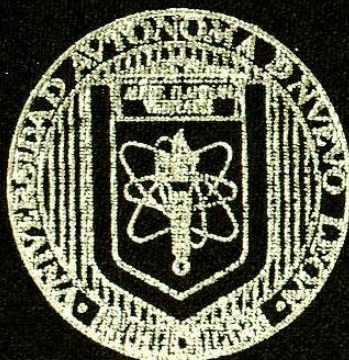


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



**CULTIVO DE CONDROCITOS HUMANOS PARA LA IMPLANTACION
EN LESIONES ARTICULARES**

Por

M.V.Z. JORGE LARA ARIAS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

MARZO DE 2006

TM

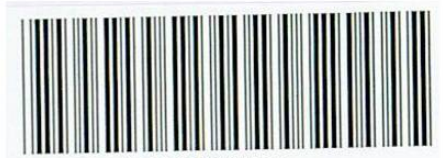
RC925

.5

.L37

2006

c.1



1080128751

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



CULTIVO DE CONDUCTOS HUMANOS PARA LA IMPLANTACION
EN LESIONES ARTICULARES

Por

M.V.Z. JORGE LARA ANIAS

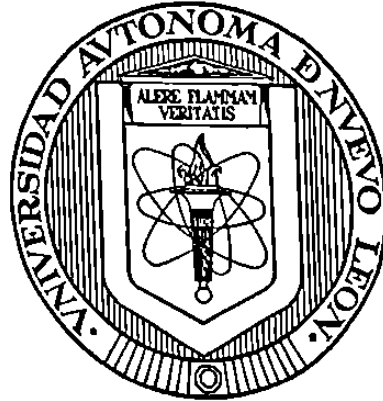
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA QUIMICA

MARZO DE 2006





**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**CULTIVO DE CONDROCITOS HUMANOS PARA LA IMPLANTACIÓN EN
LESIONES ARTICULARES**

Por

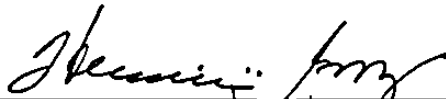
M.V.Z. JORGE LARA ARIAS

**Como Requisito Parcial para Obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad en Biología Molecular e
Ingeniería Genética**

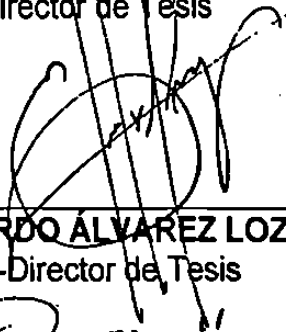
Marzo, 2006

**CULTIVO DE CONDROCITOS HUMANOS PARA LA
IMPLANTACIÓN EN LESIONES ARTICULARES**

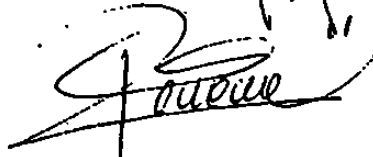
Aprobación de la Tesis:



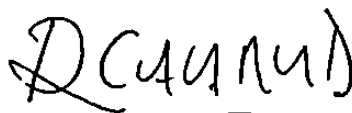
DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Director de Tesis



DR. EDUARDO ALVAREZ LOZANO
Co-Director de Tesis



DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ
Co-Director de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Estudios de Posgrado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Banco de Hueso y Tejidos Subdivisión del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez y la codirección del Dr. Med. Eduardo Álvarez Lozano del Banco de Hueso y Tejidos y de la Dra. Rocío Ortiz López de la Unidad de Diagnóstico Molecular del Departamento de Bioquímica.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a la **Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez** por haberme dado la oportunidad de participar en este proyecto, por ser muy paciente conmigo y por su invaluable atención.

Agradezco de manera muy especial al **Dr. Eduardo Álvarez Lozano** por todo el apoyo brindado (y vaya que ha sido bastante), por la confianza al dejar en mis manos decisiones importantes y por considerarme parte del equipo.

Así mismo, quiero agradecer la gran disposición, siempre amable y atenta, de la **Dra. Rocío Ortiz López** para que las IHQ se llevaran a cabo.

Agradezco sinceramente al **Dr. Oscar F. Mendoza Lemus** por su buena voluntad y todas las facilidades económicas proporcionadas para el desarrollo de este estudio.

Al **Dr. Jirí Adler** por su fundamental ayuda para implementar el cultivo de condrocitos y por enseñarme que la humildad es saber que no se sabe.

Al **Dr. Juan B. Kouri Flores** por la invitación y todas las atenciones que tuvo durante mi estancia en el Laboratorio de Patología Experimental del CINVESTAV.

A los patólogos **Dra. Natalia Vilches** y al **Dr. Juan P. Flores** por su valiosa y desinteresada colaboración en las IHQ.

Especialmente a mis amigos **Margarita, Angel, Karina, Victor, Oscar, Rafa, Carmelita, Maestra Lolita, Christian, Chiu, Carrillo, Jonathan, Cecy, Bere, Sofi, Iván, Juan Manuel, Denisse, Juany y Lupita**, por su amistad y por compartir de manera generosa sus conocimientos.

A los **Profesores** de la U.L.I.E.G, por influir directamente en mi formación y en el cambio de actitud para afrontar esta responsabilidad.

A mis amigos de Banco de Hueso, **Pacheco, Deya, Alex, Noé, Gris, Dr. Briceño, Dr. Galván, Sr. Arnulfo y Erica**, por su amistad, haciendo grata mi estancia en este lugar.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el apoyo económico a lo largo de estos dos años.

DEDICATORIA

Dios, que siempre recurrí a ti en los momentos difíciles y encontré calma a pesar de todo. Gracias.

Papá, que siempre me escuchaste y estuviste de mi lado, teniendo las palabras precisas, en el momento justo, celebraste mis aciertos y me corregiste en los errores. Gracias por tu esfuerzo de impulsarnos y mantenernos con la mirada hacia delante.

Mamá, que siempre me llenas de felicidad cuando escucho tu voz, eres mi mejor amiga. Gracias, porque de ti aprendí a observar los pequeños detalles y a hacer lo que es correcto.

Moni y Ma José, Gracias porque de a ustedes he aprendido lo que es ser un hermano, a pesar de lo que pase siempre están en mi pensamiento, porque con su ejemplo aprendí a vencer los retos, demostraron que lo que no es fácil tampoco es imposible. **Sofi**, te quiero mucho.

Karla, estuviste presente a lo largo de este trabajo, soportando mi mal carácter, apoyándome en los momentos difíciles y alentándome cuando ya no podía más, Gracias por todos esos instantes en los que olvidaste tus obligaciones por ir conmigo. Te amo.

Y a todos mis amigos que de alguna manera influyeron en mí para seguir adelante, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Contenido	Página
Lista de Tablas	i
Lista de Figuras	ii
Abreviaturas	iii
Resumen	v
CAPÍTULO	Página
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 Articulaciones sinoviales	3
1.1.1 Estructura y Función	3
1.2 Cartílago Articular	3
1.2.1 Función	3
1.2.2 Estructura	5
1.2.3 Metabolismo	8
1.2.4 Bioquímica	9
1.3 Biología del Cartílago Articular	12
1.4 Lesiones del Cartílago Articular	13
1.5 Evolución del Cartílago con la Edad	13
1.6 Cultivo de Condrocitos	13
1.6.1 Ingeniería Tisular	13
1.6.2 Cultivo de Condrocitos en Monocapa	15
1.6.3 Implante de Condrocitos Resuspendidos en Medios Líquidos	17
1.6.4 Inclusión de Condrocitos en Medios Tridimensionales	18

Capítulo	Página
1.6.5 Implante de Condrocitos Autólogos en México	19
II Justificación	20
III Objetivos	21
3.1 Objetivo General	21
3.2 Objetivos Específicos	21
IV Estrategia General	22
V Materiales y Métodos	23
5.1 Material Humano	23
5.1.1 Criterios de Inclusión	23
5.1.2 Exploración Física	23
5.1.3 Radiología	24
5.1.4 Impresión Diagnóstica	24
5.1.5 Toma de la Biopsia	24
5.2 Transporte de la Biopsia	24
5.3 Cultivo de Condrocitos	25
5.4 Velocidad de Crecimiento y Viabilidad Celular	27
5.5 Inclusión de los Condrocitos en la Fibrina	27
5.6 Implante de Condrocitos Autólogos en el Paciente	28
5.6.1 Rehabilitación	28
5.6.2 Toma de Biopsia a los Seis Meses Postimplante	29
5.7 Extracción de RNA y RT-PCR	29
5.8 Inmunofluorescencia	32
5.9 Inmunohistoquímica	33

Capítulo	Página
VI Resultados	35
VII Discusión	44
VIII Conclusiones	50
Bibliografía	51

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla I. Oligonucleótidos y productos amplificados.	30
Tabla II. Condiciones de amplificación para colágeno II y Sox 9.	30
Tabla III. Condiciones de amplificación para colágeno I.	31
Tabla IV. Condiciones de amplificación para la RT-PCR.	31

5.3 CULTIVOS DE CONDROCITOS

Se realizó el cultivo celular utilizando, con algunas modificaciones, la técnica reportada por Visna y col (9). La biopsia de cartilago articular se seccionó en pequeños cubos de aproximadamente 1-3 mm³, en una campana de flujo laminar clase II (SterilGARD® III advance°. THE BAKER COMPANY, Gatehouse Road. Sanford, USA), en todo momento se evitó que la muestra se desecara agregando solución salina Gey's (SIGMA-ALDRICH Inc. St Louis, USA). Los fragmentos de cartilago se colocaron en un vial de 10ml y se trataron con 3ml de tripsina sin EDTA al 2.5% (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. (Grand Island, NY, EUA) durante 30 minutos a 37 °C, se mantuvieron en agitación suave y constante, utilizando una barra y un agitador magnético (Corning, NY, EUA) para mover los fragmentos. Para la digestión de la matriz condral, se trató al cartilago por 90 minutos con colagenasa tipo II (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, NY, EUA), previamente se diluyó 40mg de la enzima en 20ml de solución salina Gey's, y se pasó este volumen por un filtro de disco de 0.22µ (NUNC™ Creek Drive, Rochester, NY). Una digestión enzimática eficaz del cartilago requiere que la mayor superficie posible del tejido sea expuesta a las enzimas. La cantidad de medio de digestión fue proporcional a la cantidad del cartilago a disgregar. La digestión con colagenasa se realizó a 37°C y en agitación continua. Una vez transcurrido el tiempo de digestión de la muestra, se recuperó el sobrenadante y los fragmentos no digeridos fueron sometidos a una nueva digestión con colagenasa tipo II por otros 90 minutos. Las células del sobrenadante fueron sedimentadas por centrifugación (Heraeus, Thermo Electron Corporation.

Ridgefield Court, Asheville, USA) a 1500 rpm por 5 minutos y lavadas varias veces con medio de cultivo para eliminar el resto de colagenasa. Los condrocitos obtenidos, fueron sembrados en frascos de cultivo de 75 cm² (NUNC™ Creek Drive, Rochester, NY) para su crecimiento *in vitro*. El medio empleado fue Opti-MEM (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA) o con 10% de suero humano autólogo (SHA), obtenido de 100ml de sangre periférica del paciente por centrifugación a una velocidad de 2500 rpm durante 10 minutos. A los dos medios se les añadió 0.05 mg de gentamicina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora de CO₂ (New Brunswick Scientific Inc. Talmadge Road Edison, New Jersey, USA) a una atmósfera controlada de 5% de CO₂ y una humedad relativa del 100%. La proliferación de los condrocitos se monitoreó usando un microscopio invertido (ZEISS®, Carl Zeiss. Göttingen, Germany). Cuando los cultivos en monocapa alcanzaron entre el 70-80% de confluencia, se levantaron las células incubándolas con tripsina-EDTA al 0.25% (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA). Después de recibir este tratamiento durante 5 minutos a 37°C, las células se despegaron de la superficie en la que se encontraban adheridas, facilitando su resuspensión en medio de cultivo fresco para posteriormente subcultivarlas a menor densidad de uno a tres frascos, lo que permitió a los condrocitos seguir proliferando (siempre se tuvo cuidado de que la confluencia en las botellas antes del subcultivo no fuera mayor al 70-80%).

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema de los diferentes tipos de lubricación.	4
Figura 2. Diferentes estratos del cartílago articular.	8
Figura 3. Esquema de la estrategia general	22
Figura 4. Condrocitos cultivados en monocapa.	35
Figura 5. Curva de crecimiento celular	36
Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular	36
Figura 7. Generación del bioimplante.	37
Figura 8. Migración Celular	38
Figura 9. Expresión de colágenos I, II y de Sox 9	38
Figura 10. Inmunofluorescencia para células en monocapa.	40
Figura 11. Inmunofluorescencia para células incluidas en fibrina.	40
Figura 12. Inmunohistoquímica para células incluidas en fibrina.	41
Figura 13. Seguimiento seis meses postimplante	42
Figura 14. Inmunohistoquímica seis meses post-implante.	43

NOMENCLATURAS

μ	Micras
μ l	Microlitros
$^{\circ}$ C	Grados Centígrados
cm ²	Centímetros Cuadrados
col	Colaboradores
Col I	Colágeno tipo I
Col II	Colágeno tipo II
dNTP's	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
ICA	Implante de Condrocitos Autólogos
IHQ	Inmunohistoquímica
IP	Ioduro de Propidio
kDa	Kilo Daltons
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligramos
ml	Mililitros
mm ³	Milímetros cúbicos
pb	Pares de Bases
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PG	Proteoglicanos
pH	Logaritmo Negativo de la Concentración de Iones Hidrógeno
RNA	Ácido Ribonucleico

rpm	Revoluciones por Minuto
RT	Transcripción Reversa
SBF	Suero Bovino Fetal
SHA	Suero Humano Autólogo
TIMPs	Inhibidores Tisulares de las Metaloproteasas

RESUMEN

Jorge Lara Arias

Fecha de Graduación: Marzo, 2006

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

**Título del Estudio: CULTIVO DE CONDROCITOS AUTÓLOGOS HUMANOS
PARA LA IMPLANTACIÓN EN LESIONES ARTICULARES**

Número de Páginas: 56

Área de Estudio: Ingeniería Tisular

Introducción. El implante de condrocitos autólogos (ICA) es una técnica terapéutica diseñada para reparar lesiones del cartílago hialino ubicado en la superficie de las articulaciones sinoviales. **Objetivo.** Implementar el cultivo de condrocitos autólogos humanos para el trasplante en defectos articulares. **Material y Métodos.** Se obtuvieron condrocitos humanos a partir de una biopsia de cartílago tomada de la rodilla de un paciente de 23 años con una lesión osteocondral en el domo del astrágalo izquierdo. Se realizó una curva de crecimiento y se estimó el tiempo de duplicación y la viabilidad de condrocitos cultivados en medios suplementados con SHA o SBF. A las células cultivadas en un medio suplementado con SHA, se les realizaron dos pasajes para aumentar la población a 15×10^6 células, posteriormente se incluyeron en una matriz de fibrina para generar un implante de condrocitos autólogos que fue colocado en la lesión del paciente 24 horas post-inclusión celular. Se comparó la matriz extracelular (MEC) de una biopsia de cartílago con la MEC sintetizada por los condrocitos establecidos en monocapa y al ser incluidos en la matriz tridimensional, se realizaron pruebas de RT-PCR e IHQ a los 7, 14 y 21 días para la detección de Sox 9, de colágeno tipo I y II. A manera de seguimiento, se realizó IHQ a una biopsia tomada del injerto seis meses post-implante. **Resultados.** No se encontró diferencia significativa en el tiempo de duplicación ni en la viabilidad de los condrocitos cultivados con SHA o SBF. El colágeno de tipo II y el factor de transcripción Sox 9, estuvieron presentes en la biopsia de cartílago hialino, en donde no se observó el colágeno tipo I. El colágeno I se detectó desde la primera semana en la monocapa, sugiriendo un proceso de desdiferenciación. Sin embargo, las células expresaron colágeno II y el factor Sox 9 en todo el período de cultivo. Durante la permanencia de los condrocitos en la fibrina, fue más apreciable el colágeno I. No obstante, también se pudo distinguir el factor Sox 9 y el colágeno de tipo II. La IHQ confirmó estos hallazgos y reveló la extensión de la MEC formada. Muchos de los condrocitos incluidos en la fibrina demostraron su viabilidad migrando a la caja de cultivo para establecerse en monocapa. Seis meses postimplante, el paciente se reportó incorporado a sus actividades diarias, se tomó una biopsia en el borde externo del injerto, y se encontró que el colágeno de tipo I estaba relleno esa zona del implante. **Conclusión.** El ICA permitió la recuperación clínica del paciente tratado, aunque a los seis meses postimplante, se detectó predominantemente colágeno tipo I. **Perspectivas.** Deberá hacerse una valoración del tipo de cartílago presente en el injerto a un tiempo más prolongado para determinar si hay formación de cartílago hialino.

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Directora de Tesis

CAPITULO III

OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar el cultivo de condrocitos autólogos humanos para el trasplante en defectos articulares

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Implementar la técnica de cultivo de condrocitos humanos en medio de cultivo suplementado con suero bovino fetal (SBF)
2. Implementar la técnica de cultivo de condrocitos humanos en medio suplementado con suero autólogo.
3. Comparar las características celulares presentes en ambos tipos de cultivos.
4. Incluir los condrocitos cultivados en monocapa en una matriz tridimensional a base de fibrina para generar el auto-injerto.
5. Detectar la presencia de Sox 9, colágeno tipo I y II en una biopsia de cartílago, en cultivos en monocapa y en el injerto mediante ensayos moleculares e inmuno-histoquímicos.
6. Detectar la presencia de colágeno tipo I y II en una biopsia de cartílago del paciente a los seis meses post-implante del injerto.

CAPÍTULO IV

ESTRATEGIA GENERAL

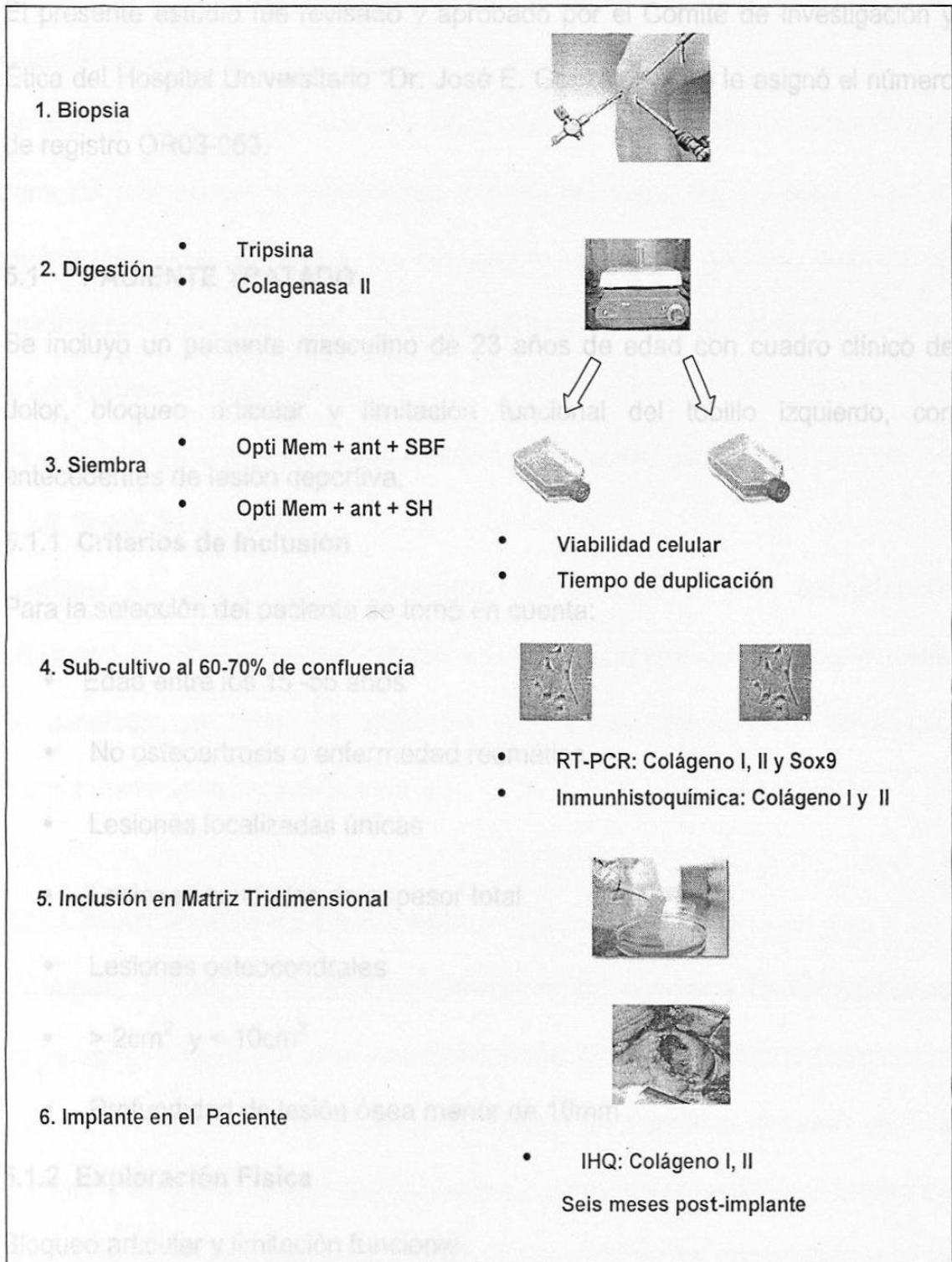


Figura 3. Esquema de la estrategia general.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario "Dr. José E. González" y se le asignó el número de registro OR03-053.

5.1 PACIENTE TRATADO

Se incluyó un paciente masculino de 23 años de edad con cuadro clínico de dolor, bloqueo articular y limitación funcional del tobillo izquierdo, con antecedentes de lesión deportiva.

5.1.1 Criterios de Inclusión

Para la selección del paciente se tomó en cuenta:

- Edad entre los 15 -55 años
- No osteoartrosis o enfermedad reumática
- Lesiones localizadas únicas
- Lesiones condrales de espesor total
- Lesiones osteocondrales
- $> 2\text{cm}^2$ y $< 10\text{cm}^2$
- Profundidad de lesión ósea menor de 10mm

5.1.2 Exploración Física

Bloqueo articular y limitación funcional.

Rangos de movilidad en tobillo derecho:

Dorsiflexión de 15° y flexión plantar de 55°

Rangos de movilidad en tobillo izquierdo:

Dorsiflexión de 9° y flexión plantar de 50°

5.1.3 Radiología

En la radiografía anteroposterior y lateral del tobillo izquierdo, se observó una zona de radiolucidez en el margen externo del domo del astrágalo, lo cual sugirió fractura osteocondral. La resonancia magnética nuclear, proporcionó una imagen de hipointensidad en las secuencias de T2 en el mismo sitio.

5.1.4 Impresión Diagnóstica

Fractura osteocondral en el borde externo del domo del astrágalo izquierdo.

5.1.5 Toma de la Biopsia

Mediante un procedimiento quirúrgico con invasión mínima (artroscopía), utilizando un OATS™ de Artrex® (Karisfeld, Germany) se obtuvo una muestra de cartilago de 8mm de diámetro del surco intercondíleo, zona que normalmente no es sometida a carga.

5.2 TRANSPORTE DE LA BIOPSIA

La biopsia de cartilago se envió al Laboratorio de Ingeniería Tisular del Banco de Hueso y Tejidos, división del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario "Dr. José E. González" en donde se procesó para la expansión y mantenimiento de condrocitos *in vitro*. El transporte de la biopsia se realizó en suero fisiológico suplementado con 0.05mg de gentamicina para la prevención al crecimiento bacteriano.

5.4 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y VIABILIDAD CELULAR

Para estimar la velocidad de crecimiento y la viabilidad celular, se sembraron condrocitos en placas de 24 pozos (Corning Inc Costar®. Corning, NY, EUA), a una densidad inicial de 30,000 células por pozo. Estas células se levantaron cada 24 horas utilizando tripsina-EDTA, se tiñeron con azul tripano (SIGMA CHEMICAL CO. St, Louis, MO, EUA) y se contaron utilizando una cámara de Neubauer, en un microscopio invertido. Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el tiempo de duplicación celular (56, 57).

$$n = \log_{10} N - \log_{10} N_0 / \log_{10} 2$$

En donde:

n = Número de generaciones que ha ocurrido durante la fase exponencial.

N = Número final de células.

N_0 = Número inicial de células.

El tiempo de generación de la fase exponencial se calcula $g = t/n$

= Tiempo total de cultivo / Número de generaciones

5.5 INCLUSIÓN DE LOS CONDROCITOS EN LA FIBRINA

Para incluir a los condrocitos en un medio tridimensional, se utilizó el adhesivo a base de fibrina Tissucol® de Baxter (Viena, Austria). Se siguieron las instrucciones de la casa comercial y previa a la mezcla del fibrinógeno y la trombina, proporcionados en el estuche, se adicionaron los condrocitos para quedar suspendidos en la fibrina, por último, se vertió una gota de este combinado en una caja de Petri con el objetivo de observar la distribución celular, así como también detectar la presencia de Sox 9, y de colágeno tipo I y

Il por medio de IHQ y RT-PCR a diferentes tiempos. El resto de los condrocitos incluidos en el Tissucol®, se vertió en un molde de acrílico de 4 por 5cm, durante 5 minutos, tiempo en el cual se alcanzó el fraguado de la matriz. Después de solidificado, el implante se conservó durante 24 horas a temperatura ambiente, en un frasco estéril con medio sin suero.

5.6 IMPLANTE DE CONDROCITOS AUTÓLOGOS EN EL PACIENTE

El ICA se realizó 24 horas después de la inclusión celular, por medio de una artrotomía realizando osteotomía en libro abierto del extremo distal del peroné logrando la exposición de la zona dañada, se retiró el fragmento osteocondral desprendido y se realizó el curetaje de tejido cicatrizaral en el fondo de la lesión. Se retiraron los bordes marginales del cartílago articular circundante al defecto, se realizaron microfracturas en el lecho de la lesión. Se tomó un molde de la morfología del defecto con una plantilla de aluminio y se verificó que éste lo cubriera en su totalidad. Con el molde se realizó el diseño del bioimplante, el cual se fijó con Tissucol® y se tuvo cuidado que sus bordes contactaran con el defecto articular receptor. Se realizó osteosíntesis de la osteotomía del peroné con una placa tercio de caña y tornillos corticales. Se realizó el cierre de la herida quirúrgica por planos y se colocó un vendaje compresivo anti-edema.

5.6.1 Rehabilitación

Se inició con movilidad temprana en el postoperatorio inmediato. Movilidad pasiva de la articulación 8 horas después de la cirugía. La movilidad activa comenzó a las 48 horas. A los 10 días después, se procedió con marcha punta-pie asistida con muletas y con carga progresiva. A las seis semanas, el proceso

se continuó con marcha plantigrada con 75% de carga del peso corporal. El protocolo de rehabilitación concluyó a las 18 semanas retirando las muletas y aplicando carga total.

5.6.2 Toma de Biopsia a los Seis Meses Postimplante

A las 24 semanas postimplante, se retiró la placa tercio de caña de osteosíntesis y los tornillos corticales. En el mismo tiempo quirúrgico, se tomó una pequeña biopsia del borde marginal del implante, en una zona no sometida a carga en el extremo lateral del domo del astrágalo.

5.7 EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR

Se obtuvo RNA de cultivos de condrocitos humanos establecidos en monocapa a los 7, 14 y 21 días siguiendo el protocolo de extracción establecido por el estuche de la marca comercial Purescript® de Gentra Systems Inc (Minneapolis, Mn, EUA). Se realizó el mismo procedimiento a una muestra de cartílago sano, así como también al explante de condrocitos humanos incluidos en fibrina a los 7, 14 y 21 días post-inclusión celular. Se utilizaron iniciadores específicos para la detección de colágeno tipo II (240 pb), colágeno tipo I (250 pb) y del factor de transcripción Sox 9 (300 pb), los cuales se diseñaron utilizando el programa de cómputo Vector NTI Viewer 4.0.1 (Informax Inc, Gaithersburg, USA) (tabla 1) a partir de las secuencias reportadas en el GenBank para Sox 9 (>gi|5123454|ref|NP_005336.2|), colágeno I (gi|48762933|ref|NM_000089.3| [4876 2933]) y colágeno II (gi|15149478|ref|NM_033150.1|[15149478]). El estuche empleado para la RT-PCR fue de EPICENTRE® Biotechnologies (Madison, WI, EUA), estas

reacciones se montaron en el termociclador Geneamp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Las condiciones para la amplificación de colágeno I, II y de Sox 9, así como del programa para dichas amplificaciones, se describen en las tablas II y III respectivamente. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa (Invitrogen™ Life Technologies. Carlsbad, CA, EUA) al 1.5% y las bandas obtenidas se observaron en un transiluminador de rayos ultravioleta (Gel Documentation System 1000, BIORAD).

Tabla I. Oligonucleótidos y productos amplificados.

Primer	Secuencia	Producto	Referencia
Colágeno I	CCCCTCCCCAGCCACAAAGAGTCTA CCACACGTCTCGGTCATGGTACCTG	204	Vector NTI
Colágeno II	GAGGTGGATGCCCACTCAAGTCCCT GCCAGTCTCCATGTTGCAGAAAACCT	203	Vector NTI
Sox 9	AAGATGGCCCAGGAGAACCCCAAG TAATCCTTCATGTGCACCGCCCTG	145	Vector NTI

Tabla II. Condiciones de amplificación para colágeno II y Sox 9.

Componentes Premix 1	Volumen μ l	Componentes Premix 2	Volumen μ l
H ₂ O	14.5	H ₂ O	18.5
Buffer 20x	2.5	dNTP's	2.0
MgCl ₂ 25 mM	1.5	Primer mix 10 mM	2.5
Master amp	5.0	RNA	2.0
MnSO ₄	1.0		
Retro amp	0.5		
Total	25.0		25.0

Tabla III. Condiciones de amplificación para colágeno I.

Componentes Premix 1	Volumen μ l	Componentes Premix 2	Volumen μ l
H ₂ O	14.0	H ₂ O	19.0
Buffer 20x	2.5	dNTP's	2.0
MgCl ₂ 25 mM	2.0	Primer mix 10 mM	2.5
Master amp	5.0	RNA	1.5
MnSO ₄	1.0		
Retro amp	0.5		
Total	25.0		25.0

Tabla IV. Condiciones de amplificación para la RT-PCR.

Retro-transcripción	60° C	20 minutos
PCR	40 ciclos	
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Alineación	60°C	30 segundos
Extensión	72°C	60 segundos
	72°C	4 minutos

5.8 INMUNOFLUORESCENCIA

Esta técnica se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en la ciudad de México Distrito Federal, a cargo del Dr. Juan B. Kouri Flores. Muestras de cartilago y de injerto de condrocitos se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS (SIGMA CHEMICAL CO. St, Louis, MO, EUA) pH 7.2 por 2 horas, posteriormente se lavaron tres veces con PBS por dos minutos. Se mantuvieron en sacarosa al 10% en PBS pH 7.2 toda la noche. Después de una serie de lavados por dos minutos en PBS, las muestras se cortaron en un criostato y se colocaron en laminillas previamente lavadas con agua desionizada y desengrasadas con etanol absoluto e incluidas en gelatina al 0.5% con sulfato de potasio crómico al 0.5%, estas laminillas se prepararon con un día de anticipación y se dejaron secar toda la noche. Los cortes se conservaron a -20°C y se hidrataron con PBS pH 7.2 por 10 minutos, se lavaron con PBS-tween (PBS-T) al 0.2% pH 7.2 por 10 minutos. Se bloqueó con albúmina libre de IgG (Invitrogen® Life Technologies. Carlsbad, CA, EUA) de 0.5%-0.2% en PBS-T por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados durante cinco minutos con PBS-T, se colocaron 50 µl del primer anticuerpo (colágeno I ó colágeno II) de la marca Santacruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, EUA), se hicieron diluciones 1:100 en PBS-T y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se lavó tres veces por cinco minutos en PBS-T, se secó el área alrededor de la muestra y se incubaron los anticuerpos secundarios con el fluorocromo en PBS-T (50µl) por dos horas en la oscuridad a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Cada laminilla se lavó tres veces

por cinco minutos con PBS-T y tres minutos con PBS. Se adicionó ioduro de Propidio (IP) a una concentración de 10 mg/ml. Se incubó el IP por cinco minutos cubriendo la laminilla de la luz. Se realizaron tres lavados de un minuto con PBS en agitación suave y se lavaron dos veces por cinco minutos con agua bidestilada (en agitación). Por último se adicionó Vectashield® (Vector Laboratories, Ontario, Canada) como medio protector para evitar la pérdida de la fluorescencia, se colocó un cubre objetos y se sellaron los bordes con barniz para finalmente visualizar los cortes en el microscopio de fluorescencia. Los cortes procesados se almacenaron a -20°C.

5.9 INMUNOHISTOQUÍMICA

El tejido se seccionó en pequeños cubos, estos se fijaron con formol al 10% y se sometieron a deshidrataciones con alcohol etílico a concentraciones crecientes de 85%, 98% y culminando con alcohol absoluto. Se incluyeron en xilol por 10 minutos y se incluyeron en parafina fundida a 60°C. Por último, la pieza se colocó en un molde y los cortes se hicieron con un microtomo (3µ). Se fijaron con albúmina y se incluyeron en xilol por 10 minutos, después se rehidrataron en concentraciones decrecientes de alcohol etílico, es decir, 100%, 98% y 85% (20 inmersiones c/u), el proceso concluyó con recuperación en agua. A continuación, se dirigieron anticuerpos primarios específicos para la detección de colágeno I y para colágeno II (1:50) Abcam plc (Cambridge, MA, EUA) a células establecidas en monocapa, a una muestra de cartílago hialino y al implante de fibrina/condrocitos. Se utilizó el equipo Dako Autostainer (Dako Corporation. Vía Real, Carpinteria, CA), el cual utiliza los reactivos

Dakocytomation Tris-Buffered y DakoTween[®]20 para los tiempos en incubación y lavados. Como bloqueador se utilizaron 200 µl de H₂O₂, como anticuerpo secundario 200 µl de Link2 HRP (Universal biotinylated secondary antibody, Link, DAKO LSAB[®]-HRP system), 200 µl de SA2HRP como conjugado (DAKO LSAB[®]-HRP system) y 200µl de DAB+ como cromógeno/substrato, todos estos reactivos de la marca Dako Corporation (Carpinteria, CA, EUA). El proceso automatizado concluyó en dos horas aproximadamente, posteriormente se realizaron tres lavados con agua y se incubaron por 20 segundos en hematoxilina SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA), para después ser lavados en agua hasta decolorarse por completo. Las laminillas se trataron con alcohol etílico a concentraciones decrecientes (100-70%) hasta terminar en xilol por 10 minutos, se fijaron con Entellan[®] Merck (Darmstadt, Germany). Se colocaron los cubre objetos y se observaron en un microscopio invertido adaptado a un sistema de cómputo para capturar las imágenes.

CAPÍTULO IV

ESTRATEGIA GENERAL

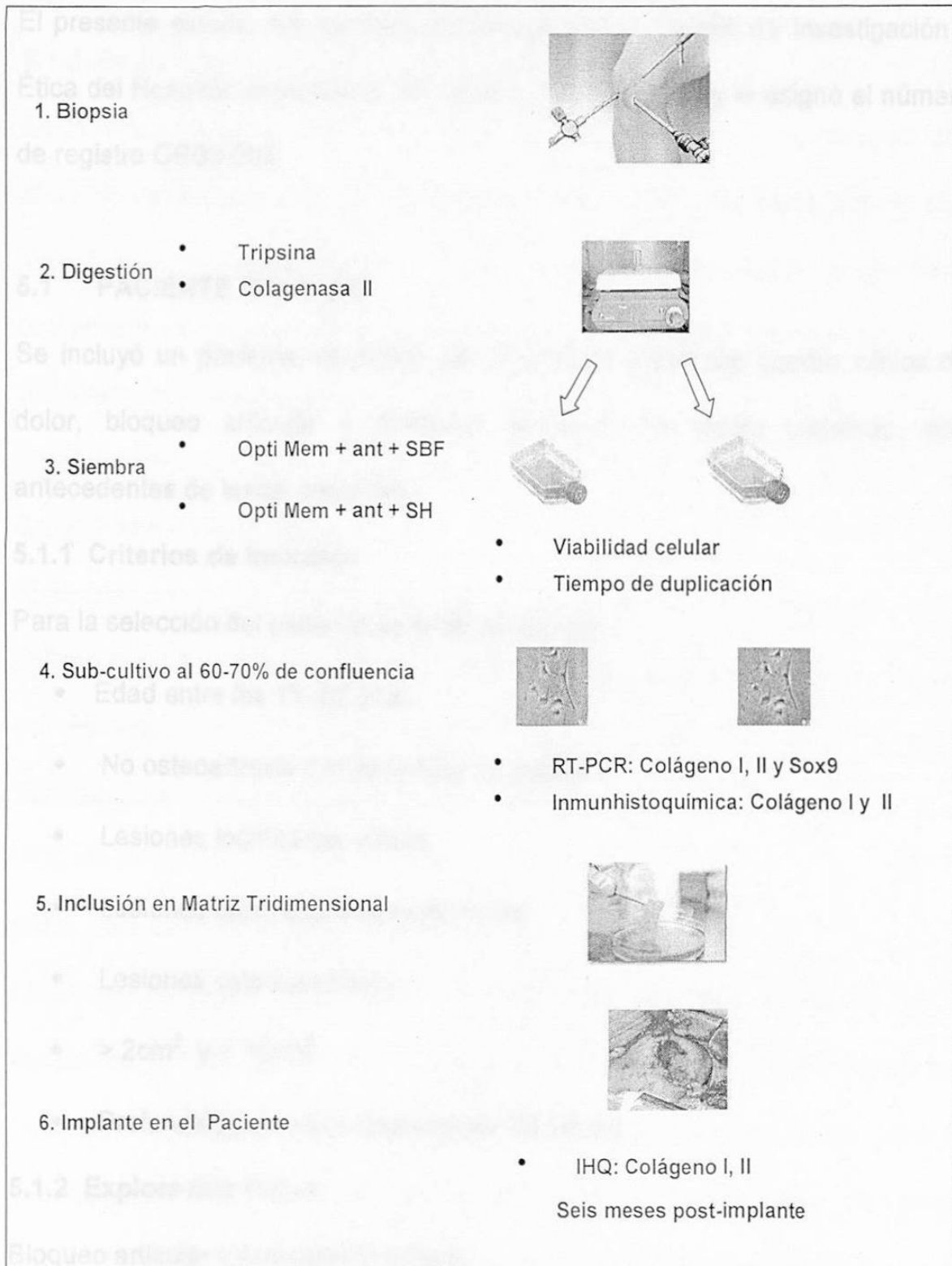


Figura 3. Esquema de la estrategia general.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio fue revisado y aprobado por el Comité de Investigación y Ética del Hospital Universitario "Dr. José E. González" y se le asignó el número de registro OR03-053.

5.1 PACIENTE TRATADO

Se incluyó un paciente masculino de 23 años de edad con cuadro clínico de dolor, bloqueo articular y limitación funcional del tobillo izquierdo, con antecedentes de lesión deportiva.

5.1.1 Criterios de Inclusión

Para la selección del paciente se tomó en cuenta:

- Edad entre los 15 -55 años
- No osteoartrosis o enfermedad reumática
- Lesiones localizadas únicas
- Lesiones condrales de espesor total
- Lesiones osteocondrales
- $> 2\text{cm}^2$ y $< 10\text{cm}^2$
- Profundidad de lesión ósea menor de 10mm

5.1.2 Exploración Física

Bloqueo articular y limitación funcional.

Rangos de movilidad en tobillo derecho:

Dorsiflexión de 15° y flexión plantar de 55°

Rangos de movilidad en tobillo izquierdo:

Dorsiflexión de 9° y flexión plantar de 50°

5.1.3 Radiología

En la radiografía anteroposterior y lateral del tobillo izquierdo, se observó una zona de radiolucidez en el margen externo del domo del astrágalo, lo cual sugirió fractura osteocondral. La resonancia magnética nuclear, proporcionó una imagen de hipointensidad en las secuencias de T2 en el mismo sitio.

5.1.4 Impresión Diagnóstica

Fractura osteocondral en el borde externo del domo del astrágalo izquierdo.

5.1.5 Toma de la Biopsia

Mediante un procedimiento quirúrgico con invasión mínima (artroscopía), utilizando un OATS™ de Artrex® (Karisfeld, Germany) se obtuvo una muestra de cartílago de 8mm de diámetro del surco intercondíleo, zona que normalmente no es sometida a carga.

5.2 TRANSPORTE DE LA BIOPSIA

La biopsia de cartílago se envió al Laboratorio de Ingeniería Tisular del Banco de Hueso y Tejidos, división del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario "Dr. José E. González" en donde se procesó para la expansión y mantenimiento de condrocitos *in vitro*. El transporte de la biopsia se realizó en suero fisiológico suplementado con 0.05mg de gentamicina para la prevención al crecimiento bacteriano.

5.3 CULTIVOS DE CONDROCITOS

Se realizó el cultivo celular utilizando, con algunas modificaciones, la técnica reportada por Visna y col (9). La biopsia de cartilago articular se seccionó en pequeños cubos de aproximadamente 1-3 mm³, en una campana de flujo laminar clase II (SterilGARD® III advance°. THE BAKER COMPANY, Gatehouse Road. Sanford, USA), en todo momento se evitó que la muestra se desecara agregando solución salina Gey's (SIGMA-ALDRICH Inc. St Louis, USA). Los fragmentos de cartilago se colocaron en un vial de 10ml y se trataron con 3ml de tripsina sin EDTA al 2.5% (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. (Grand Island, NY, EUA) durante 30 minutos a 37 °C, se mantuvieron en agitación suave y constante, utilizando una barra y un agitador magnético (Corning, NY, EUA) para mover los fragmentos. Para la digestión de la matriz condral, se trató al cartilago por 90 minutos con colagenasa tipo II (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, NY, EUA), previamente se diluyó 40mg de la enzima en 20ml de solución salina Gey's, y se pasó este volumen por un filtro de disco de 0.22µ (NUNC™ Creek Drive, Rochester, NY). Una digestión enzimática eficaz del cartilago requiere que la mayor superficie posible del tejido sea expuesta a las enzimas. La cantidad de medio de digestión fue proporcional a la cantidad del cartilago a disgregar. La digestión con colagenasa se realizó a 37°C y en agitación continua. Una vez transcurrido el tiempo de digestión de la muestra, se recuperó el sobrenadante y los fragmentos no digeridos fueron sometidos a una nueva digestión con colagenasa tipo II por otros 90 minutos. Las células del sobrenadante fueron sedimentadas por centrifugación (Heraeus, Thermo Electron Corporation.

Ridgefield Court, Asheville, USA) a 1500 rpm por 5 minutos y lavadas varias veces con medio de cultivo para eliminar el resto de colagenasa. Los condrocitos obtenidos, fueron sembrados en frascos de cultivo de 75 cm² (NUNC™ Creek Drive, Rochester, NY) para su crecimiento *in vitro*. El medio empleado fue Opti-MEM (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA) o con 10% de suero humano autólogo (SHA), obtenido de 100ml de sangre periférica del paciente por centrifugación a una velocidad de 2500 rpm durante 10 minutos. A los dos medios se les añadió 0.05 mg de gentamicina. Los cultivos se mantuvieron en una incubadora de CO₂ (New Brunswick Scientific Inc. Talmadge Road Edison, New Jersey, USA) a una atmósfera controlada de 5% de CO₂ y una humedad relativa del 100%. La proliferación de los condrocitos se monitoreó usando un microscopio invertido (ZEISS®, Carl Zeiss. Göttingen, Germany). Cuando los cultivos en monocapa alcanzaron entre el 70-80% de confluencia, se levantaron las células incubándolas con tripsina-EDTA al 0.25% (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA). Después de recibir este tratamiento durante 5 minutos a 37°C, las células se despegaron de la superficie en la que se encontraban adheridas, facilitando su resuspensión en medio de cultivo fresco para posteriormente subcultivarlas a menor densidad de uno a tres frascos, lo que permitió a los condrocitos seguir proliferando (siempre se tuvo cuidado de que la confluencia en las botellas antes del subcultivo no fuera mayor al 70-80%).

5.4 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y VIABILIDAD CELULAR

Para estimar la velocidad de crecimiento y la viabilidad celular, se sembraron condrocitos en placas de 24 pozos (Corning Inc Costar®, Corning, NY, EUA), a una densidad inicial de 30,000 células por pozo. Estas células se levantaron cada 24 horas utilizando tripsina-EDTA, se tiñeron con azul tripano (SIGMA CHEMICAL CO. St, Louis, MO, EUA) y se contaron utilizando una cámara de Neubauer, en un microscopio invertido. Se utilizó la siguiente fórmula para determinar el tiempo de duplicación celular (56, 57).

$$n = \log_{10} N - \log_{10} N_0 / \log_{10} 2$$

En donde:

n = Número de generaciones que ha ocurrido durante la fase exponencial.

N = Número final de células.

N_0 = Número inicial de células.

El tiempo de generación de la fase exponencial se calcula $g = t/n$

= Tiempo total de cultivo / Número de generaciones

5.5 INCLUSIÓN DE LOS CONDROCITOS EN LA FIBRINA

Para incluir a los condrocitos en un medio tridimensional, se utilizó el adhesivo a base de fibrina Tissucol® de Baxter (Viena, Austria). Se siguieron las instrucciones de la casa comercial y previa a la mezcla del fibrinógeno y la trombina, proporcionados en el estuche, se adicionaron los condrocitos para quedar suspendidos en la fibrina, por último, se vertió una gota de este combinado en una caja de Petri con el objetivo de observar la distribución celular, así como también detectar la presencia de Sox 9, y de colágeno tipo I y

Il por medio de IHQ y RT-PCR a diferentes tiempos. El resto de los condrocitos incluidos en el Tissucol®, se vertió en un molde de acrílico de 4 por 5cm, durante 5 minutos, tiempo en el cual se alcanzó el fraguado de la matriz. Después de solidificado, el implante se conservó durante 24 horas a temperatura ambiente, en un frasco estéril con medio sin suero.

5.6 IMPLANTE DE CONDROCITOS AUTÓLOGOS EN EL PACIENTE

El ICA se realizó 24 horas después de la inclusión celular, por medio de una artrotomía realizando osteotomía en libro abierto del extremo distal del peroné logrando la exposición de la zona dañada, se retiró el fragmento osteocondral desprendido y se realizó el curetaje de tejido cicatrizal en el fondo de la lesión. Se retiraron los bordes marginales del cartílago articular circundante al defecto, se realizaron microfracturas en el lecho de la lesión. Se tomó un molde de la morfología del defecto con una plantilla de aluminio y se verificó que éste lo cubriera en su totalidad. Con el molde se realizó el diseño del bioimplante, el cual se fijó con Tissucol® y se tuvo cuidado que sus bordes contactaran con el defecto articular receptor. Se realizó osteosíntesis de la osteotomía del peroné con una placa tercio de caña y tornillos corticales. Se realizó el cierre de la herida quirúrgica por planos y se colocó un vendaje compresivo anti-edema.

5.6.1 Rehabilitación

Se inició con movilidad temprana en el postoperatorio inmediato. Movilidad pasiva de la articulación 8 horas después de la cirugía. La movilidad activa comenzó a las 48 horas. A los 10 días después, se procedió con marcha punta-pie asistida con muletas y con carga progresiva. A las seis semanas, el proceso

se continuó con marcha plantígrada con 75% de carga del peso corporal. El protocolo de rehabilitación concluyó a las 18 semanas retirando las muletas y aplicando carga total.

5.6.2 Toma de Biopsia a los Seis Meses Postimplante

A las 24 semanas postimplante, se retiró la placa tercio de caña de osteosíntesis y los tornillos corticales. En el mismo tiempo quirúrgico, se tomó una pequeña biopsia del borde marginal del implante, en una zona no sometida a carga en el extremo lateral del domo del astrágalo.

5.7 EXTRACCIÓN DE RNA Y RT-PCR

Se obtuvo RNA de cultivos de condrocitos humanos establecidos en monocapa a los 7, 14 y 21 días siguiendo el protocolo de extracción establecido por el estuche de la marca comercial Purescript® de Gentra Systems Inc (Minneapolis, Mn, EUA). Se realizó el mismo procedimiento a una muestra de cartilago sano, así como también al explante de condrocitos humanos incluidos en fibrina a los 7, 14 y 21 días post-inclusión celular. Se utilizaron iniciadores específicos para la detección de colágeno tipo II (240 pb), colágeno tipo I (250 pb) y del factor de transcripción Sox 9 (300 pb), los cuales se diseñaron utilizando el programa de cómputo Vector NTI Viewer 4.0.1 (Informax Inc, Gaithersburg, USA) (tabla 1) a partir de las secuencias reportadas en el GenBank para Sox 9 (>gi|5123454|ref|NP_005336.2|), colágeno I (gi|48762933|ref|NM_000089.3| [4876 2933]) y colágeno II (gi|15149478|ref|NM_033150.1|[15149478]). El estuche empleado para la RT-PCR fue de EPICENTRE® Biotechnologies (Madison, WI, EUA), estas

reacciones se montaron en el termociclador Geneamp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Las condiciones para la amplificación de colágeno I, II y de Sox 9, así como del programa para dichas amplificaciones, se describen en las tablas II y III respectivamente. Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa (Invitrogen™ Life Technologies. Carlsbad, CA, EUA) al 1.5% y las bandas obtenidas se observaron en un transiluminador de rayos ultravioleta (Gel Documentation System 1000, BIORAD).

Tabla I. Oligonucleótidos y productos amplificados.

Primer	Secuencia	Producto	Referencia
Colágeno I	CCCCTCCCCAGCCACAAAGAGTCTA CCACACGTCTCGGTCATGGTACCTG	204	Vector NTI
Colágeno II	GAGGTGGATGCCACACTCAAGTCCCT GCCAGTCTCCATGTTGCAGAAAACCT	203	Vector NTI
Sox 9	AAGATGGCCCAGGAGAACCCCAAG TAATCCTTCATGTGCACCGCCCTG	145	Vector NTI

Tabla II. Condiciones de amplificación para colágeno II y Sox 9.

Componentes Premix 1	Volumen µl	Componentes Premix 2	Volumen µl
H ₂ O	14.5	H ₂ O	18.5
Buffer 20x	2.5	dNTP's	2.0
MgCl ₂ 25 mM	1.5	Primer mix 10 mM	2.5
Master amp	5.0	RNA	2.0
MnSO ₄	1.0		
Retro amp	0.5		
Total	25.0		25.0

Tabla III. Condiciones de amplificación para colágeno I.

Componentes Premix 1	Volumen μ l	Componentes Premix 2	Volumen μ l
H ₂ O	14.0	H ₂ O	19.0
Buffer 20x	2.5	dNTP's	2.0
MgCl ₂ 25 mM	2.0	Primer mix 10 mM	2.5
Master amp	5.0	RNA	1.5
MnSO ₄	1.0		
Retro amp	0.5		
Total	25.0		25.0

Tabla IV. Condiciones de amplificación para la RT-PCR.

Retro-transcripción	60° C	20 minutos
PCR	40 ciclos	
Desnaturalización	95°C	30 segundos
Alineación	60°C	30 segundos
Extensión	72°C	60 segundos
	72°C	4 minutos

5.8 INMUNOFLUORESCENCIA

Esta técnica se llevó a cabo en el Laboratorio de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, en la ciudad de México Distrito Federal, a cargo del Dr. Juan B. Kouri Flores. Muestras de cartílago y de injerto de condrocitos se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS (SIGMA CHEMICAL CO. St, Louis, MO, EUA) pH 7.2 por 2 horas, posteriormente se lavaron tres veces con PBS por dos minutos. Se mantuvieron en sacarosa al 10% en PBS pH 7.2 toda la noche. Después de una serie de lavados por dos minutos en PBS, las muestras se cortaron en un criostato y se colocaron en laminillas previamente lavadas con agua desionizada y desengrasadas con etanol absoluto e incluidas en gelatina al 0.5% con sulfato de potasio crómico al 0.5%, estas laminillas se prepararon con un día de anticipación y se dejaron secar toda la noche. Los cortes se conservaron a -20°C y se hidrataron con PBS pH 7.2 por 10 minutos, se lavaron con PBS-tween (PBS-T) al 0.2% pH 7.2 por 10 minutos. Se bloqueó con albúmina libre de IgG (Invitrogen® Life Technologies. Carlsbad, CA, EUA) de 0.5%-0.2% en PBS-T por 20 minutos a temperatura ambiente. Después de dos lavados durante cinco minutos con PBS-T, se colocaron 50 µl del primer anticuerpo (colágeno I ó colágeno II) de la marca Santacruz Biotechnology Inc (Santa Cruz, CA, EUA), se hicieron diluciones 1:100 en PBS-T y se dejó incubando toda la noche a 4°C. Se lavó tres veces por cinco minutos en PBS-T, se secó el área alrededor de la muestra y se incubaron los anticuerpos secundarios con el fluorocromo en PBS-T (50µl) por dos horas en la oscuridad a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Cada laminilla se lavó tres veces

por cinco minutos con PBS-T y tres minutos con PBS. Se adicionó ioduro de Propidio (IP) a una concentración de 10 mg/ml. Se incubó el IP por cinco minutos cubriendo la laminilla de la luz. Se realizaron tres lavados de un minuto con PBS en agitación suave y se lavaron dos veces por cinco minutos con agua bidestilada (en agitación). Por último se adicionó Vectashield® (Vector Laboratories, Ontario, Canada) como medio protector para evitar la pérdida de la fluorescencia, se colocó un cubre objetos y se sellaron los bordes con barniz para finalmente visualizar los cortes en el microscopio de fluorescencia. Los cortes procesados se almacenaron a -20°C.

5.9 INMUNOHISTOQUÍMICA

El tejido se seccionó en pequeños cubos, estos se fijaron con formol al 10% y se sometieron a deshidrataciones con alcohol etílico a concentraciones crecientes de 85%, 98% y culminando con alcohol absoluto. Se incluyeron en xilol por 10 minutos y se incluyeron en parafina fundida a 60°C. Por último, la pieza se colocó en un molde y los cortes se hicieron con un microtomo (3µ). Se fijaron con albúmina y se incluyeron en xilol por 10 minutos, después se rehidrataron en concentraciones decrecientes de alcohol etílico, es decir, 100%, 98% y 85% (20 inmersiones c/u), el proceso concluyó con recuperación en agua. A continuación, se dirigieron anticuerpos primarios específicos para la detección de colágeno I y para colágeno II (1:50) Abcam plc (Cambridge, MA, EUA) a células establecidas en monocapa, a una muestra de cartílago hialino y al implante de fibrina/condrocitos. Se utilizó el equipo Dako Autostainer (Dako Corporation. Vía Real, Carpinteria, CA), el cual utiliza los reactivos

Dakocytomation Tris-Buffered y DakoTween®20 para los tiempos en incubación y lavados. Como bloqueador se utilizaron 200 µl de H₂O₂, como anticuerpo secundario 200 µl de Link2 HRP (Universal biotinylated secondary antibody, Link, DAKO LSAB®-HRP system), 200 µl de SA2HRP como conjugado (DAKO LSAB®-HRP system) y 200µl de DAB+ como cromógeno/substrato, todos estos reactivos de la marca Dako Corporation (Carpinteria, CA, EUA). El proceso automatizado concluyó en dos horas aproximadamente, posteriormente se realizaron tres lavados con agua y se incubaron por 20 segundos en hematoxilina SIGMA CHEMICAL CO (St, Louis, MO, EUA), para después ser lavados en agua hasta decolorarse por completo. Las laminillas se trataron con alcohol etílico a concentraciones decrecientes (100-70%) hasta terminar en xilol por 10 minutos, se fijaron con Entellan® Merck (Darmstadt, Germany). Se colocaron los cubre objetos y se observaron en un microscopio invertido adaptado a un sistema de cómputo para capturar las imágenes.

CAPÍTULO VI

RESULTADOS

Se estableció el cultivo primario de condrocitos autólogos utilizando para su crecimiento un medio suplementado con suero bovino fetal y otro con suero humano, ambos al 10%. El seguimiento de los cultivos durante la etapa de propagación fue mediante microscopía de luz, y se pudieron observar las características morfológicas típicas de fibroblastos en los condrocitos adheridos al frasco de cultivo (figura 4).

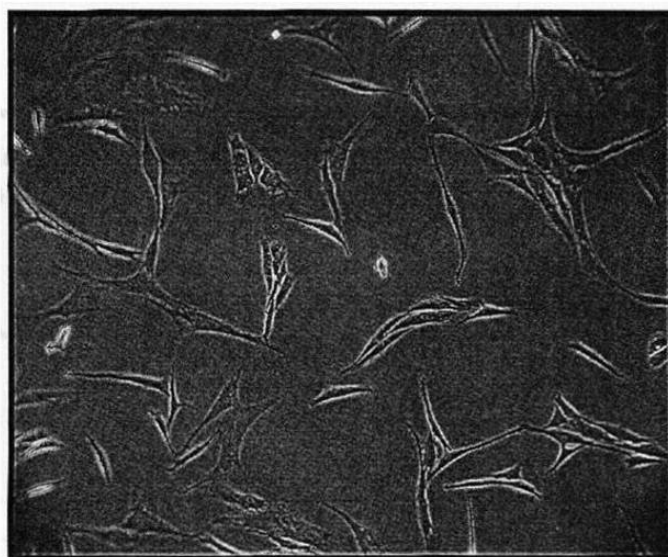


Figura 4. Condrocitos cultivados en monocapa. Se observa una morfología característica de fibroblastos.

En la curva de crecimiento no se encontró diferencia significativa entre los cultivos suplementados con suero bovino fetal y con suero humano (figura 5), el tiempo de duplicación celular fue de 2.11 días para los cultivos con suero humano y de 2.13 días para suero bovino fetal. La viabilidad se mantuvo entre

el 90 y 93% hasta por un período de 15 días en ambos tipos de cultivo (figura 6).

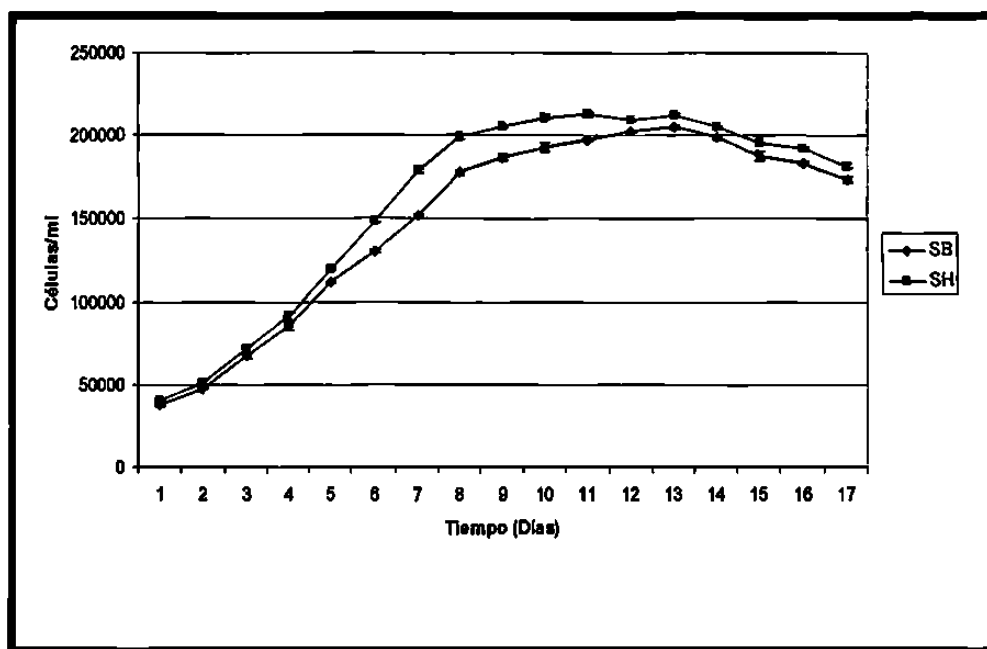


Figura 5. Curva de crecimiento celular. No se observó diferencia significativa entre el SBF y el SHA como suplemento en el medio de cultivo.

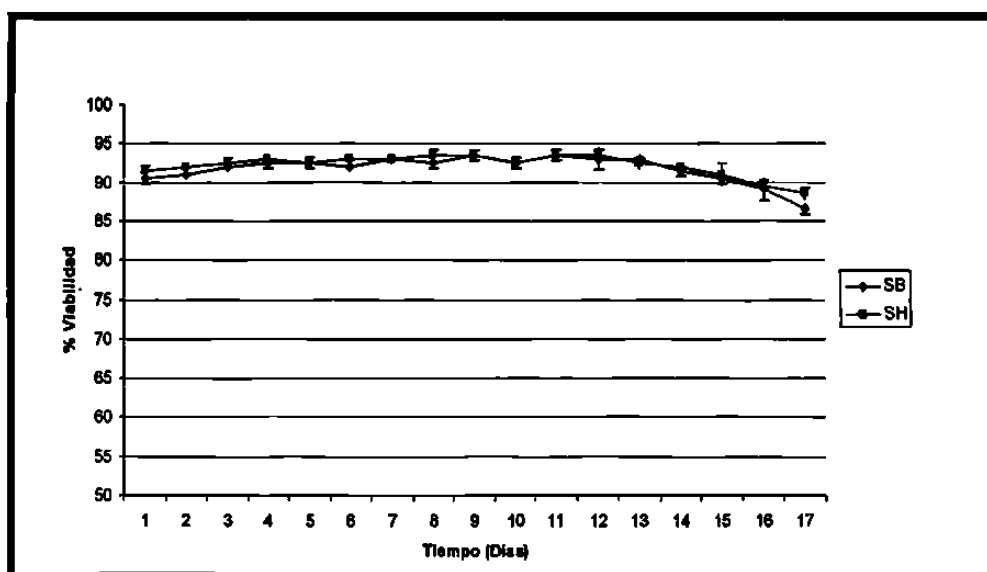


Figura 6. Porcentaje de viabilidad celular. Viabilidad entre 90-93% en un período de 15 días.

Cuando se estimó un 80% de confluencia, las células se levantaron con tripsina-EDTA 0.25%, se contaron en una cámara de Neubauer mediante el método de azul tripano y se subcultivaron en tres fracciones para favorecer la propagación celular y el establecimiento de nuevos cultivos, con el objetivo final de obtener 15 millones de células. Se realizaron pruebas microbiológicas para asegurar que los cultivos no tenían contaminación. Este número de condrocitos se alcanzó en 26 días y en 15 frascos de cultivo de 75 cm², posteriormente, las células se incluyeron en la matriz tridimensional de fibrina, la cual se vertió en un molde, en donde fraguó después de cinco minutos resultando un implante de condrocitos autólogos (figura 7).

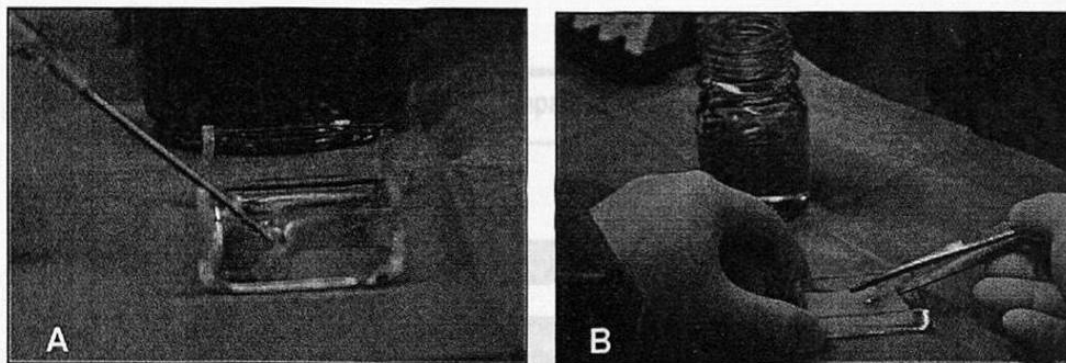


Figura 7. Generación del bioimplante de condrocitos. **A.** Vaciado de la mezcla fibrina/condrocitos en el molde. **B.** Fraguado de la mezcla.

Durante la inclusión celular en el adhesivo comercial a base de fibrina, los condrocitos se distribuyeron hacia diferentes niveles y en toda la matriz, observando también la migración de muchos de ellos hacia la caja de cultivo, estableciéndose en monocapa, en donde continuaron con su división (figura 8).

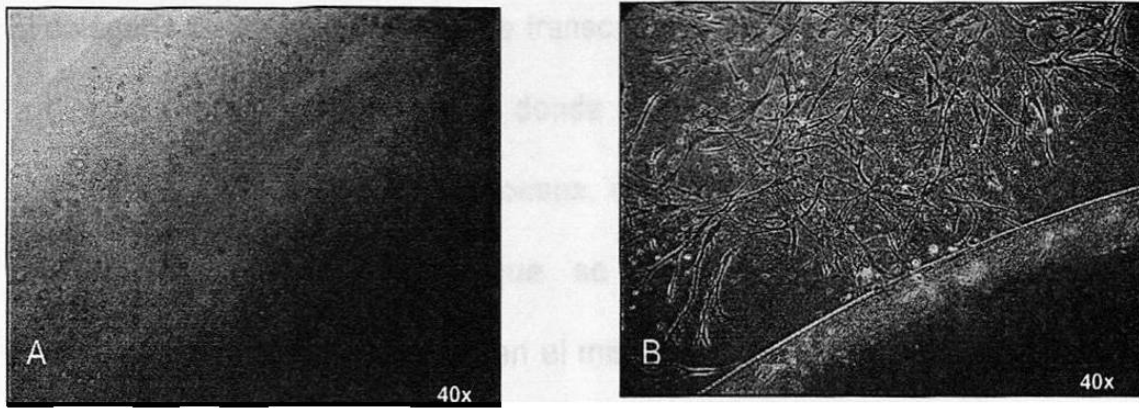


Figura 8. Migración celular. Muchas de las células incluidas en la fibrina se establecieron en monocapa. **A.** Condrocitos incluidos en fibrina. **B.** Migración celular a una semana post-inclusión.

Los resultados de la RT-PCR cualitativa para los cultivos en monocapa y de las células incluidas en la matriz de fibrina a los 7, 14 y 21 días, así como de una biopsia de cartílago articular, se señalan en la figura 9.

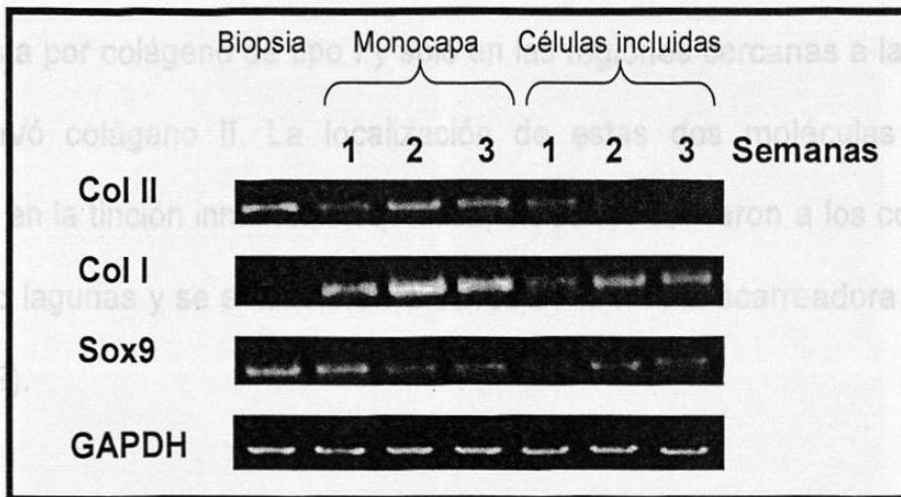


Figura 9. Expresión de colágenos I, II y de Sox 9. Amplificación a partir de una biopsia de cartilago articular, de condrocitos cultivados en monocapa e incluidos en fibrina. Los diferentes tiempos de amplificación, corresponden a las células cultivadas *in vitro*.

El colágeno de tipo II y el factor de transcripción Sox 9, estuvieron presentes en la biopsia de cartílago hialino, en donde no se observó el colágeno tipo I. Los condrocitos establecidos en monocapa, desde la primera semana expresaron colágeno tipo I, sugiriendo que se encontraban en un proceso de dediferenciación. Sin embargo, en el mismo cultivo, estas células continuaron expresando colágeno tipo II y el factor Sox 9. En el tiempo durante el cual, los condrocitos permanecieron incluidos en la fibrina, fue más apreciable el colágeno I. No obstante, también se pudo distinguir el factor Sox 9 y el colágeno de tipo II. Estos resultados se comprobaron mediante inmunofluorescencia, en donde se detectó la presencia de Colágeno I y II (figura 10) en las células en monocapa. La técnica reveló la extensión de la matriz sintetizada por los condrocitos incluidos en la fibrina (figura 11), la cual en su mayoría estaba compuesta por colágeno de tipo I y sólo en las regiones cercanas a las lagunas se observó colágeno II. La localización de estas dos moléculas fue más evidente en la tinción inmunohistoquímica, en donde rodearon a los condrocitos formando lagunas y se extendieron a través de la matriz acarreadora de fibrina (figura 12).

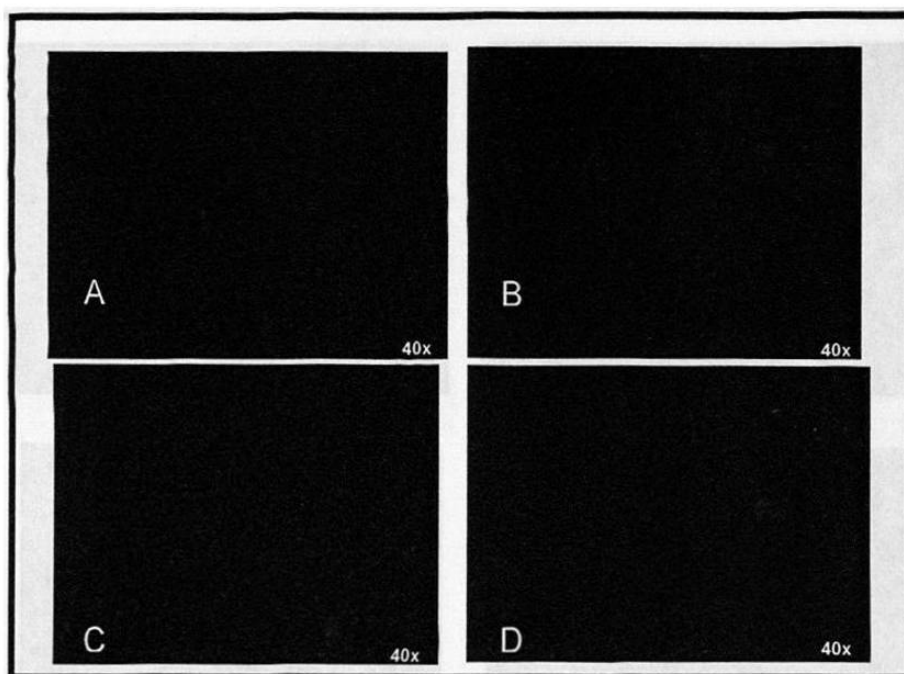


Figura 10. Inmunofluorescencia para células en monocapa. Cultivos primarios de una semana. Los controles negativos se incubaron sin sus respectivos anticuerpos primarios. **A.** Control negativo para colágeno I. **B.** Presencia de colágeno I en el cultivo primario. **C.** Control negativo para colágeno II. **D.** Detección de colágeno II en condrocitos establecidos en monocapa.

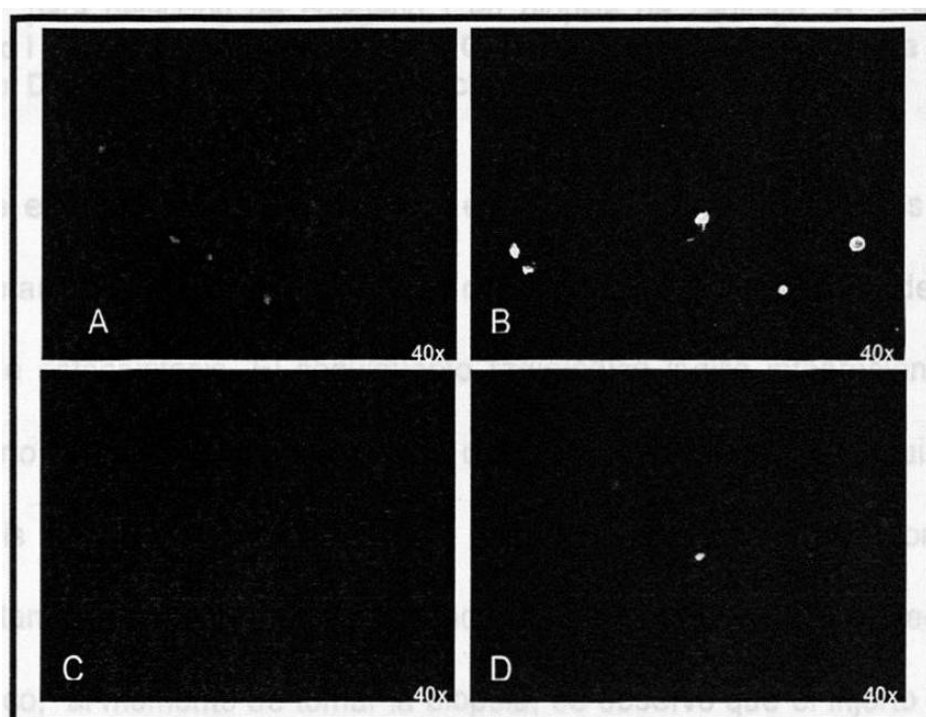


Figura 11. Inmunofluorescencia para células incluidas en fibrina. Cultivos primarios de una semana. **A.** Ausencia de colágeno I en la biopsia de cartílago. **B.** Presencia de colágeno I en células incluidas en fibrina. **C.** Colágeno II en la biopsia. **D.** Colágeno II en condrocitos incluidos en fibrina.

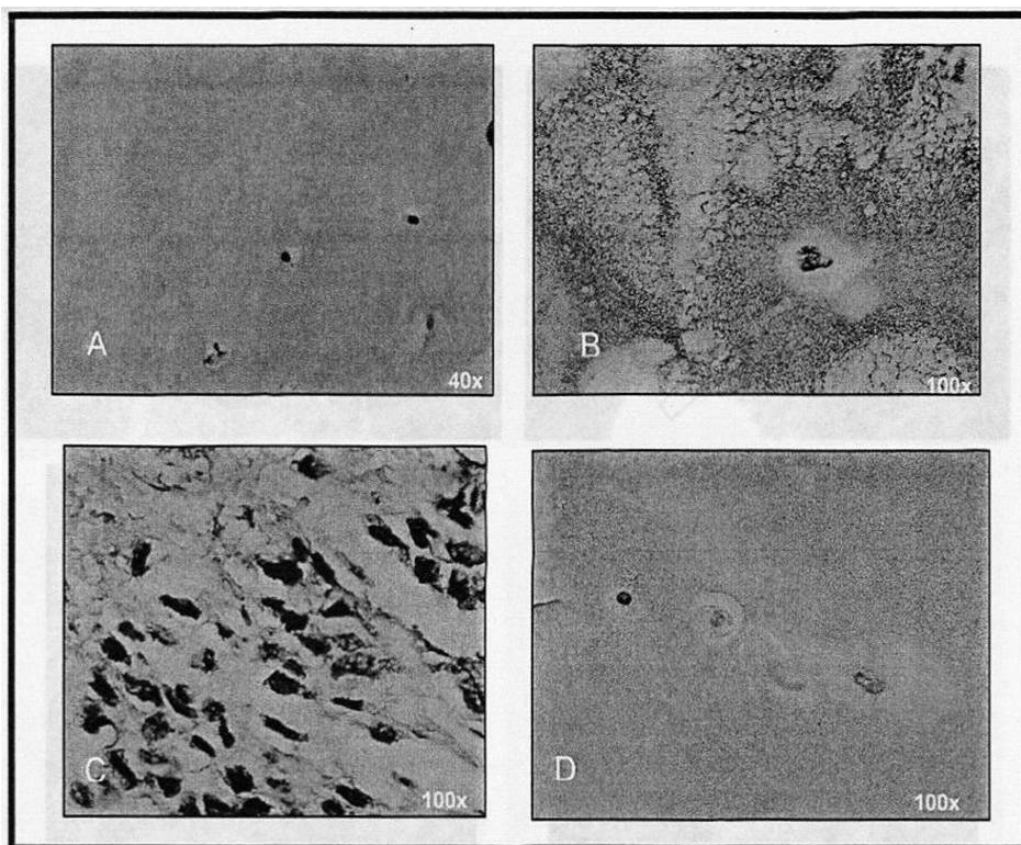


Figura 12. Inmunohistoquímica para células incluidas en fibrina. Cultivos primarios de una semana. Se observa la extensión de la MEC sintetizada por los condrocitos. A. Tinción para detección de colágeno I en biopsia de cartílago. B. Presencia de colágeno I en células incluidas en fibrina. C. Detección de colágeno II en la biopsia de cartílago. D. Colágeno II en condrocitos incluidos en la matriz de fibrina.

Durante el proceso de rehabilitación, el paciente refirió dolor en las primeras dos semanas, pero sólo en el extremo distal del peroné, sitio en donde se fijó la placa de osteosíntesis. El seguimiento radiológico indicó integración evidente del injerto con el cartílago circundante desde la sexta semana postquirúrgica. A los seis meses postimplante, el paciente se mostró asintomático y completamente reincorporado a sus actividades cotidianas. En el seguimiento quirúrgico, al momento de tomar la biopsia, se observó que el injerto tenía una apariencia macroscópica de cartílago, además de buena reparación en la zona de la lesión, así como una buena integración con el cartílago circundante (figura 13).

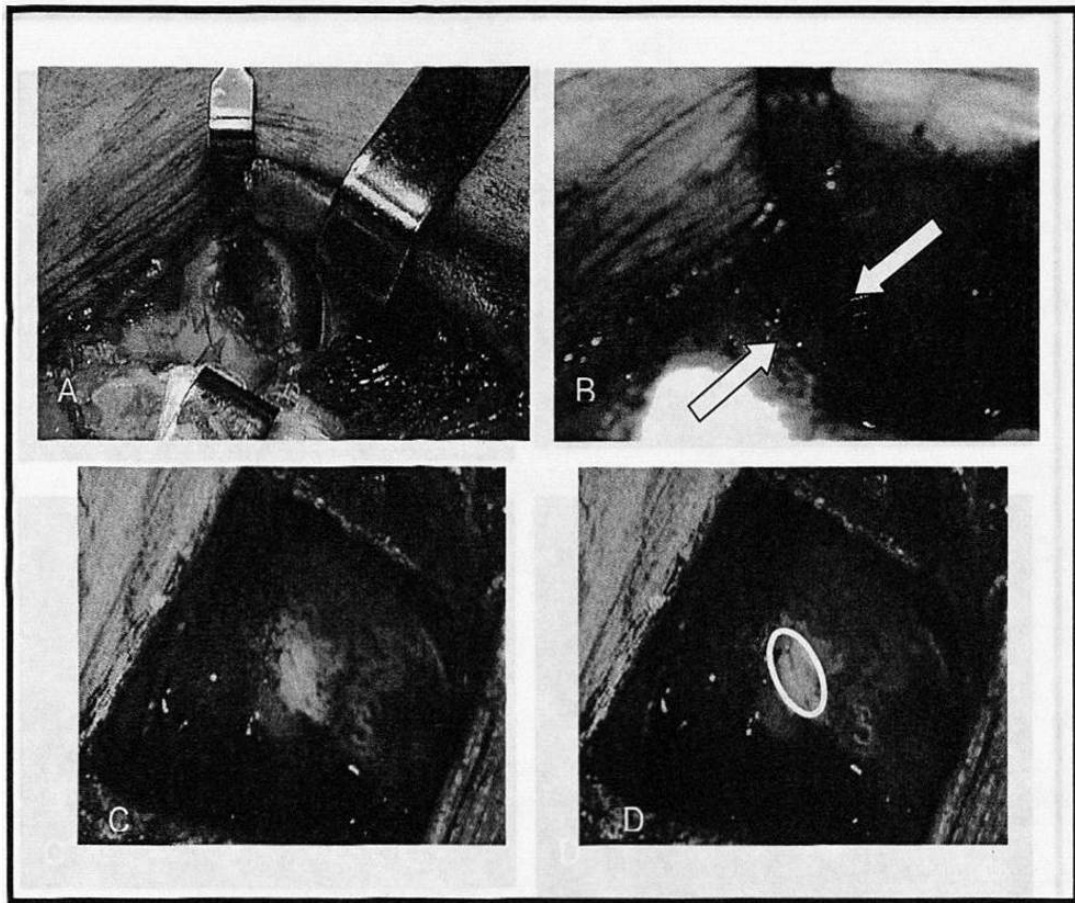


Figura 13. Seguimiento seis meses post-implante. **A.** Lesión de espesor completo endomo del astrágalo. **B.** Las flechas indican la posición del bioimplante ocupando la lesión. **C.** Área regenerada a seis meses post-implante. **D.** El círculo indica la zona de integración con el cartilago hialino circundante, mismo sitio en donde se tomó la biopsia.

En la tinción inmunohistoquímica de la biopsia tomada en el borde externo y no sometido a carga del implante, no se apreció colágeno tipo II, pero si se observó que los condrocitos sintetizaron colágeno de tipo I, al menos en esta zona del bioimplante (figura 14).

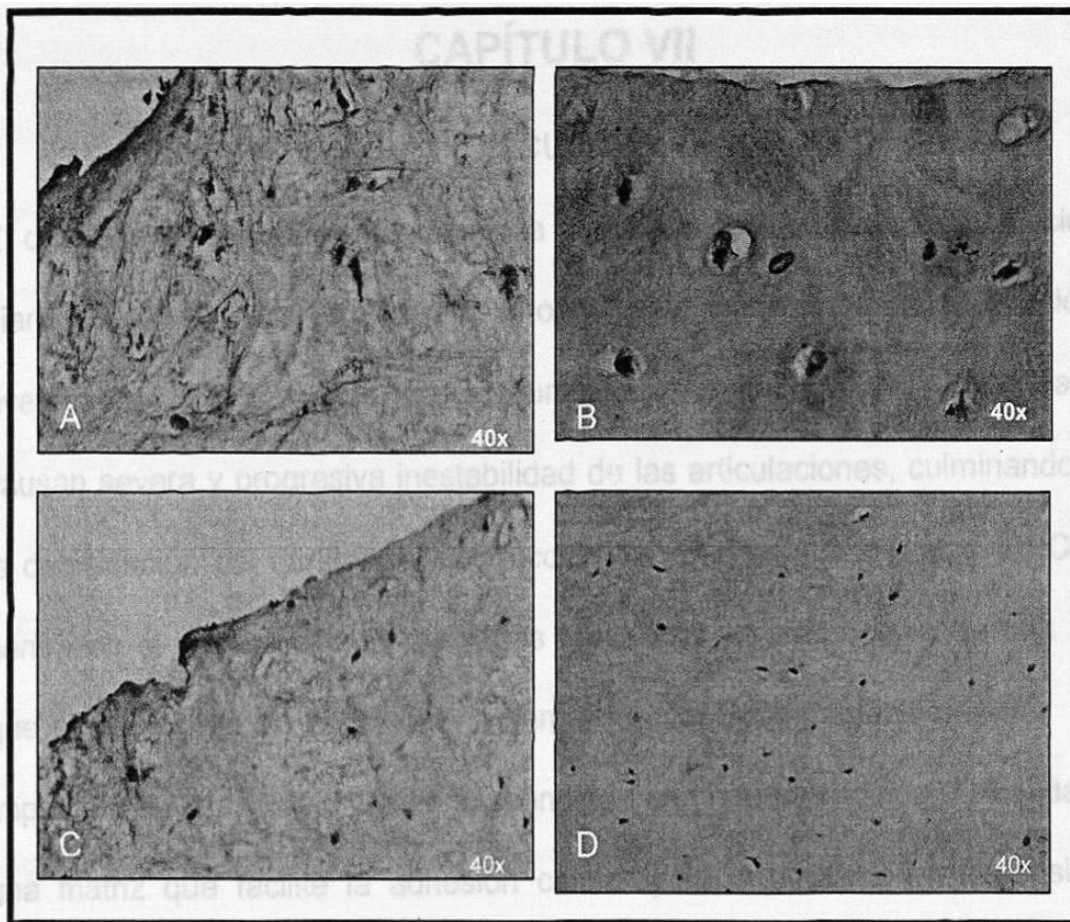


Figura 14. Inmunohistoquímica seis meses post-implante. Tinción de biopsia tomada de una zona del injerto no sometida a carga. **A y C.** Detección de colágeno tipo I en la biopsia tomada al paciente. **B y D.** Tinción para colágeno II en la biopsia seis meses post-implante. No se observó colágeno II.

CAPÍTULO VII

DISCUSIÓN

El cartílago hialino es esencial para la adecuada función de las articulaciones diartrodiales del cuerpo humano. Posee baja capacidad de reparación y eventualmente, algunas lesiones traumáticas y osteoartíticas degenerativas causan severa y progresiva inestabilidad de las articulaciones, culminando con la degradación del cartílago y destrucción de la superficie articular. El ICA se centra en el uso de células autólogas obtenidas por artroscopia de una zona que normalmente no se somete a carga, las cuales se cultivan *in vitro* y se implantan en el paciente ya sea suspendidas en un medio líquido o incluidas en una matriz que facilite la adhesión celular y la organización tridimensional, permitiendo rellenar el defecto con cartílago hialino formado por los condrocitos autólogos implantados. Schulze y colaboradores, incluyeron en alginato condrocitos cultivados en monocapa de hasta cuatro pasajes, observaron que estas células producían MEC, colágeno tipo II y proteoglicanos específicos de cartílago, en contraste con aquellos condrocitos que recibieron de cinco a ocho pasajes, los cuales no sintetizaron estos materiales cuando fueron cultivados en alginato (58). En el presente trabajo, se modificó la técnica desarrollada por Visna y colaboradores (9), realizando de uno a dos pasajes, para obtener 15×10^6 células en 26 días, hecho que podría asegurar que los condrocitos todavía mantengan su capacidad de rediferenciación al ser incluidos en una matriz acarreadora. En los últimos años, ha existido una tendencia definida en la utilización de suero autólogo como suplemento al medio de cultivo (9, 59, 60,

61). Roberts y colaboradores (61) reportaron el seguimiento post-implante de 3 pacientes tratados con ICA utilizando SBF y 20 pacientes tratados con suero autólogo. En ambos cultivos encontraron cartílago hialino en períodos de 20 a 30 meses, fibrocartílago en 12 meses y una mezcla entre ambos (fibro-hialino) en el mismo período de tiempo. En el presente estudio, los condrocitos autólogos incluidos en una matriz de fibrina implantados, se suplementaron con SHA. Al comparar el efecto del SBF contra SHA, no se encontró diferencia significativa en los parámetros celulares evaluados, ya que el tiempo de duplicación celular fue de 2.11 días para los cultivos con suero humano y de 2.13 días para suero bovino fetal. La viabilidad se mantuvo entre el 90 y 93% hasta por un período de 15 días en ambos tipos de cultivo. No se descarta el uso de SBF como suplemento al medio de cultivo, siempre y cuando provenga de países que estén libres de enfermedades de origen priónico y que los pacientes no sean alérgicos a las proteínas presentes en el SBF. Los condrocitos articulares, se encuentran distribuidos dentro de la MEC que principalmente consiste en fibras de colágeno, proteoglicanos y proteínas no colágenas. Cuando son aislados mediante digestiones enzimáticas y mantenidos en sistemas de cultivo en monocapa, la expresión biosintética de los condrocitos cambia hacia un fenotipo similar a fibroblastos. De manera especial, se sintetiza colágeno I y el factor de transcripción Sox 9 es regulado de manera negativa, lo cual es importante debido a que activa un potenciador para la cadena $\alpha 1$ de colágeno tipo II influyendo de manera directa sobre la expresión de esta molécula. Sox 9, además de intervenir en el desarrollo de células condroprogenitoras, también se expresa en gónadas masculinas, tejidos

neuronales, corazón e hígado (62, 63). Nuestros resultados coinciden con los de diferentes autores que señalan la expresión continua de colágeno tipo II y de Sox 9 en monocapa hasta 21 días (41, 64). Girotto y colaboradores (63) realizaron de 1 a 8 pasajes en condrocitos cultivados en monocapa que posteriormente se incluyeron en alginato y demostraron que solo las células de hasta 4 pasajes expresaron colágeno tipo II y Sox 9. Análisis inmunohistoquímicos realizados a condrocitos cultivados en monocapa, han demostrado la presencia de colágeno I, así como una disminución de colágeno II conforme progresan el número de pasajes y los días en cultivo (62, 64). Después de una semana en monocapa, en este estudio, se detectó que ambos tipos de colágeno estaban presentes en las células. Respecto a la extensión de la matriz sintetizada por los condrocitos, tras una semana de haber sido incluidos en la fibrina, se observó que la señal para colágeno tipo I fue más intensa que la del colágeno tipo II y que ambas moléculas formaban nódulos alrededor de las células. Resultados similares han sido reportados por diferentes autores, en los cuales, los condrocitos fueron incluidos en alginato (58, 63). Los primeros implantes se realizaron con células en suspensión (7), las complicaciones que se han presentado en algunos casos son hipertrofia del parche de periostio (7-9 meses), fuga celular, falta de integración y desprendimiento total (1), además de una probable distribución no uniforme de los condrocitos, debido a que al ser incluidos a la lesión en un medio de transporte líquido, podrían precipitar por gravedad hacia una zona en particular. En respuesta a estas limitantes, la ingeniería de tejidos ha diseñado métodos acarreadores de células para recrear las estructuras tridimensionales como las

presentes en el cartílago, con el objetivo de reemplazar un tejido dañado (65). Estos soportes deben ser biocompatibles y deben degradarse gradualmente, en la medida que las células secreten su propia matriz extracelular, permitiendo una óptima integración entre el tejido existente y el tejido nuevo formado. También deben permitir la distribución tridimensional de los condrocitos, prevenir la pérdida total de su fenotipo, expresando sus moléculas de MEC, esto una vez que han sido implantados (66). De los 23 pacientes a los que se les dio seguimiento, Roberts y colaboradores (61), encontraron que siete de ellos presentaron fibrocartilago rellenando la lesión a los 12 meses postimplantación. También demostraron que solamente cinco pacientes, tenían cartilago hialino en esta zona y que este hallazgo fue evidente hasta un período de tiempo que varió entre 19.8 ± 11.2 meses. Otra observación fue que en 11 pacientes, existía cartilago de tipo fibro-hialino cubriendo la lesión en un tiempo intermedio, lo que sugiere que los condrocitos sufren un proceso de rediferenciación en períodos prolongados, este grupo de investigadores utilizó un medio líquido como material acarreador para estas células del cartilago articular. Informes similares fueron demostrados por Tins y colaboradores (67) en donde 25 de 39 pacientes mostraron fibrocartilago como material de reparación, 10 fibro-hialino y únicamente cuatro de ellos tenían cartilago hialino en el área comprometida, estos resultados corresponden a 12 meses post-operación y al mismo medio líquido. Para evitar las desventajas antes mencionadas que conlleva utilizar un parche de periostio como barrera de contención para los condrocitos resuspendidos inyectados, la estrategia actual es la de incluir a los condrocitos en medios viscosos que mantengan

distribuidas y suspendidas a estas células, Maracci y colaboradores (8) trataron 21 pacientes con ICA a los cuales se le dio seguimiento artroscópico para valorar una matriz tridimensional hecha a base de ácido hialurónico, ellos encontraron que en cuatro pacientes de 12 a 24 meses post-operación, había fibrocartilago y que seis de ellos tenían cartilago fibro-hialino ocupando la zona de la lesión de 10 a 18 meses. La presencia de cartilago hialino fue evidente en 11 pacientes de 12 a 18 meses. Visna y colaboradores (9) reportaron a cuatro pacientes con ICA utilizando como medio de transporte celular el Tissucol, el cual es un adhesivo de fibrina, que tiene la propiedad de suspender a los condrocitos en diferentes niveles y de adherirse al tejido sano adyacente. Sus hallazgos corresponden a un período comprendido entre tres y cinco meses post-operación, en ellos mencionan la presencia de fibrocartilago en dos pacientes y cartilago de tipo hialino en los dos restantes. En este estudio, a seis meses post-implantación de condrocitos autólogos resuspendidos en el mismo adhesivo fibrina en un paciente, encontramos predominantemente colágeno de tipo I y prácticamente no se detectó colágeno de tipo II en la biopsia tomada en una zona marginal del injerto. Sin embargo, es alentador que el paciente tratado con ICA y reportado en el presente trabajo se encuentre asintomático desde los cuatro meses posteriores a la intervención quirúrgica y completamente reincorporado a sus actividades diarias, por lo que puede decirse que su evolución clínica ha sido satisfactoria. Los resultados de los autores antes mencionados sugieren que, al incluir a los condrocitos en un medio tridimensional, podrían sintetizar MEC rica en colágeno tipo II en períodos más cortos, en comparación a los trabajos en los que se han inyectado las células

cartilaginosas en medios líquidos y que estas células del cartílago articular, sufren un proceso de adaptación en donde la capacidad de rediferenciación celular dependerá de factores como la edad del paciente, así como de un adecuado programa de rehabilitación postoperatorio que estimule a los condrocitos a producir las moléculas que le confieren sus propiedades biomecánicas características. Los tiempos en los que estos autores han evaluado la calidad del tejido cartilaginoso, oscila entre los 12 y los 24 meses post-quirúrgicos, exceptuando a Visna y colaboradores, los cuales realizaron esta valoración de tres a cinco meses post-intervención. Por lo que consideramos que es necesario contar con un número mayor de pacientes implantados para poder valorar el tipo de matriz sintetizada por los condrocitos incluidos en la fibrina y que se requiere de un tiempo más largo para determinar si hay formación de cartilago hialino. Estas técnicas de ingeniería celular representan una conexión para la aplicación de las ciencias básicas en el tratamiento de problemas clínicos relacionados con la disfunción articular.

CAPÍTULO VIII

CONCLUSIONES

Reducir el número de pasajes de los condrocitos en cultivo, mantuvo la expresión continua de colágeno tipo II.

La inclusión de condrocitos en soportes de fibrina puede proporcionar un micro ambiente favorable para la síntesis de matriz extracelular.

Se requiere de un período más prolongado, así como de un mayor número de pacientes, para hacer una evaluación del injerto implantado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brittberg M, Peterson L, Sjorgen-Jansson E, Tallheden T, Lindhal A. Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85A (3):109-115
2. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund E, Lindhal A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *The American Journal of Sports Medicine* 2002; 30(1):2-12
3. Koulalis D, Schultz W, Heyden M: Autologous chondrocyte transplantation for osteochondritis dissecans of the talus. *Clin Orthop Relat Res* 2002; 395: 186-192
4. Minas T, Nehrer S: Current concepts in the treatment of articular cartilage defects. *Orthopedics* 1996; 20: 525-538
5. Falke GF, Atala A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch Argent Pediatr* 2000; 98(2):103-115
6. Smith AV. Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals. *Nature* 1965; 205: 782-784
7. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L.. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-895
8. Maracci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, Kon E, Pederzini L., Rosa D, Sacchetti GL, Stefani G, Zanasi S. Articular cartilage engineering with Hyalograft® C. 3 year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005; 435: 96-105
9. Visna P, Pasa L, Hart R, Kocis J, Cizmar I, Adler J. Treatment of deep chondral defects of the knee using autologous chondrocytes cultured on a support: results after one year. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2003; 70(6):356-62
10. Latarjet M, Ruiz L. Anatomía humana. 3 ed. México, DF: Editorial Médica Panamericana 1996; 2:2001-16
11. Buford WL, Ivey FM, Malone JD, Patterson RM, Peare GL, Nguyen DK, Steward AA. Muscle balance at the knee-moment arms for the normal knee and the ACL-Minus knee. *IEEE Transact Rehabil Engin* 1997; 5(4):12-7

12. Kuitinen S, Komi PV, Kyrolinen H. Knee and ankle joint stiffness in sprint running. *Med Sci Sports Exerc* 2002; 34(1):166-73
13. Góngora-García LH, Rosales-García CM, González-Fuentes I, Pujals-Victoria N. Articulación de la rodilla y su mecánica articular. [artículo en línea] *MEDISAN* 2003; 7(2). http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol7_2_03/san13203.htm [consulta: ENE 2006]
14. Guiraldes H, Oddó H, Paulós J, Huete I. Anatomía clínica de la rodilla. http://www.puc.cl/sw_educ/anatclin/anatclinica/index.html [consulta: ENE 2006]
15. Buckwalter J.A, Martin J. Degenerative joint disease. Anatomy and physiology of synovial joints. *Clinical Symposia, Ciba* 1995; 47 (2): 3-11
16. Kippers V., Joint structure, motion and lubrication. <http://www.uq.edu.au/~anvkippe/pt811/jntlub.html#Lubrication>. [consulta: ENE 2006]
17. Archer CW, Morrison H, Pitsillides AA. Cellular aspects of the development of diarthrodial joints and articular cartilage. *J Anat* 1994; 184:447-456
18. Eyre DR. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002; 4:30-5
19. Lockhart RD, Hamilton GF, Fyfe FW. Anatomía humana. Primera reimpresión al español. McGraw-Hill Interamericana 1965. 18-21, 121-124
20. Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA. Interactions of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* 1994; 302:527-34.
21. Davies DV, Palfrey AJ. The fine structure of normal and rheumatoid synovial membrane. *Mod. Trends Rheumatol* 1971; 2: 1-20.
22. Vega-Álvarez JA, García-Suarez O, Fernández-Monjil D, Del Valle-Soto M. Bioquímica y biología del cartílago articular. *Rev Ortop Traumatol* 2002; 5:391-400
23. Poole CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat* 1997; 191:1-13
24. Fischer AE, Carpenter TA, Tyler JA, Hall LD. Visualization of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular

- cartilage by magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 1995; 13:819-26
25. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med* 1998; 76:275-88
 26. Buckwalter JA, Pita JC, Müller FJ, Howell DS. Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates. *J Orthop Res* 1994; 12:144-8
 27. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *AAOS Instr Course Lect* 1998; 47:477-86
 28. Cawston TE. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacol Ther* 1996; 70:163-82
 29. Close DR. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 2001; 60 (3):62-7
 30. Chopra R, Anastassaiades T. Specificity and synergism of polypeptide growth factors in stimulating the synthesis of proteoglycans and a novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures. *J Rheumatol* 1998; 25:1578-84
 31. Keyszer GM, Lee AH, Gay S. Cytokines and oncogenes in cellular interactions of rheumatoid arthritis. *Stem Cells* 1994; 12:75-86
 32. Malesud CJ. The role of growth factors in cartilage metabolism. *Reum Dis Clin North Am* 1993; 19:569-80
 33. Winslow JA., Cole BJ. Cartilage restoration, part 1. *Ame J Sport Med* 2005; 33 (2): 295-305
 34. Brinker MR. Joints, section 2, in "Review of orthopaedics", 3^a ed. Miller MD, Brinker MR. WB.Saunders 2000; 40-48.
 35. James CB, Uhl TL. A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. *Journal of Athletic Training* 2001; 36 (4): 413-419
 36. Tomford WW, Fredericks GR, Menkin HJ. Studies in cryopreservation of articular cartilage chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 1984; 66: 253-259

37. Bassleer C, Gysen P, Foidart JM, Bassleer R, Franchimont P. Human chondrocytes in tridimensional culture. *In vitro Cell Dev Biol* 1986; 3 (1):113-119
38. Shachar NS, Nagao M, Mitsuyama T, McAllister D, Ishii S. Metabolic and biochemical status of articular cartilage following cryopreservation and transplantation: A rabbit model. *J Orthop Res* 1992; 10: 6034-609
39. Guo JF, Jourdain GW, MacCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Connect Tissue Res* 1989; 19 (2-4):277-297
40. Ochi M, Adachi N, Nobuto H, Yanada S, Ito Y, Agung M. Articular cartilage repair using tissue engineering technique—novel approach with minimally invasive procedure. *Artificial Organs* 2004; 28 (1): 28-32
41. Murphy CL, Polak JM. Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. *J Cell Physiol* 2004; 199(3):451-9
42. Brodtkin KR; García AJ, Levenston ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials* 2004; 25: 5929-5938
43. Lombello C, Marins dos Reis G, Cohen M. Study on human chondrocyte culture viability for autologous transplantation in clinical application. *Einstein* 2003; 1: 84-88
44. Ng LJ, Wheatley S, Muscat GE, Conway-Campbell J, Bowles J, Wright E. SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* 1997; 183:108-21
45. Zhao Q, Eberspaecher H, Lefebvre V, de Crombrughe B. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Dev Dyn* 1997; 209:377-86
46. Xie, W.F., Zhang, X., Sakano, S., Lefebvre, V., and Sandell, L.J. Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9. *J Bone Miner Res* 1999; 14: 757-763
47. Sekiya, I., Tsuji, K., Koopman, P., Watanabe, H., Yamada, Y., Shinomiya, K., Nifuji, A., and Noda, M. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is upregulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* 2000; 275: 10738-10744

48. Couceiro-Follente J, Carpintero-Arias P, Silva-Rivera MT. Cultivo de condrocitos. *Ver Ortop Traumatol* 2002; 5: 436-443
49. LaPrade RF. Autologous chondrocyte implantation was superior to mosaicplasty for repair of articular cartilage defects in the knee at one year. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85(11): 2259 - 2259 ..
50. Perka C, Spitzer RS, Lindenhayn K, Sittlinger M, Schultz O. Matrix-mixed culture: New methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *Biomed Mater Res* 2000; 49: 305-311
51. <http://www.fda.gov/cber/label/label.htm> [consulta: MAR 2006]
52. <http://www.fda.gov/cber/approvtr/autogen082297L.htm> [consulta: MAR 2006]
53. Jockenhoevel S, Zund G, Hoestrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, Messmer BJ, Turina M. Fibrin gel-advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2001; 19:424-430
54. Bolliger-Stucki Bm, Baillod P, Mäder W, Furlan M. Biochemical properties of the fibrinogen component of a fibrin glue before and after severe dry heat treatment. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2000; 53: 577-583
55. http://www.salud.gob.mx/unidades/dgcs/sala_noticias/comunicados/2002-02-07-016-DISCAPACIDAD-EN-10-MILLONES-DE-MEXICANOS.htm [consulta: MAR 2006]
56. <http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/crecimmicrob.pdf> [consulta: MAR 2006]
57. [www.unap.cl/csmar/MicrobMed/QYF CLASE 2.pdf](http://www.unap.cl/csmar/MicrobMed/QYF_CLASE_2.pdf) [consulta: MAR 2006]
58. Shulze-Tanzil G, de Souza P, Villegas H, John T, Merker HJ, Scheid A, Shakibaei M. Redifferentiation of dedifferentiated human chondrocytes in high-density cultures. *Cell Tissue Res* 2002; 308:371-379
59. Bentley G, Minas T. Treating joint damage in young people. *BMJ* 2000; 320(7249):1585-8
60. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation. Results at two to ten years. *J Bone Joint Surg* 2003; 85:17-24
61. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, Richardson JB. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair:

monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther* 2003; 5:60-73

62. Zaucke F, Dinser R, Maurer P, Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *Biochem J* 2001; 358: 17-24
63. Girotto D, Urbani S, Brun P, Renier D, Barbucci R, Abatangelo G. Tissue-specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds. *Biomaterials* 2003; 24:3265–3275
64. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, de Souza P, John TM, Shakibaei. Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient shc-erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis & Cartilage* 2004; 12: 448-458
65. Sgaglione NA. Biologic approaches to articular cartilage surgery: future trends. *Orthop Clin North Am.* 2005; (4):485-95. Review.
66. Randolph MA, Anseth K, Yaremchuk MJ. Tissue engineering of cartilage. *Clin Plast Surg.* 2003; (4):519-37. Review
67. Tins BJ, McCall IW, Takahashi T, Cassar-Pullicino V, Roberts S, Ashton B, Richardson J. Autologous chondrocyte implantation in knee joint: MR imaging and histologic features at 1-year follow-up. *Radiology* 2005; 234:501-508

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Jorge Lara Arias

Candidato para el Grado de

**Maestro en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular
e Ingeniería Genética**

**Tesis: CULTIVO DE CONDROCITOS AUTÓLOGOS PARA IMPLANTACIÓN
EN LESIONES ARTICULARES**

Campo de Estudio: Ingeniería tisular

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Mérida, Yucatán el 29 de Diciembre de 1977.

Educación:

Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Médico Veterinario Zootecnista en Diciembre de 2003.



DONATIVO

