

Utilización de las células madre mesenquimales de origen adiposo en el tratamiento de la tendinitis y desmitis en equinos: Resultados de la aplicación de un protocolo de extracción, cultivo y reimplantación

Roberto Estrada McDermott^{1*}, Juan Manuel Estrada², Pilar Salas³, Francisco Vega⁴ y Patricia Venegas⁵

- 1 Unidad de Terapia Celular, Cátedra de Cirugía de Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.
- 2 Coordinador de la Unidad de Terapia Celular y Cátedra de Cirugía de Especies Mayores, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.
- 3 Laboratorio de Virología Médica, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- 4 Departamento de Microbiología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.
- 5 Departamento de Citogenética, Hospital Nacional de Niños, Costa Rica.

ABSTRACT

The principal objective of this investigation was to establish a protocol that gave us access to equine adipose derived stem cells in Costa Rica. To achieve this goal, the adipose tissue was extracted from the proximal abaxial zone in the base of the tail. Once in the laboratory the fat was processed enzymatically and mechanically to obtain the cellular pellet. This pellet was cultured in the bottle with a supplemented culture media. The cells isolated from this culture had several particular characteristics in culture: they adhere to the plastic, they had an elongated morphology (fibroblast-like), the cell population was homogeneous during the culture process and passages. The cytological studies determined that the cells were granular, large size, with prominent nucleus and nucleolus when stained with H/E and Giemsa. Also, they were positive to histochemical stains like PAS, Alcian Blue and Toluidine Blue, suggesting their mesenchymal origin due to the high mucopolysaccharid content. Immunophenotypically, the cells were autofluorescent because the human monoclonal antibodies (CD34, CD13, CD44 y CD45) did not react against the equine cells; although, it was demonstrated that the cells were alive after the recuperation protocol and that they had the same morphological characteristics described in the cytologies. To determine if there is a tumoral or inflammatory reaction 250000 cells were implanted *in vivo* in 5 immunosuppressed mice and after a 22 day period there was no reaction to the implantation. Finally, three equine clinical cases with tendinous and ligamentous lesions were treated to put in practice the reimplantation protocol and to determine if there was any reaction. After a 5 day clinical follow up, none of the cases reacted negatively to the cells. When the ultrasonographic follow up was made 2 months later we observed an antiinflammatory effect, a diminution in the tenosynovial sheath distention, a improvement of the fiber alignment and the ecoscore, and a improvement of the lameness score in all the clinical cases. These results indicate that cells isolated in our study share characteristics with the adipose derived stem cells described in the literature, being this highly suggestive that with this protocol is effective. With these results obtained we could determine that the adipose derived stem cells described in the literature share many characteristics with the cells isolated in this study. The aforementioned findings are highly indicative that the protocol proposed in this project can isolate and culture stem cells effectively.

Keywords: *mesenchymal stem cells, adipose tissue, isolation, culture, tendinitis, desmitis, equine.*

Recibido: 4 de abril del 2008

Aceptado: 26 de marzo del 2009

* Autor para correspondencia: teléfono: (506) 2562-4531, correo electrónico: remvet69@hotmail.com, apartado postal: 379-2150, San José, Costa Rica.

RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue establecer un protocolo que permitiera tener acceso a las células madre de origen adiposo equinas en Costa Rica. Para alcanzar este objetivo, se extrajo el tejido adiposo quirúrgicamente de la zona abaxial proximal de la cola. Una vez en el laboratorio se sometió el tejido adiposo equino a un riguroso procesamiento químico y mecánico. Cuando se obtuvo el botón celular se sembró en una botella de cultivo. Las células aisladas presentaron las siguientes características durante el cultivo: adherencia al plástico, morfología elongada con digitaciones (tipo fibroblasto), poblaciones celulares homogéneas a lo largo del cultivo y los pasajes. Al realizar estudios citológicos se pudo determinar que estas eran altamente granulares, presentaban un gran tamaño, núcleos grandes y nucleolos prominentes al tñirlas con H/E y Giemsa. Además fueron positivas a tinciones histoquímicas como PAS, Azul de Toluidina y Azul Alsaciano, sugiriendo su origen mesenquimal por su alto contenido de mucopolisacáridos. Inmunofenotípicamente las células fueron autofluorescentes, debido a que anticuerpos monoclonales humanos (CD34, CD13, CD44 y CD45) no montaron una reacción contra las células equinas; aún así se logró demostrar que estas estaban vivas posterior al protocolo de aislamiento y que cumplían con las características morfológicas determinadas con la citología. Para determinar si existía algún tipo de reacción tumoral o reacción *in vivo*, se procedió a implantar 250,000 células con cuatro pasajes en ratones inmunosupresos; después de un período de 22 días no se presentó ningún tipo de reacción posterior a la implantación. Por último, se trataron tres pacientes equinos con lesiones en estructuras tendinosas y ligamentosas, con el fin de poner en práctica el protocolo de implantación y determinar si se daba alguna reacción. Después de un monitoreo clínico de 5 días, ninguno de los casos tratados reaccionó negativamente a las células inyectadas. Más bien, al realizar un seguimiento de los pacientes a los dos meses, se observó un efecto antiinflamatorio, disminución de la distensión de la vaina sinovial, mejoramiento de alineamiento de fibras y el puntaje ecográfico de la lesión, y mejoramiento del grado de claudicación en todos los casos clínicos. Estos resultados en conjunto nos permiten determinar que las células madre de origen adiposo descritas en la literatura comparten muchas características con las células aisladas en nuestro estudio, siendo altamente indicativo que el protocolo que se ha planteado en este proyecto es efectivo.

Palabras claves: células madre mesenquimales, tejido adiposo, aislamiento, cultivo, tendinitis, desmitis, equino.

Abreviaturas

MSC: Células madre mesenquimales.

ADSC: Células madre derivadas de tejido adiposo.

PLA: Lipoaspirado procesado.

SVF: Fracción estromal vascularizada.

PAS: Periodic Acid Schiff.

AcMo: Anticuerpos monoclonales.

CD: Cluster designation.

PerCP: Activated Peridinin-chlorophyll-protein Complex.

APC: Allophycocyanin.

MHZ: Megahertz.

ES: Alteraciones en la ecogenicidad.

FAS: Puntaje al alineamiento de fibras.

INTRODUCCIÓN

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 prevalencia 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 alcanzado porcentajes de recurrencia que pueden variar de un 43% a un 93% (Gaughan *et al.*, 1991; Dyson, 1991a, b; Gibson *et al.*, 1997; Becker *et al.*, 1998; Stashak, 2002; *et al.*, 2003; Crowe *et al.*, 2004; Dyson, 2004; Smith; Kasashima *et al.*, 2004; Ross & Dyson, 2003; Dahlgren, 2005).

Esta situación es causada por varios factores predisponentes característicos de este tipo de tejido: primero, la estructura tendinosa posee una capacidad regenerativa muy pobre, debido a su alto contenido de colágeno y a su bajo número de células. Los tenocitos son los responsables de mantener la integridad de la matriz que los rodea. Cuando el balance entre degradación y producción de nuevas moléculas es alterado se acumula el daño, ya que estas células no dan abasto. Esto eventualmente conlleva a la falla de la estructura ligamentosa o tendinosa (Dahlgren, 2005).

Por otro lado, las lesiones de tendón sanan formando un tejido cicatrizal

desordenado, 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 (Dahlgren, 2005).

El uso de células madre para la regeneración de lesiones de tendón ha sido reportado como exitoso en animales de laboratorio y en modelos de ingeniería tisular. En estos experimentos se pudo determinar que al tratar las estructuras afectadas con células madre mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés) se daba un aumento significativo en la celularidad, la capacidad de soportar estrés mecánico y el alineamiento de las fibras colágenas (Young *et al.*, 1998; Abousleiman *et al.*, 2006).

Estudios realizados en equinos han logrado determinar que al utilizar células madre de diferentes orígenes va a producirse una mejoría estructural del tendón y ligamento (Nixon & Dahlgren, 2004; Dahlgren, 2005; Fortier & Smith, 2007). Además de esto se va a promover la síntesis de proteínas relacionadas con la fibrillogénesis del colágeno y su organización (Nixon & Dahlgren, 2004; Dahlgren, 2005). Por otro lado, se ha demostrado que al utilizar esta línea de terapia se disminuye significativamente la recurrencia de las lesiones, si se compara con los animales tratados con terapias tradicionales o no tratados (13% versus 56%) (Fortier & Smith, 2007).

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 separadas 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) comparte muchas características con las MSC de otros tejidos, incluyendo su potencial proliferativo y su habilidad de diferenciación multilinear (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002; Strem *et al.*, 2005).

El objetivo principal del estudio fue determinar si en Costa Rica era tecnológicamente posible aislar y cultivar células madre de origen adiposo. Paralelo a esto se procedió a implantar las células madre en tres pacientes equinos con lesiones tendinosas y ligamentosas, con el fin de determinar si se daba algún tipo de reacción posimplante y, además, para monitorear el progreso de la lesión en el tiempo. Es de vital importancia comentar que en ningún momento nuestra investigación pretendió determinar la efectividad de esta terapia, ya que esta ha sido comprobada por estudios científicos internacionales (Young *et al.*, 1998; Nixon & Dahlgren, 2004; Dahlgren, 2005; Abousleiman *et al.*, 2006). Aunque los resultados obtenidos en los casos clínicos no tienen un valor estadístico, el

progreso clínico observado es un aliciente para continuar investigando en esta línea de terapia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción de casos y clasificación de las lesiones

Los casos clínicos se seleccionaron de las lesiones de tendón referidas al Hospital de Especies Mayores de la Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica, además de otros casos de servicios ambulatorios privados.

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 era necesario (Adams, 1974; Stashak, 2002; Ross & Dyson, 2003; Hinchcliff *et al.*, 2004).

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 la literatura (Stashak, 2002; Ross & Dyson, 2003).

La caracterización de las lesiones se realizó utilizando los siguientes parámetros: localización de la lesión, alteraciones en la ecogenicidad (ES de 0 a 4) y su patrón, el puntaje al alineamiento de fibras (FAS de 0 a 3), y

los cambios en las características de la lesión conforme pasa el tiempo (Reef, 1998; Stashak, 2002; Ross & Dyson, 2003; Hinchcliff *et al.*, 2004).

Las células madre fueron implantadas en tres equinos con lesiones en diferentes estructuras tendinosas y ligamentosas. El primer animal tratado fue una yegua costarricense de paso de 8 años, con una ruptura parcial (traumática) en el tendón flexor digital profundo, en la región 3B, del miembro posterior izquierdo, ES=4, FAS=3, y adherencias. El segundo caso tratado fue un animal castrado de raza inglesa, de salto, de 10 años, el cual presentaba una lesión en el borde lateral de la rama medial del ligamento suspensorio del miembro posterior izquierdo, en la sección distal, ES=2, FAS=2, y distensión marcada de la vaina tenosinovial. Por último se procedió a realizar un implante celular en un animal castrado de raza árabe-criollo de rally, con una lesión en el tendón flexor digital superficial, en la región 3A, del miembro posterior izquierdo, ES=3 y FAS=3. Esta última implantación fue heteróloga, mientras las dos primeras fueron autólogas.

Extracción del tejido adiposo

Se depila la zona abaxial proximal de la cola, y realizando una desinfección preliminar se procede a bloquear la región. Luego se prepara quirúrgicamente el área con alcohol-yodo. La incisión se realiza en la piel y al llegar al tejido subcutáneo, se efectúa disección roma

para extraer de esta manera de 20 a 30 gramos de tejido adiposo (Dahlgren, 2005). El tejido es extraído asépticamente y se coloca en una solución isotónica, además, el paquete se debe mantener en refrigeración hasta que se lleve al laboratorio a procesar (Herrero & Hun, 2002).

Aislamiento, cultivo y recuperación de las células

La muestra de tejido adiposo con el medio de transporte se manipula dentro de un ambiente controlado en una cámara de flujo laminar. Ahí se extrae la muestra del medio de transporte y se procede a picarla en pequeños trozos y se lavan extensivamente con soluciones isotónicas.

Luego de este proceso, el tejido adiposo es sometido a enzimas disgregantes (colagenasa) para de esta manera separar las células deseadas, esto se conoce en la literatura como lipoaspirado procesado (PLA) (Zuk *et al.*, 2001; Strem *et al.*, 2005). El PLA es filtrado por medio de una gasa microporo. Luego de la filtración este se centrifuga descartando posteriormente el sobrenadante para obtener así el botón celular conocido como fracción estromal vascularizada (SVF) (Zuk *et al.*, 2001; Strem *et al.*, 2005; Gimble & Guilak, 2006).

La SVF se resuspenderá en 5 ml de Ham's F12 suplementado y se colocará en una botella de 25 cm², incubándose

en una cámara de CO₂. Las células se mantienen en este medio hasta alcanzar niveles subconfluentes de estas y luego se procede a recolectarlas (Strem *et al.*, 2005; Gimble & Guilak, 2006).

Al alcanzar la concentración deseada se procede a separarlas de la botella de cultivo por medio de tripsina (Herreiro & Hun, 2002; Strem *et al.*, 2005). Las células aisladas se colocan en 1 ml o 1,5 ml de solución isotónica en una jeringa y se mantienen en refrigeración hasta que se implanten en el tendón o ligamento afectado (Dahlgren, 2005).

Identificación de las células aisladas

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 25 cm² y después de los pasajes. Para observar su morfología y comportamiento se utilizaron un microscopio de luz invertido y un microscopio de contraste de fase.

Tinciones citológicas

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).

Citometría de flujo

La caracterización inmunofenotípica de las células se realiza mediante la 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, C.A.), mediante los programas CELLquest y PAINT-A-GATE (Becton Dickinson, San José, C.A.), explorándose al menos 10,000 células por antígeno. El panel de AcMo incluye los siguientes anticuerpos monoclonales al diagnóstico: CD34, CD13, CD44 y CD45.

Implantación en ratones

En este experimento se inyectaron subcutáneamente 250,000 ADSC, con cuatro pasajes, en un grupo de cinco ratones inmunosupresos con corticosteroides. Después se esperaron 22 días para determinar si se formaba algún tipo de masa o reacción para luego estudiarla histológicamente.

Reimplantación de las células aisladas en los casos clínicos

En el paciente equino, el sitio de la lesión debe ser depilado y preparado quirúrgicamente para realizar la inyección asépticamente. El transductor de 7,5 MHz

se introduce en un guante estéril con gel por la parte interna y se anuda a la cabeza del transductor, luego se procede a utilizar gel de ultrasonido estéril o alcohol externamente 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 introduce una aguja calibre 20 de 1,5 pulgadas de largo hacia la lesión guiándola por medio del ultrasonido. Normalmente se recomienda dejar 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 dejará que drene fluido o suero acumulado, después las células se reimplantarán en el tendón (Dabareiner *et al.*, 2000).

Una vez realizada la implantación se procederá a monitorear clínicamente

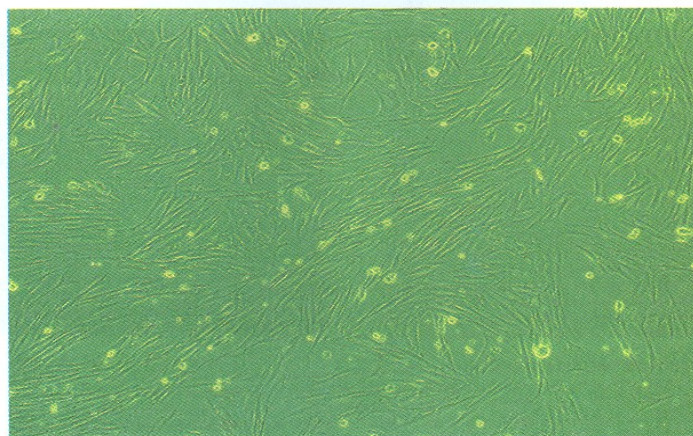
si se da algún tipo de reacción en el sitio de la implantación. Se chequearán la temperatura local, la inflamación de la estructura, el grado de claudicación y la temperatura central de los animales.

RESULTADOS

Aislamiento, cultivo y recuperación de las células

Después de aplicar el protocolo de aislamiento a las muestras de grasa, las células presentaron una morfología redondeada. Una vez en cultivo, después de aproximadamente 5 días, las células aisladas se elongaron, presentando morfología tipo fibroblasto (Figura 1). Aproximadamente 13 días después las células alcanzaron confluencia en la botella de 25 cm². Al realizar los conteos con la Cámara de Neubauer, se obtuvo una concentración de 3 a 6 millones de células por botella de cultivo.

Figura 1. Células tipo fibroblasto en cultivo



Identificación de las células aisladas

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 períodos de cultivo relativamente prolongados (1 mes).

Tinciones citológicas

Al realizar las tinciones de H/E y Giemsa se pudo determinar que se trataba de células de gran tamaño, granulares, núcleos grandes y nucleolos prominentes (Figura 2). Al realizar histoquímica con las tinciones de PAS, Azul Alsaciano y Azul de Toluidina, las células fueron teñidas positivamente (Figura 3).

Figura 2. Citología de las células aisladas por medio de la tinción de Giemsa

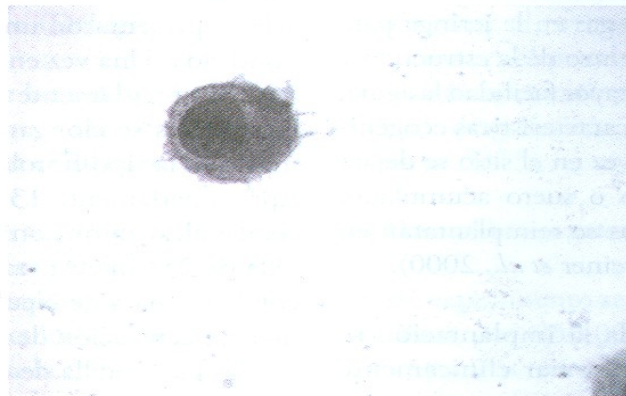
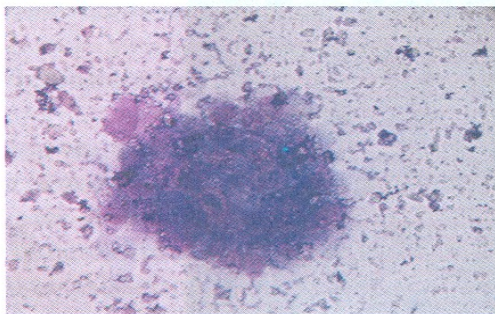
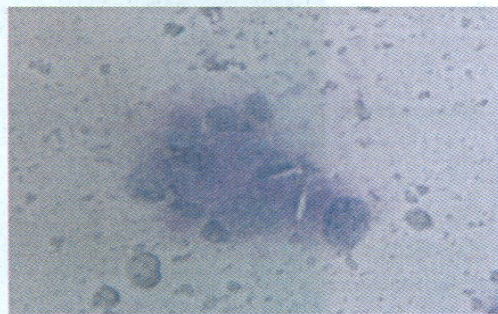


Figura 3. Histoquímica realizada a las células aisladas



Tinción metacromática



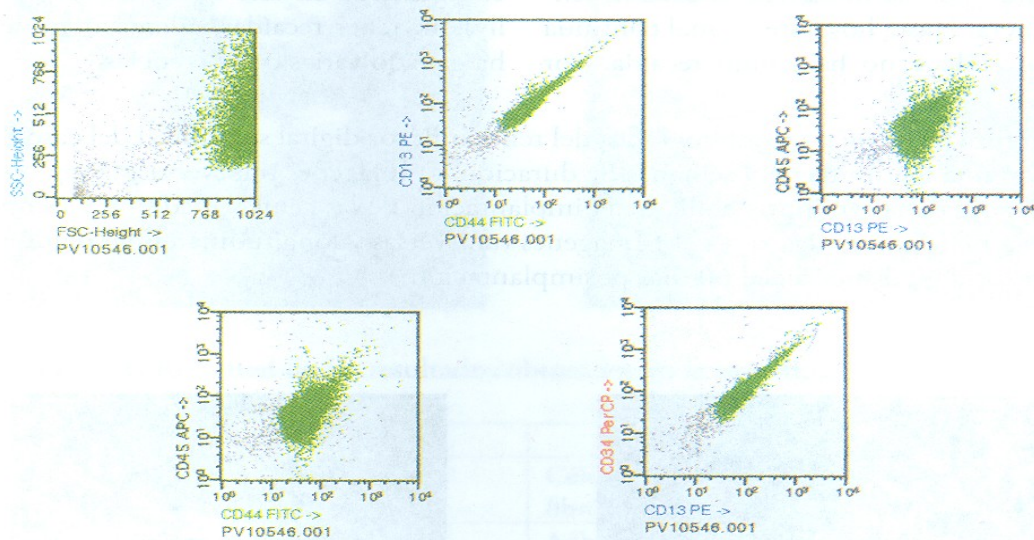
Tinción con Azul Alsaciano

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 (Figura 4).

Figura 4. Citometría de flujo de las células aisladas



Implantación en ratones

Al implantar subcutáneamente las células en los ratones inmunosupresos no se presentó formación de ningún tipo de masa tumoral o reacción alguna, por lo que no se envió ninguna muestra a histología.

Reimplantación de las células aisladas en los casos clínicos

Luego de realizar la implantación intralesional de las células aisladas, se dio

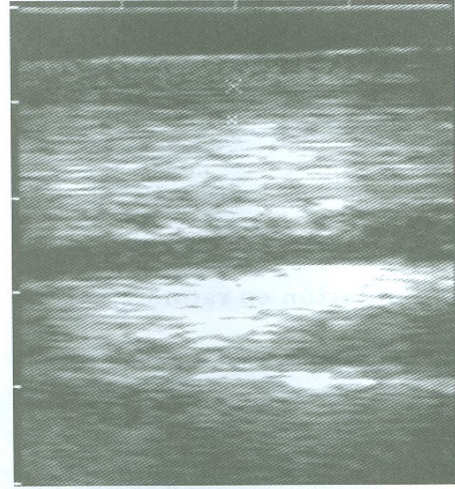
un seguimiento clínico monitoreando calor, dolor y el grado de claudicación de los pacientes por un período de 5 días. Durante este tiempo no se observó que se produjera ningún tipo de reacción inflamatoria congruente con un rechazo. Dos meses después se procedió a realizar un seguimiento ultrasonográfico y clínico. En el caso 1, el ES pasó de 4 a 2, el FAS de 3 a 2, hubo una marcada disminución de la efusión de la vaina tenosinovial. En este caso en particular hubo una mejoría en el soporte que la estructura le daba al

animal. Aún así, por la gravedad y el tipo de lesión, a los dos meses, el animal claudicó, éste no fue el caso cuatro meses después. En el caso 2, tanto el ES como el FAS se presentaron completamente normales, además ya no había efusión en la vaina tenosinovial ni renquera. Hasta hoy, este animal continúa saltando y no ha tenido recaída. Por

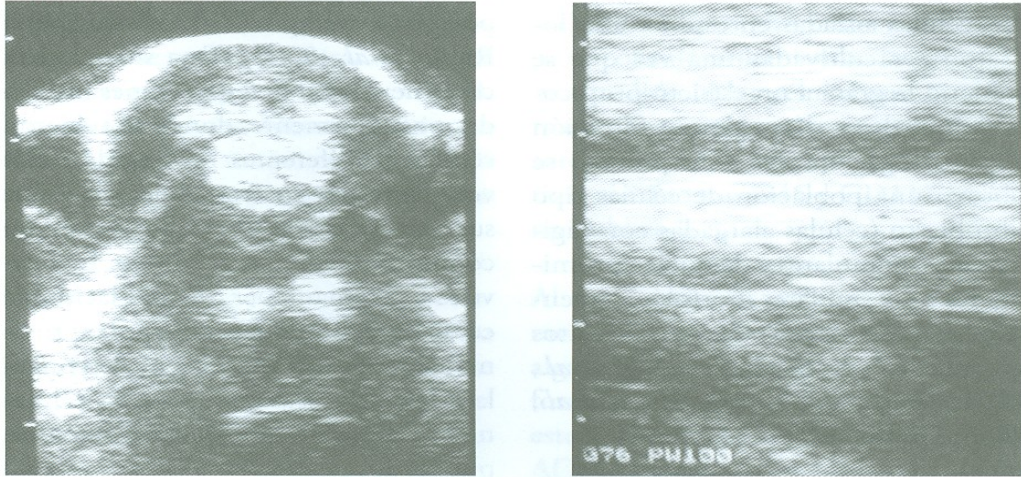
último, en el caso 3 el ES pasó de 3 a 2, el FAS pasó de 3, a 2 (Figura 5). Aunque el tendón no estaba completamente sano, ya el animal no presentaba claudicación en el momento del chequeo. Este animal ha continuado compitiendo en alto rendimiento (rally) sin tener recaídas, además de que ha ganado varias competencias.

Figura 5. Imagen ultrasonográfica del tendón flexor digital superficial del caso 3 con una tendinitis de 9 semanas de duración. a) Imágenes transversas y longitudinales de la tendinitis el día de la implantación de las células madre. La lesión está marcada por las x, y + .b) Imágenes transversas y longitudinales del tendón flexor digital superficial 60 días posimplantación.

a)



b)



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

| RESULTADOS | |
|-------------------------------------|---|
| Características morfológicas | Células elongadas con digitaciones (tipo fibroblasto). |
| Características de cultivo | Adherencia al plástico y cultivos con poblaciones celulares homogéneas. Mantienen morfología estable por períodos prolongados de cultivo, en diferentes medios de cultivo y poscongelación. |
| Tinciones histopatológicas | <i>H/E y Giemsa:</i> células de gran tamaño, granulares, núcleos grandes y nucleolos prominentes. <i>PAS, Azul Alsaciano y Azul de Toluidina:</i> positivas a todas las tinciones. |
| Citometría de flujo | Células autofluorescentes, viables, granulares y de gran tamaño. |
| Reacción en ratones | Negativo. |
| Resultados clínicos | Efecto antiinflamatorio, disminución de la distensión de la vaina sinovial, mejoramiento de alineamiento de fibras, del puntaje ecográfico de la lesión y del grado de claudicación. |

DISCUSIÓN

Las células aisladas en este estudio lograron ser cultivadas una vez que se sometió la grasa a un estricto protocolo con enzimas disgregantes, filtración y centrifugación. De este proceso se obtuvo 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 (Zuk *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2003; Strem *et al.*, 2005; Gimble & Guilak, 2006).

Investigaciones en esta área han logrado demostrar que después de aplicarse este protocolo disgregante y de filtración al tejido adiposo se va a aislar un alto porcentaje de MSC. Esta población homogénea va a presentar una baja contaminación de células endoteliales, pericitos y células de músculo liso (Zuk *et al.*, 2001).

Estos datos han permitido determinar que los protocolos con colagenasa poseen una alta especificidad para aislar las ADSC. Inclusive Boquest *et al.* plantean que como método de validación final para determinar si se realizó un aislamiento exitoso de ADSC, las células que se adhieren a la botella de cultivo adquieren una morfología tipo fibroblasto después de aplicado dicho protocolo.

Junto a lo expuesto, se ha reportado que las ADSC van a mantener su

morfología típica después de realizarse varios pasajes y estando en cultivo por largo tiempo (Zuk *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2005). Esta situación es congruente con investigaciones realizadas posteriormente, donde se tuvieron células en diferentes medios de cultivo y hasta por cuatro pasajes sin variar sus características morfológicas, ni su comportamiento en el cultivo. Incluso se logró mantener una población de células madre congeladas por aproximadamente dos meses y al descongelarlas y cultivarlas de nuevo, las células no variaron su morfología (datos no publicados).

En el primer paso de la identificación celular se realizó un panel de tinciones para tratar de definir algunas características importantes. Para la identificación básica se procedió a teñir las células con Giemsa y Hematoxilina/Eosina. Al evaluar las células 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.

Además de estas tinciones se realizó histoquímica, con el fin de determinar si estas células eran lo suficientemente diferenciadas hacia tejidos mesenquimales para ser positivas. Para este propósito se utilizaron las tinciones de PAS, Azul de

Toluidina y Azul Alciano, estas van a teñir positivamente mucopolisacáridos y mucopolisacáridos ácidos que normalmente se van a encontrar en tejidos de origen mesenquimal (Banks, 1986). Las células aisladas fueron positivas a todo el panel de tinciones histoquímicas realizado, lo que sugiere que estas son de origen mesenquimal.

Para tratar de determinar el inmunofenotipo de estas células se procedió a realizar una citometría de flujo. En este caso, el panel de anticuerpos monoclonales incluyó CD13, CD44, CD34, y CD45. En este caso, la literatura reporta que los primeros dos son positivos en las ADSC y los últimos dos son negativos (Zuk et al., 2001; Strem *et al.*, 2005; Fortier & Smith, 2007). De esta manera, se pretendía tener controles negativos, ya que los dos últimos anticuerpos monoclonales se encuentran en células de origen hemático.

Después de realizar este estudio se determinó que la mayoría de las células presentaron autofluorescencia; esto sucede cuando no hay una reacción entre los anticuerpos monoclonales y las células a evaluar. En este caso en particular, probablemente al ser los anticuerpos antihumanos no se pudo montar una respuesta por parte de los anticuerpos a los de las células equinas. Aún así, esta prueba pudo determinar que eran células muy grandes, granulares y que eran viables después de aplicado el protocolo de aislamiento.

Es importante mencionar que se han realizado estudios posteriores utilizando tejido adiposo humano y el mismo protocolo de aislamiento. En estos se han podido aislar células con las mismas características, las cuales además son positivas al CD13 y CD44 y negativas al CD34, CD45 y CD117 (datos no publicados).

Al implantar las células aisladas en ratones se pretendía evaluar si existía algún tipo de reacción inflamatoria o formación de alguna masa tumoral. En este caso se ha reportado que al utilizar ADSC frescas no se presenta ningún tipo de reacción o tumoración (Rubio *et al.*, 2005). Estos datos fueron congruentes con lo sucedido en este experimento después de aproximadamente 22 días. En posteriores estudios con células madre humanas hemos logrado demostrar que estas no producen ningún tipo de reacción adversa, aunque los animales no hayan sido inmunosupresos (datos no publicados).

En el caso de los pacientes equinos, al implantar las células intralesionalmente se determinó que no hubo ningún tipo de reacción inflamatoria obvia después de realizado el procedimiento. Al contrario, se pudo observar que hubo una mejoría marcada en algunos parámetros. Aunque el número de casos tratados en esta investigación no tengan un valor estadístico, sí poseen un gran valor clínico.

Todos estos hallazgos en conjunto nos permiten determinar que las ADSC comparten características importantes con las células aisladas en nuestro estudio, siendo altamente 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.

Los objetivos principales de este estudio fueron determinar si en Costa Rica era técnica y tecnológicamente posible aislar células madre de origen adiposo e implementar un protocolo para alcanzar la meta de llevar las células del cultivo a la lesión del tendón afectado. Nunca fue nuestra meta realizar un estudio para determinar la eficacia de esta línea de terapia. Esta decisión se tomó debido a que la capacidad regenerativa de las MSC ya ha sido descrita por diferentes estudios en el ámbito internacional (Young *et al.*, 1998; Nixon & Dahlgren, 2004; Dahlgren, 2005; Abousleiman *et al.*, 2006; Fortier & Smith, 2007).

Además de regeneración en tendones y ligamentos, las ADSC han probado tener un gran potencial clínico para la regeneración de cartílago, hueso, meniscos, problemas autoinmunes, lesiones nerviosas y problemas isquémicos. Otros estudios han determinado su potencial de diferenciación en cardiomiocitos, músculo esquelético, tejido adiposo, células endoteliales y precursores nerviosos (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003; Ji Gang *et al.*, 2004; Rubio *et*

al., 2005; Strem *et al.*, 2005). En Costa Rica se han tenido experiencias positivas en el tratamiento de casos clínicos de osteoartritis y problemas autoinmunes (datos no publicados).

Es de vital importancia que los conocimientos adquiridos con este trabajo sean tomados como base para poder continuar realizando investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo*, ya que esta línea de terapia posee una gran cantidad de aplicaciones clínicas en el tratamiento de patologías comúnmente encontradas en la práctica médica cotidiana. Esto es válido no solo en equinos, sino en muchas otras especies animales, incluyendo al ser humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abousleiman, R.; P. Mc Fetridge & Vassilios. 2006. Mechanically stimulated mesen-quimal stem cells from tendon-like tissue [en línea]. *Biomaterials for Tissue Engineering II*, AICHE Annual Meeting, San Francisco, CA, USA. <http://aiche.confex.com/aiche/2006/techprogram/P74623.HTM> (Consulta: 17 oct., 2006).
- Adams, O.R. 1974. *Lameness in Horses*. 3rd ed. Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- Banks, W. 1986. *Histología Veterinaria Aplicada*. Editorial El Manual Moderno, México, D.F.

- Becker, C.K.; H.H. Savelberg; H.H. 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: 347-351. 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 abr., 2006).
- Boquest, A.; A. Shahdadfar; J. Brinckmann & P. Collas. 2006. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue. *Methods in Molecular Biology.* 325: 35-46.
- Crowe, O.M.; S.J. Dyson; I.M. Wright; M.C. Schramme & R.K. Smith. 2004. Treatment of chronic or recurrent proximal suspensory desmitis using radial pressure wave therapy in the horse. *Equine Vet. J.* 36: 313-316.
- 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]. 47th Annual Convention American Association Equine Practitioners. San Antonio, Texas, USA. <http://www.ivis.org/proceedings/AAEP/2000/176.pdf> (Consulta: 3 abr., 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]. 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 abr., 2006).
- Dyson, S. 1991a. Proximal suspensory desmitis: clinical, ultrasonographic and radiographic features. *Equine Vet. J.* 23: 25-31.
- Dyson, S. 1991b. Desmitis of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon: 27 cases (1986-1990) [en línea]. *Equine Vet. J.* 23: 438-444. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=pubmed&dopt=Abstract&list_uids=1778161&query_hl=6&itool=pubmed_DocSum (Consulta: 3 abr., 2006).
- Dyson, S.J. 2004. Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet. J.* 36: 415-419.
- Fortier, L. & R.K. Smith. 2007. Evidence of stem cells in cartilage regeneration [en línea]. 53th Annual Convention American Association Equine Practitioners. Orlando, Florida, USA. <http://www.ivis.org/>

- proceedings/AAEP (Consulta: 20 ene., 2008).
- Gaughan, E.M.; A.J. Nixon; L.P., Krook; A.E. Yeager; K.A. Mann; H. Mohammed & D.L. Bartel. 1991. Effects of sodium hyaluronate on tendon healing and adhesion formation in horses [en línea]. *Am. J. Vet. Res.* 52: 764-773. 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 abr., 2006).
- Gibson, K.T.; H.M. Burbidge & D.U. 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: 631-635. 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 abr., 2006).
- Gimble, J.M. & F. Guilak. 2006. Adipose derived stem cells: isolation, characterization and differentiation potential. *Cytotherapy.* 5: 362-369.
- 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. W.B. Saunders, Londres.
- Huang, J.I.; S.R. Beanes; M. Zhu; H.P. Lorenz; M.H. 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 abr., 2006).
- Ji Gang, E.; J.A. Jeong; S.H. Hong; S.H. Hwang; S.W. Kim; I.H. Yang; C. Ahn; H. Han & H. Kim. 2004. Skeletal Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Umbilical Cord Blood [en línea]. *Stem Cells.* 22: 617-624. <http://www.StemCells.com/cgi/content/full/22/617> (Consulta: 3 abr., 2006).
- Kasashima, Y.; T. Takahashi; R.K. Smith; A.E. Goodship; A. Kuwano & T. Ueno. 2004. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat Racehorses in 1999. *Equine Vet. J.* 36: 346-350.
- Nixon, A. & L. Dahlgren. 2004. Adipose derived pluripotent stem cells for tendon repair [en línea]. Comparative Orthopaedic Laboratory, School of Veterinary Medicine, Cornell University. <http://www>.

- vet-stem.com/Enhanced/Cornell_Tendon_Study.pdf (Consulta: 3 abr., 2006).
- Ross, M. & S. Dyson. 2003. *Diagnosis and management of lameness in the horse*. 1st. ed. W.B. Saunders, Philadelphia, USA.
- Rubio, D.; J. Garcia; M. Martin; R. de la Fuente *et al.* 2005. Spontaneous Human Adult Stem Cell Transformation *Cancer Res.* 65: 8.
- 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.
- Strem, B.; K. Hicok; M. Zhu; I. Wulur; Z. Alfonso; R. Schreiber; J. Fraser; M. Hedrick. 2005. Multipotential Differentiation of Adipose Tissue - Derived Stem. *Keio J. Med.* 54 (3): 132-141.
- Young, R.; D.L. Butler; W. Weber; A.I. Caplan; S.L. Gordon; D.J. Fink. 1998. Use of Mesenchymal Stem Cells in a Collagen Matrix for Achilles Tendon. *Repair. J. Ortho. Res.* (16): 406.
- 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](http://www.Macropore.com/pdf/Tissue_Engineering_Article.pdf) (Consulta: 3 abr. 2006).
- Zuk, P.A.; 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 abr., 2006).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Ml. Estrada y al Sr. José Vargas, que en nombre del Hospital de Especies Mayores de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional, colaboraron enormemente con este proyecto con pacientes y apoyo técnico.

A la colaboración del Laboratorio de Citogenética del Hospital de Niños y el Laboratorio de Virología Médica de la UCR, por la ayuda con los cultivos celulares.

Al Laboratorio de Patología del Hospital de Niños (Dra. Silvia Santamaría, Dr. Alfonso Carranza y Sr. Martín Sánchez) y del Hospital México (Dr. Constantino Liano), por las tinciones de las células aisladas.

Al Laboratorio de Investigación del Hospital de Niños, en especial a la Dra. Berta Valverde, por la citometría de flujo realizada a las células.

A los doctores Ricardo Estrada y Bruno Lomonte del Instituto Clodomiro Picado, por la ayuda con las pruebas con ratones y otras asesorías.

Al Consejo Nacional de Rectores (CONARE) por el apoyo económico para formar la Unidad de Terapia Celular, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional, Costa Rica.

A todas las otras personas que nos ayudaron y que se nos escapan en este momento.