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- Anónimo. 2004. Stem Cells therapy rehabilitation recommendations for SDF tendon - race horses. [en línea]. Vetstem, California, USA. <http://www.vetstem.com/Enhanced/VetStemTendonRehab.pdf> (Consulta: 3 abril, 2006).
- Banks, W. 1986. Histología Veterinaria Aplicada. Editorial El Manual Moderno, D.F., México.
- Becker, CK; HH, Savelberg; HH, Buchner & A, Barneveld .1998. Long-term consequences of experimental desmotomy of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon in adult horses. [en línea]. Am. J. Vet. Res. 59:347-51. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=9522957&query_hl=9&itool=pubmed_docsum (Consulta: 3 abril, 2006).
- Boquest, A; Shahdadfar, A; Brinchmann, J; Collas; P. 2006. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods in Molecular Biology*. 325: 35-46.
- Crowe, OM; SJ, Dyson; IM, Wright; MC, Schramme & RK, Smith. 2004. Treatment of chronic or recurrent proximal suspensory desmitis using radial pressure wave therapy in the horse. *Equine Vet. J.* 36:313-6.

- Dabareiner, R; K, Carter & K, Chaffin. 2000. How to perform an ultrasound guided tendon splitting and intralesional tendon injection in a standing horse. [en línea]. *In* 47th Annual Convention American Association Equine Practitioners. San Antonio, Texas, USA. <http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2000/176.pdf> (Consulta: 3 abril, 2006).
- Dahlgren, L.A. 2005. Review of treatment options for equine tendon and ligament injuries: what's new and how do they work?. [en línea]. *In* 51st Annual Convention American Association Equine Practitioners. Dic 3-7. Seattle, Washington, USA. <http://www.ivis.org/proceedings/aaep/2005/dahlgren/chapter.asp?LA=1> (Consulta: 3 abril, 2006).
- Devireddy, RV; Thirumala, S; Gimble, JM. 2005. Cellular response of derived passage-4 adult stem cells to freezing stress. [en línea]. *J. Biomech. Eng.* 127: 1081-6. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16502650&query_hl=4&itool=pubmed (Consulta: 3 abril, 2006).
- Dyson, SJ. 2004. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.* 36:415-9.
- Dyson, S. 1991a. Proximal suspensory desmitis: clinical, ultrasonographic and radiographic features. *Equine Vet. J.* 23:25-31.
- Dyson, SJ. 1991b. Desmitis of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon: 27 cases (1986-1990). [en línea]. *Equine Vet. J.* 23:438-44. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1778161&query_hl=6&itool=pubmed (Consulta: 3 abril, 2006).
- Estrada, JM & Montero, J. 2006. Entrevista con el señor Juan Manuel Estrada. Jefe de la Cátedra de Especies Mayores, y el señor Javier Montero. Profesor de Medicina Interna.

Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Heredia, C.R. 3 de abril.

Gaughan, EM; AJ ,Nixon; LP, Krook; AE ,Yeager; KA ,Mann; H, Mohammed & DL, Bartel .1991.Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses. [en línea]. Am J Vet Res. 52:764-73.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1854104&query_hl=12&itool=pubmed_docsum (Consulta: 3 abril, 2006).

Gibson, KT; HM, Burbidge & DU, Pfeiffer. 1997. Superficial digital flexor tendonitis in thoroughbred race horses: outcome following non-surgical treatment and superior check desmotomy. [en línea]. Aust Vet J. 75:631-5 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=9325536&query_hl=2&itool=pubmed_docsum (Consulta: 3 abril, 2006).

Gimble, JM & F, Guilak. 2003. Adipose derived stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. Cytotherapy. 5: 362- 369.

Guilak, F; Lott, KE; Awad, HA; Cao, Q; Hicok; Fervor, B; Gimble, JM. 2006. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose adult stem cells. [en línea]. J Cell Physiol. 206: 229-37. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16021633&query_hl=4&itool=pubmed_DocSum(Consulta: 3 abril, 2006).

Guilak, F; Lott, KE; Awad, HA; Cao, Q; Hicok; Fervor, B; Gimble, JM. 2006. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose adult stem cells. [en línea]. J Cell Physiol. 206: 229-37. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16021633&query_hl=4&itool=pubmed_DocSum(Consulta: 3 abril, 2006).

Herrero, L. & L, Hun. 2002. Procedimientos en virología médica. 2nd ed. Publicaciones Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

Hinchcliff, K.W. A.J., Kaneps & J.G., Raymond. 2004. Equine sports medicine and surgery. 1st. ed. WB Saunders, Londres.

- Hicok, KC; Y, Zhou & Y, Pucilowski. ca.1999. Adipose derived adult stem (ADAS) cells differentiate into bone synthesizing osteoblasts in vivo. [en línea]. Presentation #M233 <http://www.vet-stem.com/Enhanced/adipose.htm> (Consulta: 3 abril, 2006).
- Huang, JI; SR, Beanes; M, Zhu; HP, Lorenz; MH, Hedrick & P, Benhaim. 2002. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. [en línea]. *Plast.Reconstr.Surg.*;109:1033.<http://www.vet-stem.com/Enhanced/adipose.htm> (Consulta: 3 abril, 2006).
- Ji Gang, E; Jeong, JA; Hong, SH; Hwang, SH; Kim, SW; Yang, IH; Ahn, C; Han, H; Kim , H. 2004. Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood. [en línea]. *Stem Cells*. 22: 617-624. [http:// www. Stem Cells. com/ cgi/content/full/22/617](http://www.StemCells.com/cgi/content/full/22/617) (Consulta: 3 abril, 2006).
- Kasashima ,Y; T ,Takahashi; RK ,Smith; AE ,Goodship; A ,Kuвано & T, Ueno . 2004. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet. J.* 36:346-50.
- Kern, S; Eichler, H; Stoeve , J; Klüter , H; Bieback, K. 2005. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue.[en linea]. *Stem Cells*. 24: 1294-1301. stemcells.alphamedpress.org/cgi/content/abstract/24/5/1294 (Consulta: 17 octubre, 2006)
- Mc Intosh, K; Zyonic, S; Garret; Mitchell, JB; Floyd, ZE; Hammil, L; Kloster, A; Halyorsen, YD; Ting, JP; Stroms, RW; Goh, B; Kilroy, G; Wu, X; Gimble; JM. 2006. The immunogenicity of human adipose derived cells: Temporal changes in vitro. [en línea]. *StemCells*24:1246-1253. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retri>

[eve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=16410391&query hl=4&itool=pubmed](#)

[DocSu](#)(Consulta: 3 abril, 2006)

- Nixon, A & L, Dahlgren . 2004. Adipose derived pluripotent stem cells for tendon repair. [en línea]. Comparative Orthopedic Laboratory, School of Veterinary Medicine, Cornell University.http://www.vet-stem.com/Enhanced/Cornell_Tendon_Study.pdf(Consulta: 3 abril, 2006).
- Porras, Ana. 2006. Identificación y evaluación de células madre de sangre de cordón, utilizando citometría de flujo. pp. 63-69. *In* Morales, O. (ed.). Fisiología de las células madre. Edit. UCIMED, San José, Costa Rica.
- Przybroski, S. 2005. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells After Transplantation in Immune-Deficient Mice. [en línea]. Stem Cells. 23: 1242-1250. [http:// www. Stem Cells. com/ cgi/content/full/23/9/1242](http://www.StemCells.com/cgi/content/full/23/9/1242) (Consulta: 3 abril, 2006).
- Reef, V. 1998. Equine diagnostic ultrasound. WB Saunders, Philadelphia,USA.
- Ross, M. & S., Dyson. 2003. Diagnosis and management of lameness in the horse.1st ed. WB Saunders, Philadelphia,USA.
- Rubio, D; Garcia, J; Martin, M; de la Fuente, R; Cigudosa, J; Lloyd, Alison; Bernad, A. 2005. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation. [en línea]. Cancer Res. 65: 8. [http:// can res. aacrjournals. org /content/ full/ 65/8](http://can.res.aacrjournals.org/content/full/65/8) (Consulta: 3 abril, 2006).
- Shahdadfar, A; Fronsdal, K; Haug, T; Reinholt; Jan, E. 2005. In Vitro Expansion of Mesenchymal Stem Cells: Choice of Serum Is a Determinant of Cell Proliferation, Differentiation, Gene Expression, and Transcriptome Stability. [en línea]. Stem Cells. 23: 1357-1366. [http:// www. Stem Cells. com/ cgi/content/full](http://www.StemCells.com/cgi/content/full) (Consulta: 3 abril, 2006).

- Smith, Heather. 2004. Stem Cell Therapy for Repairing Tendons and Ligaments. [en línea]. California Thoroughbred. <http://www.ctba.com/04magazine/jun/HORS-ECARE.pdf> (Consulta: 3 abril, 2006).
- Smith, R.K.; M, Korda; G, Blunn & A, Goodship. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Vet. J.* 35: 99 -102.
- Stashak, T. 2002. Adams lameness in horses. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Stashower, M; K, Smith; J, Williams & H, Skelton. 1999. Stromal progenitor cells present within liposuction and reduction abdominoplasty fat for autologous transfer to aged skin. [en línea]. *Dermatol Surg*; 25:945. <http://www.vet-stem.com/Enhanced/adipose.htm> (Consulta: 3 abril, 2006).
- Strem, B; Hicok, K; Zhu, M; Wulur, I; Alfonso, Z; Schreiber, R; Fraser, J; Hedrick, M. 2005. Multipotential Differentiation of Adipose Tissue - Derived Stem [en línea]. *Keio J Med.* 54(3):132-141. <http://www.kjm.keio.ac.jp/past/54/3/132.pdf#search=%22Strem%20B%2F%20Multipotential%20Differentiation%20of%20Adipose%20Tissue%20-%20Derived%20Stem%20%22Cells>.
- Turner, A.S. & C.W., McIlwraith. 1989. Techniques in large animal surgery. 2nd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
- Venegas, P. 2006. Entrevista con la Dra. Patricia Venegas, Microbióloga. Laboratorio de Citogenética del Hospital de Niños, San Jose, C.R. 19 de setiembre.
- Young, R; Butler, DL; Weber, W; Caplan, AI; Gordon, SL; Fink, DJ. 1998. Use of Mesenchymal Stem Cells in a Collagen Matrix for Achilles Tendon. [en línea] Repair.

- J. Ortho. Res. (16): 406. <http://www.vet-stem.com/Enhanced/tendon.htm> (Consulta: 3 abril, 2006).
- Zuk, P; M, Zhu; H, Mizuno; J, Huang; W, Futrell; A, Katz; P, Benhaim; P, Lorenz & M, Hedrick .2001. Multilineage cell from human adipose tissue implications for cell - based therapies. [en línea]. Tissue Engineering . 7: 211-227. http://www.Macropore.com/pdf/Tissue_Engineering_Article.pdf. (Consulta: 3 abril, 2006).
- Zuk PA, M, Zhu & P, Ashjian. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. [en línea]. Molecular Biology of the Cell; 13: 4279. <http://www.vet-stem.com/Enhanced/adipose.htm> (Consulta: 3 abril, 2006).