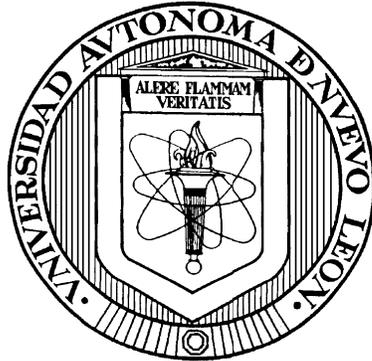


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE hIGF-1 Y hFGF-2 EN  
CONDROCITOS HUMANOS INCLUIDOS EN UNA MATRIZ DE FIBRINA Y  
CULTIVADOS EN UN SISTEMA DINÁMICO**

**Por**

**M. C. JORGE LARA ARIAS**

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

**Junio, 2010**

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE hGF-1 Y hGF-2 EN  
CONDROCITOS HUMANOS INCLUIDOS EN UNA MATRIZ DE FIBRINA Y  
CULTIVADOS EN UN SISTEMA DINÁMICO**

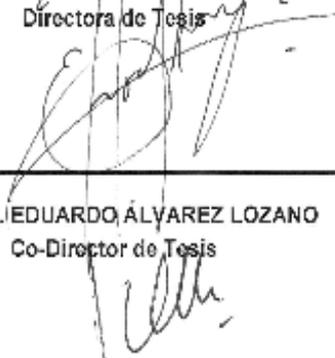
**Aprobación de la Tesis:**



---

**DRA. HERMINIA G. MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Directora de Tesis

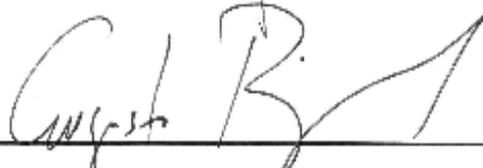
---



**DR. MED. EDUARDO ÁLVAREZ LOZANO**  
Co-Director de Tesis

---

**DR. OSCAR F. MENDOZA LEMUS**  
Comisión de Tesis



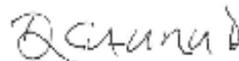
---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Comisión de Tesis



---

**DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ**  
Comisión de Tesis



---

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

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como en el Laboratorio de Ingeniería Tisular del Banco de Hueso y Tejidos que pertenece al 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 co-dirección del Dr. Med. Eduardo Álvarez Lozano.**

---

## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero y profundo agradecimiento para la **Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez** por escucharme, por enseñar con el ejemplo, por tener siempre el mejor de los consejos, por que supo motivar y orientar el camino para alcanzar los objetivos, por la enorme paciencia y sobre todo por su amistad.

Con especial agradecimiento para el **Dr. Eduardo Álvarez Lozano** por su amistad y la confianza otorgada para dejarme decidir, por creer en mi palabra, en mi trabajo y por el respaldo otorgado en todo momento.

Agradezco sinceramente al **Dr. Oscar F. Mendoza Lemus** por el apoyo incondicional, por que siempre me consideró parte del Banco de Hueso, por creer en la investigación entre el área básica y clínica, por el apoyo económico durante todo este tiempo.

A la **Dra. Rocío Ortiz López** y al **Dr. Augusto Rojas Martínez** por su disposición y enseñanza.

A **Lupita Martínez, Normita Estrella, Juany Hinojos, Nayeli Ibarra y Ariadna López** por todas las atenciones y facilidades brindadas para la conclusión de este trabajo, porque muchas veces su ayuda fue invaluable.

A todos mis amigos del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular y a los de Banco de Hueso y Tejidos por hacer más fácil y divertido el tiempo transcurrido a través de los años.

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

## DEDICATORIA

A mis **Padres** y mis **Hermanas**, que siempre estuvieron en cada instante, por tener las palabras adecuadas que no te permiten caer, por la confianza, por el apoyo incondicional sin importar el resultado a pesar de los errores, de la decisiones, por creer en mis proyectos. A Ustedes con todo mi cariño.

A **Karla** que te tocó vivir este proceso. Por creer, por aguantar, por apoyarme con tu presencia y con tus palabras en los momentos de difíciles. Por el tiempo invertido, por los proyectos y por el maravilloso hijo que me regalaste. A ti mi respeto, mi trabajo y mi reconocimiento.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Lista de Tablas</b>	<b>i</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>ii</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>iv</b>
<b>Resumen</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 La Articulación de la Rodilla</b>	<b>1</b>
<b>1.2 El Cartílago</b>	<b>1</b>
<b>1.3 El Cartílago Hialino</b>	<b>2</b>
<b>1.4 El Condrocito</b>	<b>2</b>
<b>1.5 Matriz Extracelular</b>	<b>3</b>
<b>1.5.1 Agua</b>	<b>4</b>
<b>1.5.2 Colágeno</b>	<b>6</b>
<b>1.5.3 Proteoglicanos</b>	<b>7</b>
<b>1.5.4 Proteínas no Colágenas</b>	<b>9</b>
<b>1.5.5 Lípidos</b>	<b>9</b>
<b>1.6 Nutrición del Cartílago</b>	<b>9</b>
<b>1.7 Estratos del Cartílago</b>	<b>11</b>
<b>1.7.1 Capa Superficial o Tangencial</b>	<b>11</b>
<b>1.7.2 Capa Intermedia o Transicional</b>	<b>12</b>
<b>1.7.3 Capa Profunda o Radial</b>	<b>12</b>
<b>1.7.4 Capa Calcificada</b>	<b>12</b>
<b>1.8 Metabolismo del Cartílago Articular</b>	<b>13</b>
<b>1.9 Lesiones del Cartílago</b>	<b>13</b>

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>1.9.1 Inmovilización - Compresión</b>	<b>14</b>
<b>1.9.2 Efectos por Impactos Repetidos</b>	<b>14</b>
<b>1.9.3 Lesiones por Penetración</b>	<b>14</b>
<b>1.9.4 Penetración Profunda (Osteocondral)</b>	<b>15</b>
<b>1.10 Mecanismo de Reparación</b>	<b>15</b>
<b>1.10.1 Localización del Defecto</b>	<b>16</b>
<b>1.10.2 Tamaño de la Lesión</b>	<b>16</b>
<b>1.10.3 Influencia de la Matriz Ósea</b>	<b>17</b>
<b>1.10.4 Efecto de la Movilización</b>	<b>17</b>
<b>1.11 Reparación de Lesiones del Cartílago</b>	<b>17</b>
<b>1.12 Opciones Quirúrgicas sin Implante de Células</b>	<b>18</b>
<b>1.13 Opciones Quirúrgicas con implante de Células</b>	<b>18</b>
<b>1.13.1. Cultivo de Condrocitos Autólogos (ICA)</b>	<b>18</b>
<b>1.13.2 Des-diferenciación de Condrocitos</b>	<b>20</b>
<b>1.13.3 Re-diferenciación de Condrocitos</b>	<b>20</b>
<b>1.13.4 Primera Generación del ICA</b>	<b>20</b>
<b>1.13.5 Segunda Generación del ICA (Ingeniería Tisular)</b>	<b>21</b>
<b>1.14 Evolución del ICA</b>	<b>22</b>
<b>1.15 Células Madre, Aislamiento y Cultivo</b>	<b>22</b>
<b>1.16 Diferentes Modalidades de Cultivo de Condrocitos</b>	<b>23</b>
<b>1.16.1 Cultivo Dinámico</b>	<b>23</b>
<b>1.16.2 Modificación Genética de Condrocitos</b>	<b>23</b>
<b>1.17 Factores de Crecimiento que Afectan el Crecimiento de las Células en Cultivo</b>	<b>25</b>

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
1.17.1 IGF1	27
1.17.2 FGF2	27
1.18 Antecedentes Particulares	28
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>30</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b>	<b>30</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
4.1 Objetivo General	31
4.2 Objetivos Específicos	31
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>33</b>
5.1 Origen de los Condrocitos	33
5.2 Cultivo de Condrocitos	33
5.3 Vectores Plasmídicos y Transfección	34
5.4 Inclusión de Condrocitos en una Matriz de Fibrina	37
5.5 Cultivo Dinámico	37
5.6 Adición de Factores de Crecimiento al Medio	39
5.7 Western Blot para Detectar hFGF2 y hIGF1	39
5.8 Extracción de RNA y RT-PCR	40
5.9 Histología e Inmunohistoquímica	41
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>48</b>
6.1 Expresión de los Factores de Crecimiento en Condrocitos Transfectados	48
6.2 Características de la Matriz Extracelular	48
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>64</b>

**Contenido**

**Página**

**BIBLIOGRAFÍA**

**65**

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla I. Oligonucleótidos para Amplificar Colágeno I, Colágeno II y GAPDH .</b>	<b>41</b>
<b>Tabla II. Reactivos Empleados para la Reacción de Amplificación de GAPDH, Colágeno I y Colágeno II .</b>	<b>41</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1. Caracterización del Plásmido pCMV-Soport6/IGF1.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 2. Caracterización del Plásmido pCIneo/FGF2.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 3. Condrocitos Co-Transfectados con pGREENLANTERN-1, hFGF2 y/o hIGF1.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 4. Preparación de la Fibrina.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 5. Cultivo Dinámico de Condrocitos Incluidos en una Matriz de Fibrina.</b>	<b>38</b>
<b>Figura 6. Ensayos de Western Blot para la Detección de los Factores de Crecimiento Secretados al Medio.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 7. Expresión de Colágeno Tipo I Bajo las Diferentes Condiciones de Transfección.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 8. Representación Gráfica de las Zonas Positivas para los Anticuerpos Específicos de Matriz Extracelular Después de 4 Semanas Bajo el Estímulo de hFGF2.</b>	<b>52</b>
<b>Figura 9. Representación Gráfica de las Zonas Positivas para los Anticuerpos Específicos de Matriz Extracelular Después de 4 Semanas Bajo el Estímulo de hIGF1.</b>	<b>53</b>
<b>Figura 10. Representación Gráfica de las Zonas Positivas para los Anticuerpos Específicos de Matriz Extracelular Después de 4 semanas Bajo el Estímulo de Ambos Factores de Crecimiento.</b>	<b>54</b>

<b>Figura 11. Ensayo Caracterizado por el Cultivo de Condrocitos Incluidos en la Matriz de Fibrina Comercial .</b>	<b>55</b>
<b>Figura 12. Detección de Colágeno Tipo I Mediante IHQ en Cortes de Implantes de Fibrina Humana con Condrocitos Incluidos, en un Medio Suplementado o Transfectados con los Plásmidos Portadores de los cDNA´s que Codifican para hFGF2, hIGF1 o Ambos.</b>	<b>57</b>
<b>Figura 13. Detección de Colágeno Tipo II Mediante IHQ en Cortes de Implantes de Fibrina Humana con Condrocitos Incluidos, en un Medio Suplementado o Transfectados con los Plásmidos Portadores de los cDNA´s que Codifican para hFGF2, hIGF1 o Ambos.</b>	<b>58</b>
<b>Figura 14. Detección de GAG´s Mediante Safranina O en Cortes de Implantes de Fibrina Humana con Condrocitos Incluidos, en un Medio Suplementado o Transfectados con los Plásmidos Portadores de los cDNA´s que Codifican para hFGF2, hIGF1 o Ambos.</b>	<b>59</b>

## NOMENCLATURAS

$\mu$	Micras
$\mu\text{l}$	Microlitros
$^{\circ}\text{C}$	Grados Centígrados
BMP2	Proteína Morfogenética Tipo 2
BMP9	Proteína Morfogenética Tipo 9
$\text{Ca}_2^+$	Calcio
cDNA	Ácido Desoxiribonucleico Complementario
$\text{cm}^2$	Centímetros Cuadrados
Cols	Colaboradores
Col I	Colágeno tipo I
Col II	Colágeno tipo II
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
GAG's	Glicosaminoglicanos
hFGF2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos Tipo 2
hIGF1	Factor de Crecimiento Tipo 1 Similar a Insulina
ICA	Implante de Condrocitos Autólogos
IHQ	Inmunohistoquímica
KDa	Kilo Daltons
MEC	Matriz Extracelular
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros

mm <sup>3</sup>	Milímetros cúbicos
Na <sup>+</sup>	Sódio
nm	Nanómetros
pb	Pares de Bases
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PG's	Proteoglicanos
pH	Logaritmo Negativo de la Concentración de Iones Hidrógeno
rAAV	Virus Adeno Asociados
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico Mensajero
rpm	Revoluciones por Minuto
RT	Transcripción Reversa
SBF	Suero Bovino Fetal
seg	Segundos
TGF β1	Factor de Crecimiento Transformante β1

# 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  $15 \times 10^6$  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 rellenando 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

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 La Articulación de la Rodilla

La rodilla constituye la articulación mayor del cuerpo, puede flexionarse y extenderse, posee la propiedad adicional de rotar y de deslizarse. La articulación de la rodilla está formada por el fémur, la tibia y por la patela (rótula). El extremo de cada hueso integrante está cubierto con una capa de suave y brillante cartílago que amortigua y protege a la vez que permite un movimiento casi exento de fricción<sup>1</sup>.

Rodeando a la estructura de la rodilla se encuentra el revestimiento interno sinovial, que produce un lubricante. Cuando se daña, el cartílago no es capaz de auto-repararse. Las resistentes fibras, llamadas ligamentos, unen los huesos de la articulación de la rodilla manteniéndolos en su lugar; añadiendo estabilidad y elasticidad al movimiento. Los tendones también juegan un importante papel para mantener la articulación de la rodilla estable<sup>1</sup>.

### 1.2 El Cartílago

El cartílago es un tejido conectivo denso y especializado que forma el esqueleto transitorio en el embrión y persiste en el adulto en articulaciones, tracto respiratorio, costillas y orejas. En el sujeto adulto, se encuentran distintos tipos de cartílago que se distinguen por su composición bioquímica, su microestructura molecular, sus propiedades biomecánicas y sus funciones<sup>2</sup>. En este trabajo, nos enfocaremos al cartílago articular o hialino

### **1.3 El Cartílago Hialino**

Es el más abundante en el organismo<sup>3, 4</sup>. Recubre la superficie articular de los huesos, constituye la placa de crecimiento de los huesos largos, el septum nasal, la porción anterior de las costillas y da soporte elástico al tracto respiratorio. El cartílago hialino es flexible, elástico, de color blanco nacarado y opalescente. Sus células (condrocitos) son prácticamente esféricas, cerca de la superficie las células se aplanan y se orientan paralelamente a la superficie apareciendo individualmente o en parejas, mientras que en la profundidad las células son redondeadas y tienden a adoptar una disposición columnar. La sustancia intercelular es homogénea y está constituida básicamente por agua, colágeno, proteoglicanos y en menor medida, por proteínas no colágenas<sup>2</sup>.

El cartílago no contiene vasos sanguíneos, excepto aquellos que lo atraviesan para dirigirse hacia otros tejidos. Su nutrición se realiza a partir del líquido sinovial mediante difusión<sup>3, 4</sup>.

### **1.4 El Condrocito**

Los condrocitos son células de origen mesenquimal responsables de la síntesis y el mantenimiento del cartílago articular. En el tejido maduro ocupan menos del 10% del volumen tisular total. La síntesis y degradación de los componentes de la matriz ocurren no solamente durante la fase de desarrollo embrionario del esqueleto sino que continúan durante la vida adulta. El condrocito se rodea de su matriz extracelular y no tiene contacto intercelular. Los condrocitos vivos aislados In Vitro exhiben un movimiento ameboide.

Cambian constantemente su forma mediante la emisión de pseudópodos<sup>5</sup>. Cerca de la superficie articular presentan morfología alargada en una sección longitudinal, pero cuando el plano de corte del tejido es tangencial, su apariencia es discoidea. Las células de superficie son menos activas que las localizadas en capas más profundas. A mayor profundidad, los condrocitos son menos numerosos, de mayor tamaño, más redondeados y con mayor actividad metabólica. Los condrocitos son metabólicamente activos y responden a gran variedad de estímulos ambientales que incluyen: a) mediadores solubles, como los factores de crecimiento e interleucinas, b) agentes farmacológicos, c) composición de la matriz, d) cargas mecánicas, e) cambios de la presión hidrostática<sup>4, 5</sup>.

La aplicación de cargas tiene un efecto controlador del metabolismo de los condrocitos, si bien el mecanismo exacto se desconoce. Con la maduración decrece la síntesis de matriz y disminuye el número de células<sup>6, 7</sup>, por lo que existe una menor capacidad de reparación.

### **1.5 Matriz Extracelular**

La matriz es la responsable del mantenimiento de la homeostasis de los condrocitos<sup>8</sup> y es el principal componente que determina las propiedades biomecánicas del cartílago. Contiene una gran proporción de agua, fibras de colágeno y una sustancia amorfa compuesta fundamentalmente por carbohidratos y proteínas no colágenas. Una pequeña cantidad de lípidos y componentes inorgánicos también está presente.

La composición de la matriz varía según las diferentes regiones del cartílago, distinguiéndose la región pericelular, la territorial y la interterritorial<sup>9</sup>, según su

proximidad al condrocito. Estas regiones difieren en el contenido en colágeno y proteoglicanos (PG's) y en el diámetro y organización de las fibras de colágeno. La matriz pericelular es una capa delgada adyacente a la membrana celular de los condrocitos, contiene principalmente proteoglicanos y otros componentes no colágenos, casi no hay fibras colágenas. La matriz territorial rodea a la matriz pericelular y presenta finas fibrillas de colágeno que parecen formar una red fibrilar que es diferente de la matriz exterior interterritorial. Estudios recientes han reintroducido el término condrona para englobar el condrocito y la matriz pericelular y territorial<sup>10, 11</sup>. La matriz interterritorial es la más grande de las regiones de la matriz y se halla situada entre las matrices territoriales de los condrocitos individuales o de los grupos de éstos. Contiene la mayor parte de los PG's y las fibras grandes de colágeno <sup>12, 9, 10, 11</sup>.

### **1.5.1 Agua**

Constituye aproximadamente un 70% del peso húmedo del cartílago y es más abundante en las capas superficiales. En escasa cantidad se halla dentro de la célula y participa en la difusión de nutrientes. La mayor parte se encuentra en el espacio extracelular, un 30% se asocia con el espacio intrafibrilar dentro del colágeno y el resto se encuentra en el espacio de poros moleculares de la matriz extracelular. En el agua extracelular se encuentran disueltas sales inorgánicas como sodio, calcio, cloro y potasio<sup>13</sup>.

La cantidad de agua depende de varios factores<sup>14</sup>: Concentración de proteoglicanos y presión resultante de sus cargas negativas, organización

macromolecular del colágeno, resistencia y rigidez de las fibras de colágeno. El contenido de agua no está distribuido homogéneamente en el cartílago, disminuyendo su concentración desde aproximadamente un 80% en las capas superficiales hasta un 65% en la zona profunda. La mayor parte del agua puede desplazarse en el tejido o exprimirse fuera de él al aplicarse un gradiente de presión o comprimiendo la matriz sólida. La resistencia friccional contra este flujo por los poros moleculares de la matriz extracelular es muy alta, y por lo tanto la permeabilidad es muy baja. Esta resistencia friccional y la presurización del agua dentro de la matriz son los dos mecanismos básicos que permiten al cartílago soportar cargas articulares muy altas. La afinidad del cartílago articular por el agua deriva de la naturaleza hidrofílica de los proteoglicanos y en menor grado de la del colágeno. La capacidad de los proteoglicanos de atraer agua implica tres mecanismos físicoquímicos<sup>13, 14</sup>:

- a) La presión osmótica de Donnan, causada por los iones intersticiales que flotan libremente ( $\text{Ca}_2^+$  y  $\text{Na}^+$ ) y que son necesarios para neutralizar las cargas en los proteoglicanos.
- b) Las fuerzas de repulsión electrostática desarrolladas por las cargas negativas fijas de las moléculas de proteoglicanos.
- c) La tendencia entrópica de los proteoglicanos de ganar volumen estando en solución. En el cartílago articular, el grado de hidratación está determinado por el equilibrio de la presión total del aumento de volumen (suma total de estos tres efectos) ejercida por los proteoglicanos, y las fuerzas de restricción desarrolladas en la red de colágeno.

### 1.5.2 Colágeno

Representa el 20% del peso total del cartílago articular y un 50 a 80% del peso en seco del cartílago articular, al cual confiere su estructura y rigidez. Sus principales funciones son proporcionar al tejido propiedades tensiles e inmovilizar a los proteoglicanos dentro de la matriz. En el cartílago articular hay diversos tipos de colágeno, siendo el más abundante el tipo II, con un porcentaje del 95%. El 5% restante está formado por los tipos IX y XI, y en menor cantidad por los tipos V, VI y X<sup>15</sup>.

Las moléculas de colágeno tipo II están constituidas por tres cadenas  $\alpha$ 1(II) de polipéptidos. El tipo IX está formado por tres tipos distintos de cadenas distintas,  $\alpha$ 1  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3; la cadena  $\alpha$ 1 contiene una región globular no helicoidal y la cadena  $\alpha$ 2 está modificada para contener una cadena de glucosaminoglicanos<sup>16</sup>. El tipo X es un colágeno de bajo peso molecular que contiene tres cadenas idénticas  $\alpha$ . El tipo VI no es un componente primario de la matriz extracelular, pero se encuentra en el área pericelular alrededor de los condrocitos<sup>14, 15</sup>.

El colágeno tiene un alto nivel de organización estructural. La unidad básica es el tropocolágeno, que está compuesto por tres cadenas polipeptídicas o cadenas  $\alpha$ . La composición de aminoácidos de las cadenas incluye grandes cantidades de glicina y prolina. Cada una de ellas tiene forma de hélice levógira y entre las tres forman una triple hélice dextrógira unida por enlaces covalentes. Estas moléculas de tropocolágeno miden aproximadamente 1.4 nm de diámetro y 300 nm de longitud. Extracelularmente se polimerizan y se unen mediante enlaces covalentes formando fibrillas de colágeno. El colágeno tipo II no forma haces. El diámetro de sus fibras, dispuestas

individualmente, varía entre 20 y 200 nm<sup>14-16</sup>.

### 1.5.3 Proteoglicanos

Son complejos proteíno-sacáridos formados por cadenas de glucosamioglicanos unidas a un filamento central proteico mediante enlaces covalentes. Son el segundo componente más abundante del cartílago articular, constituyendo el 5 al 10% del peso total de éste<sup>17, 18, 19</sup>.

Los glucosaminoglicanos constituyen el 95% de los proteoglicanos (PG's), y son básicamente el condroitín sulfato y el queratán sulfato. Estos polianiones se unen covalentemente a un filamento proteico central para formar el monómero de proteoglicano. Este filamento presenta varias regiones, una región N-terminal con dos dominios globulares (G1 y G2), una rica en queratán sulfato, una rica en condroitín sulfato y un dominio globular C-terminal (G3)<sup>14, 16</sup>. Los PG's se encuentran en la matriz en forma de monómeros (decorina, biglicano, lumicano y fibromodulina), o bien en forma de agregados o grandes complejos macromoleculares de los cuales el agregado es el más abundante. Los agregados de PG's se forman por la unión de varios de estos monómeros con una cadena de ácido hialurónico a través del dominio globular G1 mediante una proteína de unión. El tamaño de los agregados varía dependiendo del tamaño de la cadena de ácido hialurónico. La estructura de los proteoglicanos en el cartílago no es uniforme. Las diferencias en la longitud de las cadenas, cantidad de condroitín y queratán sulfato, longitud del core proteico y grado de agregación contribuyen a las variaciones estructurales y de composición de los proteoglicanos en el cartílago. A su vez, la distribución de los proteoglicanos

en la matriz tampoco es homogénea, siendo más abundantes en la zona media que en la superficial<sup>15, 16, 18</sup>.

La concentración de glucosaminoglicanos en el cartílago articular es del 6% del peso total y de ellos depende una gran parte de las propiedades físicas del tejido condral. El condroitín sulfato está constituido por una repetición de unidades disacáridas de ácido glucurónico y de N acetilgalactosamina con un grupo sulfato por disacárido; el queratán sulfato está formado por la repetición de unidades disacáridas de galactosa y N acetil-glucosamina de nuevo con un grupo sulfato por disacárido. Ambos son moléculas grandes, con un peso molecular de 50000 D y considerable carga negativa. Están asociados a una densidad de carga fija elevada (0.05 a 0.3 mEq/g de peso total del tejido)<sup>17, 20, 21, 22</sup>.

Las propiedades más importantes del cartílago que dependen de los proteoglicanos son: a) rigidez a compresión, b) presión osmótica, regulación de la hidratación tisular, d) rigidez de cizallamiento.

La carga negativa fija de los proteoglicanos contribuye a mantener un alto grado de hidratación del tejido cartilaginoso al generar una elevada presión<sup>17, 23, 24-29</sup>.

En el cartílago articular, se establecen interacciones covalentes y no covalentes entre las moléculas de colágeno. A su vez, también se establecen interacciones no covalentes colágeno-proteoglicanos y proteoglicano-proteoglicano. El tamaño de los PG's y su capacidad para formar grandes agregados juega un papel fundamental para retener moléculas en el tejido y para formar una estructura elástica que contribuye a las propiedades materiales del cartílago. Existen interacciones electrostáticas entre los grupos

cargados positivamente de las moléculas de colágeno y las cargas negativas de los agregados de proteoglicanos que también participan en las propiedades mecánicas del tejido condral<sup>14-16</sup>.

Con el transcurso de la edad aparecen cambios en la estructura y composición de los agregados de proteoglicanos<sup>30</sup> que pueden ser atribuidos a la alteración en el metabolismo del condrocito o a la degradación en la matriz.

#### **1.5.4 Proteínas no Colágenas**

La fibronectina, la condronectina y la ancorina CII son las denominadas proteínas no colágenas<sup>14-16</sup>. Constituyen el armazón de las macromoléculas, y si bien su función es poco conocida, parece que organizan y mantienen las macromoléculas de la matriz y su interrelación con el condrocito.

#### **1.5.5 Lípidos**

Constituyen un 1% o menos del peso húmedo del cartílago. Se encuentran tanto en las células como en la matriz y no se conoce su función exacta<sup>14</sup>.

### **1.6 Nutrición del Cartílago**

El cartílago, que no posee terminaciones nerviosas ni aporte sanguíneo, recibe las sustancias nutrientes del líquido contenido en la articulación. Debido a que el tejido es avascular en la vida adulta, la mayoría de los investigadores postulan que los nutrientes difunden a través de la matriz desde el líquido sinovial o desde el hueso subyacente. Algunos investigadores<sup>10, 31, 32</sup> defendieron el aporte nutricional a partir del hueso

subcondral. Por el contrario, otros han considerado a la vía sinovial como la única fuente de nutrición del cartílago y aun otros, han defendido un patrón mixto de nutrición a partir no sólo del líquido sinovial sino también de la cavidad medular del hueso subcondral<sup>33, 34, 20, 35</sup>. Ingelmark<sup>36</sup> describió la existencia de unas "zonas de contacto" entre el cartílago y el hueso subyacente. Harrison<sup>37</sup> observó la presencia de asas o canales vasculares que ponían en contacto el cartílago con la medula del hueso subcondral, a través de los cuales los nutrientes podrían pasar al cartílago y sugirió que en animales inmaduros una parte de los nutrientes entra en el cartílago articular por difusión desde el sustrato óseo permeable subyacente. Sin embargo, en el adulto este tipo de difusión desaparece debido a la acumulación de sales de calcio en la zona calcificada del cartílago, dejando al líquido sinovial como fuente más probable de nutrición. De esta forma, el mecanismo de nutrición del cartílago articular se vería afectado por la madurez esquelética.

A favor de la teoría sinovial apuntan una serie de hechos como son el necesario efecto de bombeo provocado por los procesos cíclicos del movimiento y la carga articular, la gran extensión de superficie del cartílago articular en contacto con la membrana sinovial, la supervivencia del cartílago en forma de cuerpo libre en el medio sinovial y la imposibilidad de paso de diversas sustancias a través de la capa calcificada del cartílago debido al efecto barrera de ésta cuando se ha alcanzado la madurez ósea.

Hechos que pudieran favorecer la vía sanguínea o subcondral son la supervivencia del cartílago tras la realización de sinovectomías, la persistencia de canales vasculares en grandes mamíferos que nutren capas más superficiales del cartílago tras la maduración esquelética y la aparición

de signos artrósicos cuando el hueso subcondral pierde su vascularización<sup>10</sup>,  
31.

Dada la ausencia de vasos en el cartílago articular, el transporte de nutrientes a través del mismo hasta llegar al condrocito puede realizarse por tres mecanismos<sup>30</sup>: 1- Difusión, 2- Convección, 3- La combinación de ambos.

El mecanismo de convección se produce por el flujo de líquido intersticial cuando el cartílago se deforma al someterse a carga.

## **1.7 Estratos del Cartílago**

Ya se ha mencionado que el tejido del cartílago se organiza en una serie de capas o estratos que se pueden distinguir por la distribución de las células y de los componentes de la matriz extracelular. A continuación se describen brevemente las principales propiedades de cada uno de los estratos.

### **1.7.1 Capa Superficial o Tangencial**

Adyacente a la cavidad articular. Los condrocitos adoptan una forma alargada o elipsoide y se orientan paralelos a la superficie. Las células presentan escasa actividad, con mitocondrias pequeñas y poco numerosas, escaso volumen citoplasmático, retículo endoplásmico rugoso pobremente desarrollado y pocos ribosomas<sup>9, 11, 12</sup>.

Todo ello sugiere una pobre síntesis proteica. Las fibras de colágeno son finas y se disponen paralelamente a la superficie para soportar las fuerzas de cizallamiento durante el movimiento articular.

### **1.7.2 Capa Intermedia o Transicional**

Las células adoptan morfología redondeada y son mayores que las de la capa 1 o superficial. Presentan un aparato de Golgi bien desarrollado con abundantes vesículas, vacuolas y mitocondrias. El retículo endoplásmico rugoso es extenso y con numerosos ribosomas. Los condrocitos se disponen irregularmente y las fibras de colágeno son más gruesas y se orientan en los tres planos del espacio<sup>9, 11, 12</sup>.

### **1.7.3 Capa Profunda o Radial**

Las células son redondeadas y presentan las mismas características de las de la capa 2, lo que puede traducirse en una elevada síntesis proteica. Si bien adoptan una disposición columnar, las fibras de colágeno son gruesas y se distribuyen paralelamente entre sí y perpendiculares a la superficie articular para ofrecer resistencia a las fuerzas de compresión. El contenido en agua es menor que en las anteriores y los proteoglicanos son más abundantes<sup>9, 11, 12</sup>.

### **1.7.4 Capa Calcificada**

Adyacente al hueso y separada de la capa 3 por una línea basófila llamada línea de marea o "tide mark"<sup>90</sup>. La matriz está impregnada de sales de calcio, las células son pequeñas y con escaso citoplasma, e incluso aparecen necróticas. En esta capa se produce el anclaje del cartílago al hueso subcondral<sup>12</sup>.

## **1.8 Metabolismo del cartílago articular**

En el cartílago articular existe un metabolismo muy activo. Utiliza principalmente la vía anaerobia para la producción de energía, por lo que el consumo de oxígeno es considerablemente menor que en otros tejidos. Los condrocitos realizan la síntesis y ensamblaje de los componentes de la matriz y dirigen su distribución en el tejido. Este proceso implica la síntesis de proteínas, la síntesis de glucosaminoglicanos y su unión a las proteínas centrales y la secreción de las moléculas completas al medio extracelular. Todos estos mecanismos tienen lugar en un medio avascular. El mantenimiento de la matriz extracelular depende del equilibrio en la síntesis de los componentes de la matriz, la incorporación de éstos a la matriz extracelular y de su degradación y liberación del cartílago. Este equilibrio responde a las modificaciones del ambiente químico y mecánico. La composición de la matriz, las cargas mecánicas, los cambios de presión hidrostática, los campos eléctricos y los mediadores solubles (factores de crecimiento, interleucinas) modifican la actividad metabólica del condrocito para mantener una matriz estable<sup>10, 31, 32</sup>.

## **1.9 Lesiones del Cartílago**

Existen diversos mecanismos capaces de provocar una alteración de las propiedades histoquímicas y por lo tanto mecánicas del cartílago. Todos ellos pueden originar una modificación en la respuesta del cartílago a las sollicitaciones mecánicas. La respuesta del tejido condral frente a las lesiones de carácter físico es variable en dependencia del mecanismo de actuación de éstas<sup>6, 38-46</sup>.

### **1.9.1 Inmovilización - Compresión**

Cuando se inmoviliza una articulación o se la somete a una presión constante, se produce un deterioro del cartílago articular dependiente de la alteración del paso de nutrientes y electrolitos a través del mismo originada por la afectación de su respuesta viscoelástica. Este deterioro se produce en tres fases<sup>47-52</sup>.

a) Fase I: Necrosis superficial. Se traduce por una coloración amarillenta del cartílago, que se torna blando. Los condrocitos alteran su forma y se agrupan en nidos.

b) Fase II: Hay una pérdida del espesor del cartílago, fundamentalmente de la capa superficial.

c) Fase III: Existe una pérdida completa del grosor, llegando a exponerse el hueso

### **1.9.2 Efectos por Impactos Repetidos**

Los traumatismos por impacto, simple o repetido, son capaces de producir, cuando la fuerza es suficiente, una degeneración del cartílago articular que puede llegar hasta la capa calcificada y el hueso subcondral al igual que se observa en la artrosis, si bien el movimiento precoz puede tener un efecto reparador<sup>53, 54</sup>.

### **1.9.3 Lesiones por Penetración**

Las lesiones por penetración superficial son aquellas que afectan solo al cartílago, sin llegar al hueso subcondral. Se han empleado tres procedimientos para producir lesiones superficiales con el propósito de

comprender el mecanismo de reparación: escarificación, afeitado y defectos superficiales:

- a) Escarificación: Consiste en la realización de múltiples cortes en la superficie de cartílago sin penetrar la unión osteocondral<sup>55, 56</sup>.
- b) Afeitado: Se realiza una escisión mediante fresa motorizada de lesiones cartilaginosas propias de la condromalacia<sup>57, 58</sup>.
- c) Defectos superficiales: La creación de defectos superficiales en el cartílago articular de animales de experimentación ha sido realizada por diversos investigadores, observando una ausencia de capacidad reparadora por parte de las células cartilaginosas<sup>59, 60, 61</sup>.

#### **1.9.4 Penetración Profunda (Osteocondral)**

Cuando se realizan defectos profundos, que afectan al hueso subcondral, existe unanimidad entre los autores acerca de la aparición de procesos reparadores. Estos procesos, cuyo objetivo es el relleno del defecto por un nuevo tejido de reparación, presentan en las fases iniciales un potencial regenerador condral, pero con el transcurso del tiempo sufre un deterioro progresivo y acaba por transformarse en tejido fibrocartilaginoso o fibroso<sup>10</sup>.

#### **1.10 Mecanismo de Reparación**

Tiene lugar a partir de la profundidad del defecto, es decir, del hueso subcondral. En los primeros días se forma un hematoma parcialmente organizado producido por la ruptura de vasos que progresivamente se transforma en un coágulo rico en fibrina que engloba hematíes, leucocitos y elementos medulares. Con el crecimiento de capilares procedentes del lecho

vascular, el coágulo se transforma en un tejido de reparación de carácter fibroblástico bien vascularizado. La metaplasia progresiva de este tejido de granulación hace que se torne cada vez más celular y menos vascular<sup>62</sup>.

En experimentos realizados a largo plazo (uno o dos años) se observó la aparición de fenómenos degenerativos en el tejido de reparación caracterizados por adelgazamiento de éste y pérdida de las características macroscópicas de su superficie con aparición de fenómenos de fibrilación<sup>63</sup>.

### **1.10.1 Localización del Defecto**

Se han realizado defectos superficiales en cóndilos y en surco patelar de perros, observando escasa o nula reparación en esta última localización, hecho que atribuyó a la fricción originada por el deslizamiento patelar<sup>64</sup>. De Palma<sup>65</sup> realizó los defectos en zonas de carga y no carga del cóndilo femoral, no encontrando diferencias significativas entre ambos.

### **1.10.2 Tamaño de la Lesión**

El tamaño de la lesión constituye un factor primordial en el proceso de reparación. Convery<sup>66</sup> obtuvo una reparación completa a los tres meses en defectos menores de 3 mm realizados en rodillas de caballos. Por el contrario, en defectos mayores de 9 mm la reparación era incompleta y presentaba áreas de fibrocartilago, cartilago pobremente diferenciado y tejido fibroso. Buckwalter<sup>30</sup>, en un experimento realizado en conejos obtuvo reparación en el 50% de ellos y afirmó que los resultados en defectos de 1 mm de diámetro eran mucho mejores que en aquellos de 3 mm. Ambos trabajos demostraron un índice de reparación mayor cuanto menor era el tamaño del defecto.

### **1.10.3 Influencia de la Matriz Ósea**

Reddi<sup>67</sup> consideró la posibilidad de que la presencia de factores de crecimiento y diferenciación condral en la matriz ósea, tenía una acción inductora sobre el proceso de reparación en las lesiones del cartílago, concluyendo que la agresión del hueso subcondral en defectos profundos desencadena la liberación de estos factores dando lugar a un proceso reparador con la aparición de tejido fibrocartilaginoso. Este fenómeno no aparece en las lesiones superficiales, por lo que no se desencadenan los mecanismos de reparación.

### **1.10.4 Efecto de la Movilización**

Partiendo de la base de que la inmovilización ejerce una influencia negativa sobre el proceso de reparación así como sobre el cartílago sano, distintos experimentos han recabado información de los efectos de los distintos tipos de movilización en los fenómenos reparativos<sup>68, 69</sup>:

i. Movilización precoz

ii. Movilización continua pasiva

- ✓ Favorece la nutrición y la actividad metabólica del cartílago normal.
- ✓ Estimula a las células mesenquimales para su diferenciación hacia cartílago articular.
- ✓ Acelera la reparación del cartílago y de los tejidos periarticulares, tendones y ligamentos.

### **1.11 Reparación de Lesiones del Cartílago**

Debido a su escasa nutrición, el cartílago articular posee baja capacidad de auto-reparación. Los tratamientos para las lesiones del cartílago pueden ser sintomáticos (medicamentos como condroprotectores, anti-inflamatorios no esteroides, esteroides), funcionales (lavado artroscópico con desbridación o rehabilitación) o diferentes técnicas quirúrgicas incluyendo la reparación/regeneración del cartílago basada en implante de células<sup>70</sup>.

### **1.12 Opciones Quirúrgicas sin Implante de Células**

Estas técnicas representan la manera tradicional de reparar el cartílago articular, en general, se basan en el estímulo de la médula ósea, en donde el hueso sub-condral es penetrado para obtener un área de vascularización, que estimula la formación de un coagulo de fibrina que contiene células mesenquimales provenientes de la médula ósea. Estas células madre, son capaces de reproducir (a través de una metaplasia fibrosa) un tejido de reparación fibrocartilaginoso<sup>70</sup>. Dentro de estas técnicas se encuentran la abrasión<sup>70</sup>, la microfractura<sup>71</sup>, la reparación del cartílago con un parche de periostio<sup>72</sup>, transplante de pericondrio<sup>73</sup>, fibra de carbón<sup>74</sup>, alotransplantes osteocondrales frescos<sup>75</sup>, transplantes osteocondrales autólogos<sup>76</sup> y mosaicoplastia<sup>77</sup>

## **1.13 Opciones Quirúrgicas con Implante de Células**

### **1.13.1. Cultivo de Condrocitos Autólogos (ICA)**

El aislamiento de condrocitos del cartílago articular fue realizado por Smith<sup>78</sup> en 1965, demostrando In Vitro la supervivencia de los mismos a bajas temperaturas. Para la disgregación del cartílago hialino o articular, se han empleado diferentes enzimas (papaína, colagenasa, pronasa, tripsina, etc) que rompen las uniones intercelulares, así como la red de fibras de colágeno y para la expansión celular, se han probado diferentes medios de cultivo que varían en su composición (Ham F12, OptiMem®, D-Mem, etc), teniendo como suplemento suero sanguíneo (humano, bovino fetal, ternera, etc). En 1987, inició una revolución en los intentos por reparar zonas dañadas del cartílago articular, desde la inyección de condrocitos suspendidos en un medio líquido e inyectados en la lesión, mantenidos por un parche de periostio, hasta el uso de un hidrogel a base de colágeno<sup>79, 80</sup> que proporcionó una mejor fijación a las células y un mejor medio para la síntesis de macromoléculas por la matriz. Brittberg y Cols, en 1994 fueron los primeros en reportar sus experiencias clínicas, que consistieron en una técnica de dos etapas. En la primera etapa, se tomó una biopsia de cartílago normal que posteriormente fue macerada y sometida a digestiones enzimáticas, las células se cultivaron y expandieron empleando medios de cultivo específicos, así como temperatura y humedad controlada. Finalmente, se suturó y se selló con adhesivos de fibrina un parche de periostio y las células fueron inyectadas en la zona de la lesión. Desde entonces han sido varios los autores que han

empleado el cultivo de condrocitos en combinación con matrices tridimensionales para el recubrimiento de defectos condrales, hasta su generalización en el empleo en clínica<sup>42, 80-88</sup>.

Existen diferentes factores a considerar en la reconstrucción del cartílago articular mediante el implante de condrocitos autólogos, los más importantes son el tamaño de la lesión, el nivel de actividad de los pacientes, las actividades diarias, la invasión quirúrgica, el costo del procedimiento y la rehabilitación. Las lesiones menores a 2 cm<sup>2</sup>, generalmente no derivan a lesiones degenerativas y cuando son mayores a 2 cm<sup>2</sup> la reparación del cartílago se asocia a las células provenientes del hueso subcondral y el implante de condrocitos autólogos es el tratamiento sugerido<sup>70</sup>.

### **1.13.2 Des-diferenciación de Condrocitos**

Es bien sabido que durante el cultivo y expansión en monocapa de condrocitos In Vitro, las células pierden su fenotipo y comienzan a expresar marcadores embrionarios primitivos<sup>89, 90</sup>. Durante la expansión de condrocitos articulares, el grado de des-diferenciación, ha sido correlacionado con el número de divisiones celulares o pasajes<sup>90-93</sup>.

### **1.13.3 Re-diferenciación de Condrocitos**

Los condrocitos expandidos en monocapa, son capaces de re-diferenciarse cuando son restituidos a un ambiente tridimensional y bajo condiciones adecuadas de cultivo<sup>94, 95, 96</sup>. Esta habilidad es particularmente importante cuando las células serán transplantadas a un paciente. Recientemente, se

ha demostrado que la capacidad celular de re-diferenciación puede ser alterada por la exposición a ciertos factores de crecimiento durante el cultivo en monocapa<sup>97, 98, 99</sup>.

#### **1.13.4 Primera Generación del ICA**

La primera generación del implante de condrocitos, se basó en la toma de una biopsia de cartílago sano, el cultivo celular y su posterior aplicación, empleando un medio líquido como acarreador en la zona lesionada del cartílago articular<sup>100</sup>. Otra característica de esta técnica, es que se sutura un parche de periostio para contener las células en suspensión. Se reportaron diferentes complicaciones como hipertrofia del parche de periostio y/o delaminación, así como un 80% de mejoría en los pacientes tratados<sup>101</sup>. Posteriormente, el parche de periostio fue reemplazado por una membrana de colágeno tipo I y III de origen porcino, en donde se pudo evitar la hipertrofia que se había presentado con el parche de periostio<sup>102</sup>. Sin embargo, la mejora clínica de los pacientes fue parcial en comparación al uso del periostio<sup>103</sup>.

#### **1.13.5 Segunda Generación del ICA (Ingeniería Tisular)**

En años recientes, la ingeniería tisular del cartílago articular ha desarrollado técnicas prometedoras en cuanto a la regeneración de defectos articulares basadas en la aplicación de condrocitos autólogos que secreten proteínas características de una matriz extracelular. Esta segunda generación de

implantes, se centra en el uso de biomateriales combinados con los condrocitos provenientes del cartílago hialino. Una matriz tridimensional, proporciona a las células un andamio que les sirve como una superficie de adherencia, medio de proliferación y soporte para la producción de estructuras tisulares complejas, puede guiar la migración celular en la zona dañada y estimular su crecimiento y diferenciación, para finalmente ser degradada en respuesta a la liberación de enzimas de degradación liberadas por las células incluidas en su interior<sup>104</sup>. Las matrices varían desde fibras(colágeno, ácido hialurónico), mallas (esponjas de colágeno), hasta geles (alginato, agarosa, chitosan, adhesivos de fibrina). Las matrices de características sólidas proporcionan un substrato en donde las células pueden adherirse, mientras que los líquidos y geles, atrapan o envuelven físicamente a las células. Se han diseñado andamios de origen natural como agarosa, alginato, ácido hialurónico, gelatina, adhesivos de fibrina, derivados del colágeno y matrices de cartílago acelulares<sup>105-114</sup>. También de origen sintético como ácido poliglicólico, ácido poliláctico y la mezcla entre ambos<sup>115</sup>.

#### **1.14 Evolución del ICA**

La segunda generación de implante de condrocitos, ha evolucionado al diseño de esferas de origen autólogo que proporcionan un micro-ambiente tridimensional a las células sin la adición de suero alogénico o heterólogo, antibióticos y factores de crecimiento. El principio de la formación de las esferas, se basa en la agregación tridimensional de los condrocitos y su posterior secreción de los componentes característicos de la matriz

extracelular. La agregación se induce mediante viales especiales sin el estímulo de agentes químicos o físicos. Las condroesferas (co.don Chondrospheres®) solo reciben el aporte del medio de cultivo suplementado con el suero del paciente<sup>116</sup>.

### **1.15 Células Madre, Aislamiento y Cultivo**

Se ha demostrado la capacidad condrogénica de las células estromales de la médula ósea o células madre mesenquimales, mediante el cultivo en un medio libre de suero suplementado con ácido ascórbico, dexametasona y TGF- $\beta$ 1<sup>117</sup>. La inducción con BMP-2 y BMP-9 promueven la diferenciación condrogénica en células incluidas en perlas de alginato<sup>118</sup>. También se ha investigado el efecto condrogénico promovido por otros factores de crecimiento como FGF-2, PDGF bb, EGF e IGF-1 durante la expansión de las células mesenquimales<sup>119, 120</sup>.

### **1.16 Diferentes Modalidades de Cultivo de Condrocitos**

#### **1.16.1 Cultivo Dinámico**

Se basan principalmente en la agitación continua del medio de cultivo y por consiguiente de los implantes generados a partir de la inclusión de células en una matriz tridimensional. De esta manera, el choque entre estas construcciones, estimulan el crecimiento celular, la síntesis de glucosaminoglicanos y colágeno II<sup>121</sup>. Permiten el aporte de nutrientes en cultivos con alta densidad celular y minimizan la acumulación de productos de degradación<sup>122</sup>. Existen diferentes métodos de cultivos dinámicos, que van

desde un frasco “spinner” o giratorio<sup>123</sup>, viales en rotación constante<sup>124</sup>, sistemas de perfusión y bio-reactores<sup>125</sup>, que mantienen un ambiente biológicamente activo, manteniendo ciertas condiciones propicias (pH, temperatura, concentración de oxígeno, etcétera) para las células en cultivo.

### **1.16.2 Modificación Genética de Condrocitos**

Con el desarrollo de métodos para la introducción de genes a células precursoras y condrocitos, ha llamado la atención la promesa de tratar desórdenes del cartílago articular mediante terapia génica. Sin embargo, la idea de tratar lesiones localizadas en el cartílago hialino, con esta estrategia, deberá de acompañarse por un amplio respaldo científico que explique los principios de la reparación del tejido y principalmente las consecuencias de implantar células que han sido modificadas genéticamente. Las estrategias para estas modificaciones, dependerán en gran medida de la reproducibilidad y de la eficiente introducción del material genético y de la expresión local de los factores terapéuticos. Algunos factores de crecimiento son moléculas idóneas para aplicar técnicas de transferencia de genes, debido a que se pueden secretar y de esta manera estimular diferentes vías autócrinas o parácrinas. Entre las células blanco para una transferencia de genes se incluye: 1. Células progenitoras que llenen el defecto, 2. Condrocitos diferenciados que son transplantados al interior de la lesión y condrocitos adyacentes, y 3. Sinoviocitos<sup>126</sup>. La susceptibilidad de los condrocitos a ser transducidos por ciertos vectores adenovirales, ha sido documentada in Vitro gracias al uso de vectores portadores de genes reporteros<sup>127, 128, 129</sup> alcanzando eficiencias que llegan hasta el 100%. Los condrocitos también

pueden ser transducidos por vectores retrovirales<sup>130, 131</sup> pero con bajo porcentaje de eficiencia. También se ha reportado que es posible la transducción de células del cartílago articular por baculovirus<sup>132, 133</sup> y lentivirus<sup>134</sup>. De la misma manera, se han empleado vectores rAAV para transducir condrocitos articulares de diferentes especies de mamíferos a altas eficiencias<sup>135, 136</sup>, una ventaja que se ha observado con los vectores rAAV, es que son capaces de transferir genes directamente a los condrocitos embebidos en su propia matriz extracelular, esto, cuando se aplica directamente a explantes de cartílago<sup>135, 136</sup>. En contraste a los riesgos ofrecidos por la transferencia viral de genes, como la posible respuesta inmunológica o la probabilidad de neo-formaciones, los condrocitos pueden ser transfectados por vectores de origen bacteriano como los plásmidos mediante técnicas como liposomas catiónicos como la Lipofectina o LipofectAmina<sup>137</sup>, así como sistemas basados en compuestos Lipídicos como FuGENE 6<sup>137</sup>. Una gran variedad de genes terapéuticos han sido transferidos a condrocitos aislados in Vitro y han estimulado la síntesis de diferentes compuestos moleculares como el IGF1, TGF- $\beta$ 1, FGF2, entre otros factores, que promueven la producción de proteoglicanos, colágeno tipo II y proteínas no colágenas en cultivos en monocapa y tridimensionales<sup>137, 138</sup>. También se ha reportado la disminución gradual de la expresión cuando los ensayos se realizan en cultivos en monocapa<sup>139</sup> y cuando los cultivos son tridimensionales, se ha observado que se extiende la sobre-expresión de ciertos factores de crecimiento<sup>137,138</sup>. Las estrategias para transferir estos vectores a la zona comprometida o lesionada han sido: 1. La inyección del vehículo portador del gen o las células modificadas al espacio articular, 2. El

transplante de un implante portador de células que han sido genéticamente modificadas directamente a la lesión y 3. La administración directa de los vectores en la zona dañada<sup>140</sup>.

### **1.17 Factores de Crecimiento que Afectan el Crecimiento de las Células en Cultivo**

Recientemente, se ha procurado evitar la manipulación genética de los condrocitos mediante mecanismos químicos y/o físicos que puedan estresar a las células ocasionando que muchas de ellas se programen para entrar en apoptosis o que puedan alterar de manera negativa sus vías de señalización. El estímulo del micro-ambiente mediante factores de crecimiento adicionados a los medios de cultivo o a matrices tridimensionales inteligentes que puedan administrar de manera eficiente estas proteínas, han sido motivo de estudio en diversos modelos tanto in Vitro<sup>141, 142</sup>, como in Vivo<sup>143, 144</sup> y seleccionando matrices de diferentes orígenes, así como variando las líneas celulares<sup>144, 145</sup>. Los efectos de los factores de crecimiento sobre los condrocitos varían in Vivo e in Vitro. En general estimulan la síntesis de los componentes de la matriz extracelular del cartílago<sup>145</sup>.

Los factores de crecimiento forman un grupo de macromoléculas polipeptídicas, que presentan acciones específicas y potentes sobre la regulación de la proliferación, la muerte, la movilidad y la diferenciación de células competentes. Desde la perspectiva de la fisiología celular, los factores de crecimiento son primeros mensajeros que interactúan sobre receptores glicoproteicos de membrana que transducen la señal generando una cascada de reacciones que termina en la regulación de ciertos factores de

transcripción y por lo tanto de la expresión génica. Su mecanismo de secreción más frecuente es parácrino o autócrino, y solo ocasionalmente es endocrino<sup>146</sup>. En la actualidad, el principal uso médico de los factores de crecimiento y sus receptores es la marcación mediante inmunohistoquímica de tejidos tumorales para realizar diagnósticos y, de ser posible, establecer pronósticos<sup>147</sup>. Sin embargo sus potenciales aplicaciones terapéuticas son muy amplias y quizás en un futuro cercano sean sustancias indispensables en la industria farmacéutica.

### **1.17.1 IGF1**

La familia de los factores de crecimiento similar a insulina, actúan como mediadores de las acciones de la hormona del crecimiento, por lo que durante años se les denominaba somatomedinas. Posteriormente se las incluyó dentro de los factores de crecimiento y, por sus semejanzas estructurales y funcionales con la insulina, se les otorgó la denominación de IGFs. Hoy se conocen dos IGFs (I y II) cuyas moléculas son semejantes a la de insulina, pero de tamaño algo mayor (7.5 KDa)<sup>148</sup>, ejerce efectos anabólicos<sup>149</sup> durante el desarrollo y en adultos, participando en la síntesis de proteoglicanos y colágeno II, además inhibe la destrucción de la matriz extracelular y favorece la adhesión de los condrocitos al colágeno tipo II<sup>138</sup>.

### **1.17.2 FGF2**

En cuanto a la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos, su

existencia se demostró experimentalmente en la década de 1940, el aislamiento de los mismos recién se produjo en 1984 a partir de extractos de hipófisis bovina que demostraron ser mitógenos para fibroblastos primarios en cultivo. FGF1 o FGFa (ácido) y FGF2 o FGFb (básico) fueron los primeros miembros de la familia caracterizados. Posteriormente se reconocieron otros miembros de la familia, de los cuales únicamente el FGF7 o KGF se encontró en los tejidos de mamíferos adultos. Los factores restantes fueron identificados a partir de oncogenes y su aparición normal solo se limitaría a ciertos momentos del desarrollo embrionario. Actualmente se considera que la familia comprende en vertebrados al menos 23 factores distintos. El prototipo de la familia es FGF2 o bFGF. En su forma activa el FGF2 es una proteína de 146 aminoácidos. y 16-18 KDa, aunque existen isoformas de mayor peso molecular que penetran en la célula y llegan al núcleo<sup>150</sup>. En el suero humano el FGF2 es detectable y su concentración presenta un evidente ritmo circadiano.<sup>151</sup> Tanto en suero como en orina, la concentración de FGF2 aumenta en ciertas neoplasias malignas<sup>150</sup>. In Vitro, el factor de crecimiento de fibroblastos 2 posee efectos mitogénicos, quimiotácticos y ejerce acciones sobre la diferenciación celular de condrocitos, osteoblastos, entre otras células. In Vivo, FGF-2 mejora la reparación de lesiones profundas del cartílago articular<sup>137</sup>.

### **1.18 Antecedentes Particulares**

En un trabajo previo en nuestro laboratorio, que fue el trabajo de tesis de Maestría del autor de esta tesis, nos propusimos implantar condrocitos autólogos cultivados e incluidos en una matriz de fibrina, para la reparación

de defectos articulares. En este caso, se aislaron condrocitos a partir de biopsias de cartílago de pacientes con diferentes lesiones osteocondrales. Se incluyeron  $15 \times 10^6$  células en una matriz de fibrina para generar un implante de condrocitos autólogos que fue aplicado 24 horas post-inclusión. Se comparó la composición de la matriz extracelular (MEC) de cartílago sano con la matriz sintetizada por los condrocitos en monocapa y al ser incluidos en la fibrina. Se realizaron pruebas de RT-PCR e inmunohistoquímica a los 7, 14 y 21 días de cultivo para detectar la expresión de Sox 9, colágeno tipo I y II. En el cartílago hialino se observó colágeno II, el factor de transcripción Sox 9 y ausencia de colágeno I. En monocapa se detectó colágeno I desde la primera semana, sugiriendo un proceso de desdiferenciación. Sin embargo, las células expresaron colágeno II y Sox 9 en todo el período de cultivo. Se pudo distinguir Sox 9, colágeno II y colágeno I en los condrocitos incluidos en fibrina. Se implantaron condrocitos incluidos en la matriz de fibrina a un paciente que presentaba una lesión osteo-condral en el domo del astrágalo izquierdo. Seis meses postimplante, el paciente se reportó incorporado a sus actividades cotidianas. Finalmente, pudimos concluir que el ICA permitió una recuperación clínica exitosa en la función articular del paciente tratado, 5 años posteriores a su implante, el paciente lleva una vida normal e incluso practica deporte de manera constante. Hasta este momento, se han implantado más de 80 pacientes con lesiones condrales de diferente localización como en cóndilos femorales (medial o lateral), patela y en el domo del astrágalo, observándose una recuperación total en el 85% de los pacientes tratados, las complicaciones en el 15% restante que representa a

paciente recuperados parcialmente o con fracaso del procedimiento, se han asociado a condiciones propias la patología original.

## **CAPÍTULO II**

### **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que las lesiones del cartílago articular representan un problema en la ortopedia, consideramos que es necesario explorar modificaciones en las condiciones de cultivo de condrocitos, desarrollando un modelo con células humanas que sobre-expresen factores de crecimiento que en conjunto, influyan en la síntesis de proteínas propias de la matriz extracelular. De manera adicional, se proporcionará una fuerza hidrodinámica que permita la nutrición adecuada de los condrocitos incluidos en una matriz de fibrina. Con estas modificaciones esperamos mejorar la calidad de la nueva matriz generada, para que sea más parecida en composición al cartílago hialino normal, con lo cual pudieran elaborarse implantes de condrocitos de mejor calidad.

## **CAPÍTULO III**

### **HIPÓTESIS**

El cultivo de condrocitos incluidos en una matriz de fibrina, así como el estímulo aportado por el sistema de agitación continua y de los factores de crecimiento hIGF-1 y hFGF-2, promoverán la formación de neo-cartílago in Vitro con características estructurales propias del cartílago hialino normal.

## **CAPÍTULO IV**

### **OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo general**

Diseñar un modelo de síntesis de neo-cartilago in Vitro formado a partir de condrocitos humanos transfectados con los DNA complementarios que codifican para los factores de crecimiento hIGF-1 y hFGF-2, incluidos en una matriz tridimensional a base de fibrina y mantenidos en un cultivo dinámico, que permita analizar los cambios metabólicos y morfológicos que ocurren durante la diferenciación de los condrocitos.

#### **4.2 Objetivos específicos**

1. Construir vectores portadores de los cDNAs que codifican para los factores hIGF-I y hFGF-2.
2. Expresar de manera transitoria los factores hIGF-I y FGF-2 en cultivos de condrocitos humanos.
3. Implementar un sistema de cultivo dinámico para los condrocitos transfectados e incluidos en una matriz de fibrina.
4. Detectar la expresión de hIGF-I y hFGF-2 en los medios de condrocitos transfectados y cultivados en un medio dinámico.

5. Comparar la composición de la matriz extracelular de los implantes cultivados en un medio dinámico bajo diferentes condiciones, por medio de tinciones histológicas y de inmunohistoquímica.

## **CAPÍTULO V**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **5.1 Origen de los Condrocitos**

Las células requeridas para el presente estudio, se tomaron de los excedentes de los cultivos primarios correspondientes a pacientes que solicitaron un tratamiento para lesiones del cartílago articular, mediante la técnica de cultivo e implantación de condrocitos autólogos (CONDROGRAFT®), implementada en el Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

#### **5.2 Cultivo de Condrocitos**

Se emplearon cultivos primarios correspondientes a pacientes que solicitaron el implante de condrocitos autólogos y que dieron su consentimiento informado para que se utilizaran sus células. Se realizó el cultivo celular siguiendo los protocolos establecidos en el Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González”, como se describe a continuación: En condiciones estériles, la biopsia de características osteocondrales, se maceró en pequeños trozos y se sometió a varios ciclos de digestiones enzimáticas, empleando tripsina/EDTA al 2.5% (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES (Grand Island, NY, EUA). Posteriormente, la digestión continuó con colagenasa tipo II

(GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, NY, EUA), a 37°C y en agitación continua. Las células contenidas en el sobrenadante se sedimentaron por centrifugación (Heraeus, Thermo Electron Corporation. Ridgefield Court, Asheville, USA) a 1000 rpm por 10 minutos. Para el cultivo celular, se emplearon placas de 6 pozos a una densidad de siembra de  $1 \times 10^5$  células (NUNC™ Creek Drive, Rochester, NY). El medio para el cultivo celular fue Opti-MEM I (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA). Para el cultivo de los condrocitos, (New Brunswick Scientific Inc. Talmadge Road Edison, New Jersey, USA) se mantuvo un ambiente de 5% de CO<sub>2</sub> y humedad relativa del 100%.

### **5.3 Vectores Plasmídicos y Transfección**

A partir del vector comercial pSPORT1-IGF1 LIFESEQ780074 portador del cDNA del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 humano de Open Biosystems, Inc. (Huntsville, USA), se realizaron digestiones con las enzimas de restricción NotI/Sall, se liberó un fragmento de 780pb que posteriormente fue sub-clonado al vector pCMV-Sport6, dirigiendo la expresión del factor IGF-I un promotor de citomegalovirus (Figura 1). El plásmido pCIneo, portador del cDNA del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2, fue proporcionado por la Dra. Claudia Heilmann de la Universidad de Freiburg, Alemania. Esta clona, fue caracterizada mediante digestiones con las enzimas de restricción NheI/XbaI liberando un fragmento de 868pb. Ambas clonas se caracterizaron por secuenciación (Figura 2). Como gen reportero,

se empleó el vector pGREEN LANTERN™-1 (Invitrogen™ Life Technologies. Carlsbad, CA, EUA) que expresa la proteína verde fluorescente y los núcleos fueron teñidos con el reactivo 4',6-diamidino-2-fenilindol o DAPI (Invitrogen™ Life Technologies. Carlsbad, CA, EUA), el cual tiene alta afinidad hacia los ácidos nucleicos (Figura 3). Se realizaron protocolos básicos para la preparación de bacterias *Escherichia coli* Top-10 calcio competentes y su posterior transformación. Para la preparación de DNA plasmídico (Mini-prep), se siguieron las instrucciones del estuche comercial Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega Corporation, USA). La purificación de bandas se realizó mediante el estuche Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, USA). Se prepararon y se purificaron muestras de los plásmidos, para utilizarlos en los ensayos de transfección mediante una mediana escala (QIAGEN® Plasmid Midi Kit [QIAGEN Inc. USA]) y se cuantificaron empleando el NanoDrop 3300 (Thermo Scientific, USA). Se eligió el reactivo Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen™ Life Technologies. Carlsbad, CA, EUA) como método para la transfección transitoria. Las condiciones para las co-transfecciones se establecieron de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial (5µl Lipofectamine™ 2000, por µg DNA) y a una confluencia celular del 90%. Se probaron diferentes concentraciones de DNA, así como de lipofectamina 2000 y se decidió que a una concentración de 1.5 µg de DNA plasmídico y 10 µl de lipofectamina 2000, se pudo detectar la expresión de la proteína verde fluorescente. En el caso de las co-transfecciones, se emplearon 750µg de DNA plasmídico.

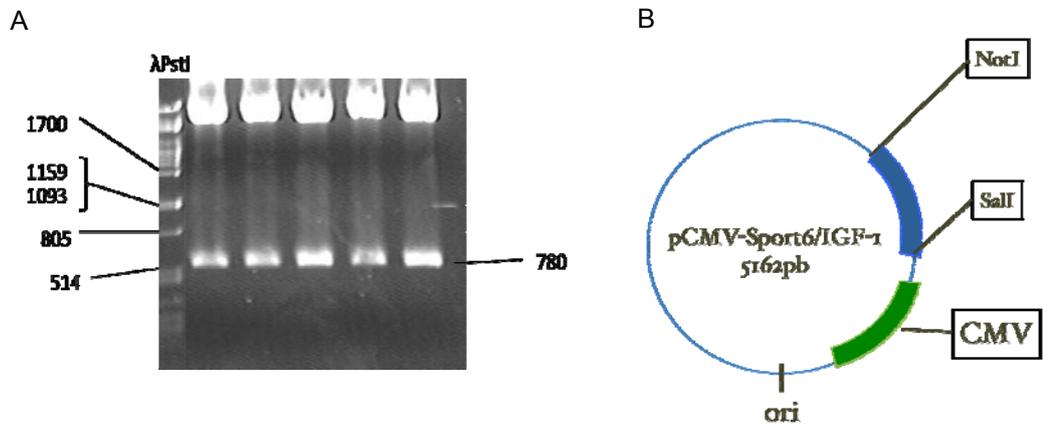


Figura 1. Plásmido y fragmentos digeridos mediante restricción. A) Vector pSPORT1 y el fragmento de 780pb correspondiente a hIGF-1. B) Vector pCMV-Sport6/hIGF-1 con su promotor CMV.

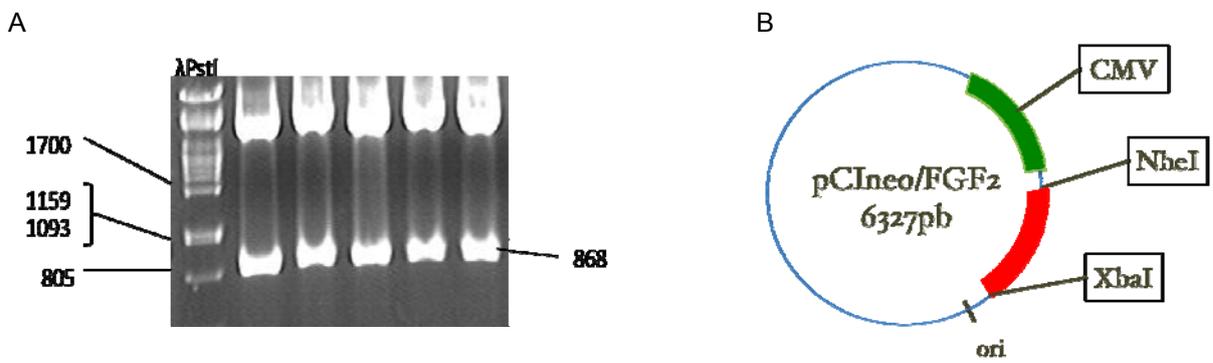


Figura 2. Plásmido y fragmentos digeridos mediante restricción. A) Vector pCIneo/FGF-2 y el fragmento de 868pb correspondiente a hFGF-2. B) Vector pCIneo/FGF-2 con su promotor CMV.

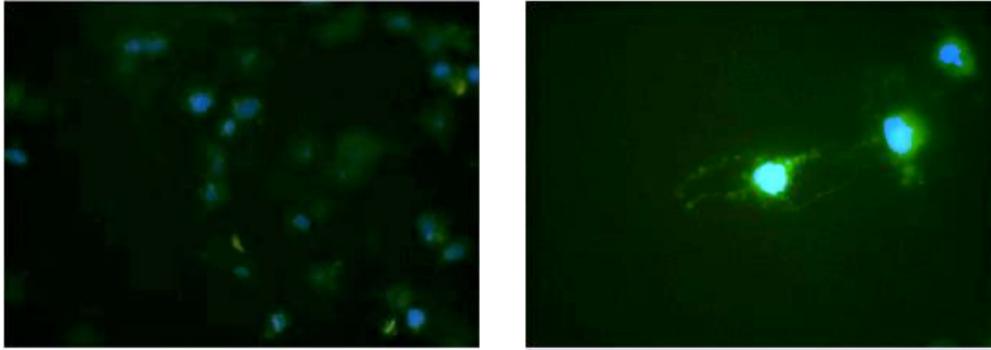


Figura 3. Condrocitos co-transfectados expresando la proteína verde fluorescente. Los núcleos se observan de color azul debido a que fueron marcados con DAPI.

#### **5.4 Inclusión de Condrocitos en una Matriz de Fibrina**

A las 24 horas post-transfección, los condrocitos fueron despegados mediante digestión con tripsina/EDTA 2.5% y se incluyeron, en experimentos por separado,  $15 \times 10^6$  células transfectadas y sin transfectar en un medio tridimensional, empleando un adhesivo comercial a base de fibrina (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.

#### **5.5 Cultivo Dinámico**

Una vez incluidos los condrocitos humanos en la matriz tridimensional a base de fibrina (Figura 4A), se realizaron cubos de aproximadamente  $10\text{mm}^3$  y de  $3\text{mm}^3$ , de tal manera, que se pudo determinar, que con fragmentos de  $3\text{mm}^3$ , el medio podía fluir libremente a través de la matriz tridimensional (Figura 4B). Como sistema de agitación continua, se eligió el frasco “spinner” (Wheaton Industries Inc, USA) con 25 ml de medio completo (Optimem I/SFB 10%/gentamicina  $5\mu\text{g}$ ) y en una incubadora bajo condiciones atmosféricas controladas de 5% de  $\text{CO}_2$ . Se eligió este sistema de agitación debido a que

se pueden desarrollar varios experimentos al mismo tiempo, además de proporcionar fuerzas hidrodinámicas a las células que se encuentran en el interior, recibiendo nutrientes para sobrevivir y sintetizar las proteínas que constituyen la matriz extracelular del cartílago articular (Figura 5). Se determinó que para mover las muestras, basta una velocidad de agitación constante de 40rpm. Se tomaron muestras de los cubos de fibrina más condrocitos por triplicado cada 7 días durante cuatro semanas y se recolectó el medio para realizar las pruebas moleculares, histológicas e inmunohistoquímicas.

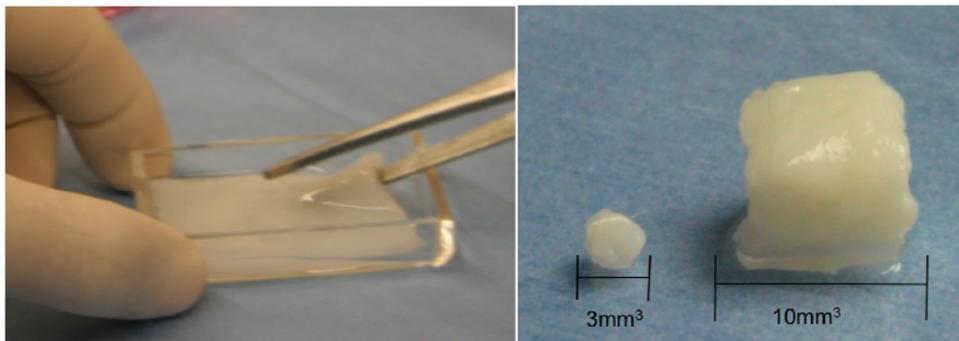


Figura 4. Preparación de la fibrina. A. La matriz acarreadora contiene condrocitos en su interior. B. Cubos de fibrina de  $3\text{mm}^3$  y  $10\text{mm}^3$ .

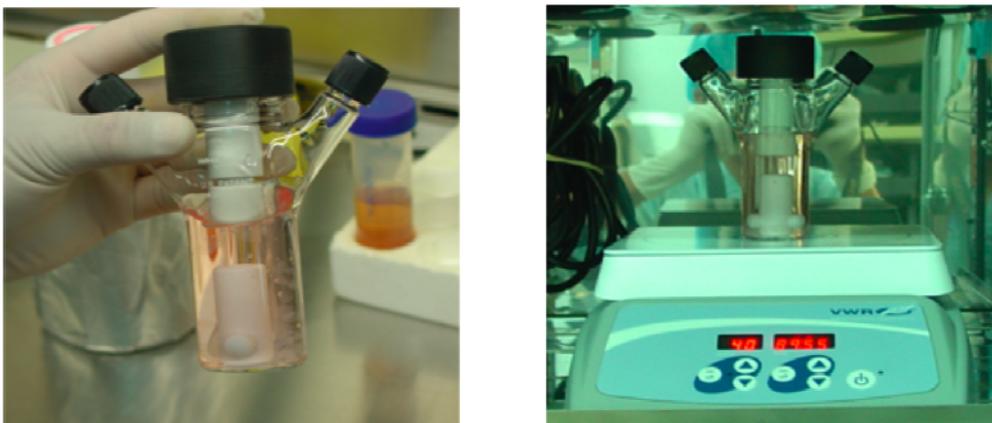


Figura 5. Cultivo dinámico de condrocitos incluidos en una matriz de fibrina.

## **5.6 Adición de Factores de Crecimiento al Medio**

De manera preliminar a los ensayos de transfección y con el propósito de utilizarlos como control, se realizaron ensayos en los que el medio de cultivo se suplementó con 5 µg/ml tanto de cada una de las proteínas recombinante humana IGF-1 (catálogo #13769, Sigma, St. Louis, Mo), como de FGF-2 (catálogo #F0291, Sigma, St. Louis, Mo). Se realizaron ensayos con cada una de las proteínas recombinantes por separado y con una combinación de ambas (10 µg/ml totales).

## **5.7 Western Blot**

Las proteínas contenidas en el medio de cultivo fueron precipitadas mediante metanol-cloroformo. Se adicionaron 50 µg de proteína a un gel de acrilamida al 12% y fueron separadas en condiciones desnaturalizantes durante 4 horas a 70 Volts. Las proteínas fueron transferidas a un membrana de PVDF (Sigma, St. Louis, Mo) durante 18 horas a 30 Volts. Para su detección se siguieron las indicaciones del kit comercial AmpliCruz™ Western Blot Signal Enhancement System (Santa Cruz Biotechnology, Inc). Los anticuerpos primarios fueron FGF basic antibody (ab10420) 1:1000 y IGF1 antibody (ab9572) 1:3000, el anticuerpo secundario fue Rabbit IgG secondary antibody-H&L (ab6721) de Abcam plc (Cambridge, MA). A manera de control, se empleó el gen de la β-actina (Invitrogen™ Life Technologies. Carlsbad, CA, EUA). Para visualizar las proteínas se empleó el kit Chemiluminescence Luminol Reagent (sc-2048) de Santa Cruz.

## 5.8 Extracción de RNA y RT-PCR

Se obtuvo RNA de los especímenes colectados cada 7 días siguiendo el protocolo de extracción establecido por el estuche de la marca comercial Purescript® de Gentra Systems Inc (Minneapolis, Mn, EUA). Se utilizaron iniciadores específicos para la detección del gen constitutivo GAPDH, así como para colágeno tipo II y colágeno tipo I (Tabla I). El estuche empleado para la RT-PCR fue Advantage® RT-for-PCR Kit (Clontech, Takara Bio Inc. Japan) estas reacciones se montaron en el termociclador Geneamp PCR System 9700 de Applied Biosystems. Las condiciones para la amplificación por PCR de colágeno I fueron 94°/5 min, 35 ciclos (94°/30 seg, 68°/30 seg, 72°/1 min) y 72°/3min, para colágeno de tipo II 94°/5 min, 35 ciclos (94°/30 seg, 65°/30 seg, 72°/1 min) y 72°/3min y para GAPDH 94°/5 min, 35 ciclos (94°/1 min, 60°/1 min, 72°/1 min) y 72°/5min. El volumen para cada reacción se detalla en la tabla 2 y se empleó el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, USA). 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.

Primer	Secuencia	Producto
Colágeno I	5'ATGACGTGATCTGTGACGAGAC 3' 3'GCAGCACCCAGTAGCACCATCAT 5	737
Colágeno II	5'AGACATCAAGGATATTGTAGG 3' 3'CAGCTTCACCATCATCACCAG 5	403
GAPDH	5'AAGATGGCCCAGGAGAACCCCAAG 3' 5'TAATCCTTCATGTGCACCGCCCTG 3	980

Tabla II. Volumen empleado para la reacción de GAPDH, colágeno I y II.

Componentes	Volumen µl
H <sub>2</sub> O	2.5
Master Mix	5
Mix de Oligos	0.5
DNA	2.0
Total	10.0

### 5.9 Histología e Inmunohistoquímica

Las muestras se fijaron con paraformaldehído al 4% 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 (3 $\mu$ ). Se fijaron con albúmina y se incluyeron en xilol por 10 minutos, después se re-hidrataron en concentraciones decrecientes de alcohol etílico, es decir, 100%, 98% y 85% (20 inmersiones c/u), el proceso concluyó con recuperación en agua. Para la detección de los glucosaminoglicanos producidos por los condrocitos incluidos en la fibrina se siguió la técnica de Safranina O. Para la detección de las fibras de colágeno dispuestas en la nueva matriz extracelular, se utilizaron anticuerpos primarios específicos para la detección de colágeno I y para colágeno II (1:50) Abcam plc (Cambridge, MA, EUA) al implante de fibrina/condrocitos. Como sistema de detección inmunohistoquímico se emplearon los kits mouse ABC Staining System (sc-2017) y rabbit ABC Staining System (sc-2018) de Santa Cruz Biotechnology, Inc. 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 y se analizaron con el software Image-Pro Express Vs 6.2 ( Media Cybernetics, Inc) que estima la densidad óptica estándar determinando la cantidad de materia en un objeto midiendo la cantidad de luz que pasa a través de dicho objeto. De acuerdo al análisis digital de las imágenes, los valores densitométricos de las bandas de ácidos nucleicos y proteínas se obtienen como resultado de cuantificar el área y densidad óptica media (DOM) de cada banda aislada y se determina la densidad óptica media

tomando en cuenta el fondo en una región del gel donde la fluorescencia existente es debida solamente a uniones inespecíficas del BrEt. Los resultados se expresaron como el promedio  $\pm$  desviación estándar (n=3) y una seguridad del 95% de significancia estadística (p<0.05). La fórmula asume un decaimiento exponencial de la luz dentro del objeto. Densidad óptica (x, y)=  $-\log[(\text{intensidad}(x, y)-\text{Negro}) / (\text{Incidencia}-\text{Negro})]$ . En Donde: Intensidad (x, y) es la intensidad del pixel (x, y). Negro es la intensidad generada cuando no hay luz a través del objeto.

## CAPÍTULO VII

### DISCUSIÓN

El cartílago articular es un tejido de origen conjuntivo, con un coeficiente de fricción extremadamente bajo y que distribuye las cargas. Los daños al cartílago articular, representan patologías clínicas encontradas comúnmente durante la práctica médica. La exposición del cartílago a cualquier agente que sea capaz de provocar alguna lesión puede suprimir la síntesis de proteoglicanos y estimular el proceso de degeneración del cartílago articular<sup>152</sup>. Los procesos fisiológicos de reparación del cartílago son tan limitados que cuando ocurre un defecto sobre la superficie, resulta casi imposible la auto reparación<sup>153</sup>. Sin embargo, estos defectos pueden ser rellenos con un tejido a base de fibrocartílago, que promueve una reparación débil en estructura y resistencia mecánica<sup>154</sup>. Los proteoglicanos y las fibras de colágeno son las macro moléculas más abundantes que colaboran al mantenimiento y adecuado funcionamiento del cartílago. Existen diferentes factores de crecimiento que estimulan el desarrollo e incluso promueven la reparación del cartílago hialino<sup>155</sup>. El hFGF2, es un factor mitogénico para condrocitos articulares<sup>137, 156</sup> y se ha descrito que posee efectos pleiotrópicos, es decir, estimula e inhibe la deposición de proteoglicanos dependiendo de su concentración y del sistema de cultivo empleado<sup>137, 156, 157, 158</sup>. G. Kaul y Cols, probaron la hipótesis que la sobre-expresión de hFGF2 mediante transfecciones a condrocitos incluidos en alginato promueven la reparación de defectos de espesor completo en el cartílago articular de conejos y que liberaban la proteína por al menos un mes

In Vitro <sup>159</sup>. En el presente estudio, pudimos detectar la presencia de hFGF2 en el medio hasta por 30 días, lo que podría representar una ventaja en ensayos In Vivo, pues se ha inyectado de manera intra-articular la proteína a altas dosis durante dos semanas. Sin embargo, hFGF2 tiene una vida promedio menor a 24 horas<sup>160</sup>. Marja y Cols, examinaron el efecto de hFGF2 sobre los niveles de RNAm de pro-colágeno  $\alpha$  I, e identificaron un mecanismo transcripcional en donde FGF-2 inhibe la expresión de colágeno I <sup>161</sup>. En nuestro trabajo, pudimos observar, que hIGF1 y hFGF2 tienen un efecto inhibitorio sobre la expresión de colágeno tipo I, comparado con el medio sin suplemento. hIGF1, es un factor que juega un papel importante en la fisiología del cartílago<sup>138</sup> y se ha demostrado que estimula la síntesis de proteoglicanos así como la proliferación y diferenciación de células mesenquimales e interviene en la regulación del crecimiento promovida por la hormona del crecimiento sobre el cartílago y hueso<sup>162</sup>. Tyler y Cols reportaron que la exposición de condrocitos a IGF1 In Vitro potenciaba su proliferación y mantenía su fenotipo durante el cultivo celular<sup>163</sup>. Jenniskens y Cols incluyeron condrocitos de bovino en perlas de alginato, adicionaron IGF-I y observaron un aumento en la deposición de colágeno II y proteoglicanos, mientras que el colágeno tipo I solo se depositó en la superficie, esto revelado mediante inmunohistoquímica<sup>164</sup>. En este estudio, reportamos la presencia de colágeno II, en zonas extensas del implante, bajo todas las condiciones de estímulo. El efecto mas evidente fue al combinar los factores de crecimiento. Veilleux y Cols incluyeron condrocitos de canino en una matriz de colágeno/GAG y adicionaron FGF-2 y/o IGF. Reportaron mayor deposición de colágeno tipo II y GAG's por el estímulo de FGF2<sup>165</sup>. Sin

embargo, los ensayos los realizaron bajo condiciones de cultivo estático. Takahasi y Cols, probaron 12 factores de crecimiento para evaluar la proliferación de condrocitos humanos. El efecto más favorable fue entre IGF1 y FGF2<sup>166</sup>. Estudios recientes sugieren que hFGF2 no solo aumenta la proliferación celular durante la expansión en monocapa, sino que también promueven el potencial de rediferenciación y de respuesta a los factores de crecimiento durante un cultivo tridimensional<sup>167</sup>. Se ha demostrado que FGF2 promueve la proliferación y síntesis de GAG's en condrocitos cultivados en monocapa<sup>168</sup>. Los glicosaminoglicanos tienen carga negativa en el sulfato carboxilado y pueden captar iones Ca<sup>++</sup> y Na<sup>++</sup>, propiedad que les da una gran capacidad de atraer agua. Cuando se ejerce una presión sobre el cartílago, su deformación ocurre de manera gradual, a medida que las moléculas de agua se desplazan del interior de los proteoglicanos hacia la superficie articular. Cuando la fuerza cesa, estas moléculas de agua vuelven a su localización inicial, atraídas por la fuerte carga negativa de los proteoglicanos, restableciéndose la estructura del cartílago. Esta capacidad de amortiguación ejercida por los proteoglicanos, hace que las fuerzas lleguen parcialmente disipadas a la red de colágeno, que es la responsable final de la estructura tridimensional del cartílago<sup>169</sup>. Es muy alentador observar en nuestros ensayos la presencia progresiva de los GAG's, lo que sugiere la posibilidad de tener un tejido funcional, debido a sus propiedades de estas macromoléculas para retener agua, aunado a un incremento en la proporción de colágeno II y una disminución en el colágeno I. Aún falta por hacer un análisis de resistencia para el implante como estudios reométricos, ensayos de proliferación celular, así como identificar los

GAG's sintetizados en la nueva matriz, así como el tiempo máximo de expresión de los factores en los condrocitos transfectados. También se podría determinar que otros tipos de colágeno que se encuentran implicados en la diferenciación o atrofia del cartílago, se ven afectados en este tipo de experimentos. Otra posibilidad interesante será probar el efecto de los factores de crecimiento en condrocitos incluidos en otras matrices e investigar otros factores de crecimiento en nuestro modelo. Escalar el modelo a implantes de mayor tamaño y concentración celular, para finalmente hacer pruebas con modelos In Vivo. Se han empleado diferentes métodos de agitación continua, como bioreactores, sistemas de perfusión o técnicas complejas que favorecen el libre flujo de los medios de cultivo a través de las matrices celulares. Para este trabajo, el frasco "spinner" representó un sistema capaz de mantener en movimiento los implantes con un volumen reducido de medio de cultivo, además que permitió realizar varios experimentos de manera simultánea. Este método, en general, permitió desde la primer semana de cultivo y para todas las condiciones, la presencia de fibras de colágeno alrededor de las condronas, así como de fibras de glicosaminoglicanos ordenándose en forma de hebras.

# CAPÍTULO VIII

## CONCLUSIONES

No observamos diferencia entre transfectar a los condrocitos y adicionar proteínas recombinantes al medio. Consideramos que este reporte, podría favorecer al diseño de matrices “inteligentes” capaces de estimular la proliferación y diferenciación de células incluidas en su interior. Además de evitar el estrés que representa someter al condrocito a una manipulación genética.

Gracias a la detección de fibras de colágeno tipo II y su extensión progresiva a través de la matriz de fibrina, así como a la disminución de las fibras de colágeno tipo I, por efecto de los factores de crecimiento adicionados o liberados al medio de cultivo por condrocitos transfectados, se pudo generar un bio-implante de neo-cartílago In Vitro, empleando un sistema de agitación sencillo, que permite ensayos reproducibles y de bajo costo.

La capacidad del cartílago para soportar las presiones generadas durante la carga, depende en gran medida, de la integridad de las fibras de colágeno y del mantenimiento de proteoglicanos que ocupan los espacios comprendidos entre estas fibras colágenas. La presencia de los GAG's en nuestro modelo, sugiere la posibilidad de obtener un tejido funcional, debido a la naturaleza de estos polisacáridos para retener agua.

Consideramos que este podría ser el primer reporte de condrocitos humanos incluidos en fibrina, cultivados en un medio dinámico y con la adición al medio o la sobre-expresión de hIGF-1 y hFGF-2, de manera individual o en conjunto.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cohen ZA, McCarthy DM, Kwak SD, Legrand P, Fogarasi F, Ciaccio EJ, Ateshian GA. Knee cartilage topography, thickness, and contact areas from MRI: in-vitro calibration and in-vivo measurements. *Osteoarthritis Cartilage*. 1999;7(1):95-109.
2. 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.
3. Kuettner KE, Schleyerbach R, Hascall VC. *Articular cartilage biochemistry*. New York; 1987.
4. Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage. *J Biomech* 1984; 102:73-84.
5. Chesterman PJ, Smith AU. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg* 1968; 50B:184-197.
6. Ghivizzani SC, Oligino TJ, Robbins PD, Evans CH. Cartilage injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2000; 11:289-307.
7. Stockwell RA. The cell density of human articular and costal cartilage. *J Anat* 1967; 101:753-763.
8. Gersh I, Catchpole MR. The nature of ground substance of connective tissue. *Perspect Biol Med* 1960; 3:282.
9. Ghadially FN. *Fine structure of sinovial joints. A text and atlas of the ultrastructure of normal and pathological articular tissues*. London: Butterworths; 1983.
10. Hunter W. On the structure and diseases of articulating cartilages. *Philos Trans Roy Soc London* 1743; 6:514-521.
11. Weiss C, Rosemberg L, Helfet AJ. An structural study of normal young adult human articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1968; 50A:663-674.
12. Davies DV, Barnett CH, Cochran W, Palfre AJ. Electron microscopy of articular cartilage in the young adult rabbit. *Ann Rheum Dis* 1962; 21:11-22.
13. Van Dijk CN, Reilingh ML, Zengerink M, van Bergen CJ. Osteochondral defects in the ankle: why painful?. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010. May;18(5):570-80.
14. Greene GW, Zappone B, Söderman O, Topgaard D, Rata G, Zeng H, Israelachvili JN. Anisotropic dynamic changes in the pore network structure,

fluid diffusion and fluid flow in articular cartilage under compression. *Biomaterials*. 2010 Apr;31(12):3117-28.

15. Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med*. 2005 Feb;33(2):295-306.

16. Van der Rest M, Mayne R. Type IX collagen proteoglycan from cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. *J Biol Chem* 1988; 263:1615-1618.

17. Maroudas, A.: Physicochemical properties of articular cartilage. In: *Adult articular cartilage*, Freeman, M. A. R. ed 1979., pp. 215-290.

18. Muir H. Proteoglycans as organizers of the extracellular matrix. *Biochem Soc Trans* 1983; 11:613-622.

19. Poole AR. Proteoglycans in health and disease: structure and functions. *Biochem J* 1986; 236:1-14.

20. Maroudas A. Physicochemical properties of cartilage in the light of ion-exchange theory. *Biophys J* 1968; 8:575-595.

21. Maroudas A, Muir, H, Wingham J. The correlation of fixed negative charge with glycosaminoglycan content of human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 1969; 177:492.

22. Maroudas A. Biophysical chemistry of cartilaginous tissues with special reference to solute and fluid transport. *Biorheology* 1975; 12:233-248.

23. Armstrong C G, Mow VC. Variations in the intrinsic material properties of human articular cartilage with age, degeneration and water content. *J Bone Joint Surg* 1982; 64A:88-94.

24. Lai WM, Hou JS, Mow VC. A triphasic theory for the swelling properties of hydrated charge soft biological tissues. In: Mow VC, Rattcliffe A, Woo SLY, editors. *Biomechanics of diarthrodial joints*. vol I. New York: Springer-Verlag; 1990. p283-312.

25. Mow VC, Kuei SC, Lai WM, Armstrong CG. Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression: theory and experiment *J Biomech Eng* 1980; 102:73-84.

26 Mow VC, Lai WM. Recent developments in synovial joint biomechanics. *SIAM Rev* 1980; 22:275-317.

27. Mow VC, Holmes MH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: A review. *J Biomech* 1984; 102:73-84.

28. Mow VC, Schoonbeck JM. Contribution of Donnan osmotic pressure

towards the biphasic compressive modulus of articular cartilage. *Trans Orthop Res Soc* 1984; 9:262.

29. Roth V, Mow VC, Lai WM, Eyre DR. Correlation of intrinsic compressive properties of bovine articular cartilage with its uronic acid and water content. *Trans Orthop Res Soc* 1981; 6:21.

30. Buckwalter JA, Hunziker E, Rosemberg L, Coutts R. Articular Cartilage: Composition and structure, In: Woo SL, Buckwalter JA, editors. *Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues*. Park Ridge IL, AAOS; 1988. p405-425.

31. Leidy J. Citado por Trueta, J. *La estructura del cuerpo humano. Estudios sobre su desarrollo y decadencia*. Barcelona: Labor. 1974.

32. Fisher AGT. Contribution to the pathology and etiology of osteo-arthritis: with observations upon the principles underlying its surgical treatment. *British J Surg* 1922; 10:52- 80.

33. Ito LK. The nutrition of articular cartilage and its methods of repair. *Br J Surg* 1924; 45:31-42.

34. Brower T D, Akahosi Y, Orlic P. The diffusion of dyes through articular cartilage in vivo. *J Bone Joint Surg* 1962; 44A:456-463.

35. Maroudas A, Bullough P, Swanson SAV, Freeman MAR. The permeability of articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1968; 50B:166-177.

36. Ingelmark BE. The nutritive (Suppl 1)y and nutritional value of synovial fluid. *Acta Orthop Scand* 1950; 20:156-165.

37. Harrison MHM, Schajowicz F, Trueta J. Osteoarthritis of the hip: a study of the nature and evolution of the disease. *J Bone Joint Surg* 1953; 35B:598-626.

38. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998; 28:192-202.

39. Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Repair of articular cartilage defects: part I. Basic Science of cartilage healing. *Am J Orthop* 1999; 28:31-33.

40. Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE. Repair of articular cartilage defects: part II. Treatment options. *Am J Orthop* 1999; 28:88-96.

41. Farnworth L. Osteochondral defects of the knee. *Orthopedics* 2000; 23:146-159.

42. Goldberg VM, Caplan AI. Biological resurfacing: an alternative to total joint arthroplasty. *Orthopedics* 1994; 17:819-821.

43. Hayes DW Jr, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury, and repair. *Clin Podiatr Med Surg* 2001; 18:35-53.
44. Jackson DW, Scheer MJ, Simon TM. Cartilage substitutes: overview of basic science and treatment options. *J Am Acad Orthop Surg* 2001; 9:37-52.
45. Schachar NS, Novak K, Muldrew K, Zernicke RF, McGann LE. Articular cartilage joint surface reconstruction techniques. *J Orthop Sci* 1999; 4:457-461.
46. Thornhill TS. Cartilage resurfacing: facts, fictions, and facets. *Orthopedics* 1997; 20:819-820.
47. Crelin ES, Southwick WO. Changes induced by sustained pressure in the knee joint articular cartilage of adult rabbits. *Anat Rec* 1964; 149: 113-133.
48. Ely LW, Mensor MC. Studies on the immobilization of normal joints. *Surg Gynec Obstet* 1933; 57:212-215.
49. Hall MC. Cartilage changes after experimental immobilization of the knee joints of the young rat *J Bone Joint Surg* 1963; 45:36-44.
50. Salter RB, Field P. The effects of continuous compression on living articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1960; 42A:31-49.
51. Thaxter TH, Mann RA, Anderson CE. Degeneration of immobilized knee joints in rats. *J Bone Joint Surg* 1965; 47A:567-585.
52. Trias A. Effect of persistent pressure on the articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1961; 43B:376-386.
53. Donohue JM, Buss D, Oegema TR, Thompson RC. The effects of indirect blunt trauma on adult canine articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1983; 65: 948-957.
54. Repo RU, Finlay JB. Survival of articular cartilage after controlled impact. *J Bone Joint Surg* 1977; 59A:1068-1076.
55. Meachim G. The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 1963; 45B:150-16.
56. Simmons DP, Chrisman OD. Salicylate inhibition of cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 1965; 8:960-969.
57. Schmid A, Schmid F. Results after cartilage shaving studied by electron microscopy. *Am J Sports Med* 1987; 15:386-387.
58. Kim, H. K. W.; Moran, M. E.; Salter, R. B.: The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. *J. Bone Joint Surg.*, 73A: 1301-1315, 1991.

59. Hunziker EB, Rosenberg LC. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg* 1996; 78A:721-733.
60. Mankin HJ. Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. I. Growth in immature cartilage. *J Bone Joint Surg* 1962; 44A:682-688.
61. Mankin HJ. Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. II. Repair in immature cartilage. *J Bone Joint Surg* 1962; 44:688-698.
62. Ham AW. A histological study of early phases of bone repair. *J Bone Joint Surg* 1930; 12A: 827-844.
63. Gastaldi E, Gomar F. Comportamiento del regenerado de cartílago en superficie articular de carga. Estudio experimental. Fundación MAPFRE. Artrosis; Madrid; 1985. p. 241-253.
64. Bennett GA, Bauer W. Further studies concerning the repair of articular cartilage in dog joints. *J Bone Joint Surg* 1935; 17:141-150.
65. De Palma AF, McKeever CD, Subin DK. Process of repair of articular cartilage. Demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine. *Clin Orthop* 1966; 48:229-242.
66. Convery FR, Akeson WH, Keown GH. The repair of large osteochondral defects. An experimental study in horses. *Clin Orthop* 1972; 82:253-263.
67. Reddi AH. Extracellular bone matrix dependent local induction of cartilage and bone. *J Rheumatol* 1983; 10 (Suppl 1) 11:67-69.
68. Hoikka VEJ, Jaroma HJ, Ritsilä VA. Reconstruction of the patellar articulation with periosteal grafts. 4-year follow-up of 13 cases. *Acta Orthop Scand* 1990; 61:36-39.
69. Salter RB. Motion versus rest: Why immobilize joints? *J Bone Joint Surg* 1982; 64B:251-254.
70. Minas T, Gomoll AH, Rosenberger R, Royce RO, Bryant T. Increased failure rate of autologous chondrocyte implantation after previous treatment with marrow stimulation techniques. *Am J Sports Med*. 2009 May;37(5):902-8.
71. Safran MR, Seiber K. The evidence for surgical repair of articular cartilage in the knee. *J Am Acad Orthop Surg*. 2010 May;18(5):259-66.
72. Zeifang F, Oberle D, Nierhoff C, Richter W, Moradi B, Schmitt H. Autologous chondrocyte implantation using the original periosteum-cover technique versus matrix-associated autologous chondrocyte implantation: a randomized clinical trial. *Am J Sports Med*. 2010 May;38(5):924-33.

73. Pandit H, Aslam N, Pirpiris M, Jinnah R. Total knee arthroplasty: the future. *J Surg Orthop Adv.* 2006 Summer;15(2):79-85.
74. Curtin W, Reville W, Heapes M, Lyons J, Muckle D. The chondrogenic potential of carbon fiber and carbon fiber periosteum implants: an ultrastructural study in the rabbit. *Osteoarthritis Cartilage.* 1994 Dec;2(4):253-8.
75. Ranawat AS, Vidal AF, Chen CT, Zelken JA, Turner AS, Williams RJ 3rd. Material properties of fresh cold-stored allografts for osteochondral defects at 1 year. *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Aug;466(8):1826-36.
76. Muller S, Breederveld RS, Tuinebreijer WE. Results of osteochondral autologous transplantation in the knee. *Open Orthop J.* 2010 Feb 17;4:111-4.
77. Feczko P, Hangody L, Varga J, Bartha L, Diószegi Z, Bodó G, Kendik Z, Módis L. Experimental results of donor site filling for autologous osteochondral mosaicplasty. *Arthroscopy.* 2003 Sep;19(7):755-61.
78. Smith AU. Survival of frozen chondrocytes isolated from cartilage of adult mammals. *Nature* 1965; 205:782-784.
79. Itay S, Abramovici A, Nevo Z. Use of cultured embryonal chick epiphyseal chondrocytes as grafts for defects in chick articular cartilage. *Clin Orthop* 1987; 124:237- 250.
80. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K. Repair of rabbits articular cartilage surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg* 1989; 71B:74-80.
81. Breinan HA, Minas T, Hsu HP, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am.* 1997; 79:1439-51.
82. Brittberg M, Nilsson A, Lindahl A, Ohlsson C, Peterson L. Rabbit articular cartilage defects treated with autologous cultured chondrocytes. *Clin Orthop.* 1996;(326):270-283.
83. Brittberg M. Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop.* 1999 Oct; 367 (Suppl 1):147-155.
84. Gillogly SD, Voight M, Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998; 28:241-251.
85. Messner K. Cartilage replacement operation using pre-cultured cell. *Orthopade.* 1999; 28:61-67.
86. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Hsu HP, Minas T, Shortkroff S, Sledge CB, Yannas IV, Spector M. Chondrocyte-seeded collagen matrices

implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials*. 1998; 19:313-328.

87. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9 year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop*. 2000 ; 374:212-234.

88. Shortkroff S, Barone L, Hsu HP, Wrenn C, Gagne T, Chi T, Breinan H, Minas T, Sledge CB, Tubo R, Spector M. Healing of chondral and osteochondral defects in a canine model: the role of cultured chondrocytes in regeneration of articular cartilage. *Biomaterials*. 1996;17:147-154.

89. Schnabel, M., Marlovits, S., Eckhoff, G., Fichtel, I., Gotzen, L., Vécsei, V., Schlegel, J. (2002) Differentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture *Osteoarthritis and Cartilage* 10: 62-70.

90. Diaz-Romero J, Gaillard JP, Grogan SP, Nestic D, Trub T, Mainil-Varlet P. Immunophenotypic analysis of human articular chondrocytes: changes in surface markers associated with cell expansion in monolayer culture. *J Cell Physiol*. 2005 Mar;202(3):731-42.

91. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. (2002). Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis research*, 4 Suppl 3, S63-8.

92. Dell'Accio F, De Bari C, Luyten FP. Microenvironment and phenotypic stability specify tissue formation by human articular cartilage-derived cells in vivo. *Exp Cell Res* 2003 Jul 1;287(1):16-27.

93. Schulze-Tanzil, G., A. Mobasheri, P. de Souza, T. John, M. Shakibaei (2004) Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 12: 448-458.

94. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*. 1982 Aug;30(1):215-24.

95. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp. Cell Res*. (1998) 238: 265-272

96. Tallheden T, Karlsson C, Brunner A, Van Der Lee J, Hagg R, Tommasini R, Lindahl A. Gene expression during redifferentiation of human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004 Jul;12(7):525-35.

97. Jakob, M., O. Demarteau, D. Schafer, B. Hintermann, W. Dick, M. Heberer, and I. Martin. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem*

81:368–377.2001.

98. Martin I; Suetterlin R; Baschong W; Heberer M; Vunjak-Novakovic G; Freed L, E. Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *Journal of cellular biochemistry* 2001;83(1):121-8.

99. Barbero A, Grogan S, Schafer D, Heberer M, Mainil-Varlet P, Martin I: Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis Cartilage* 2004, 12:476-484.

100. Peterson L. Cartilage cell transplantation. In: Malek, ed. *Knee Surgery: Complications, Pitfalls and Salvage*. New York: Springer, 2001:440.

101. Peterson L, Brittberg M, Kiwiranta I, et al. Autologous chondrocyte transplantation: biomechanics and long term durability. *Am J Sports Med* 2002; 30:2.

102. Peterson L. International experience with autologous chondrocyte transplantation. In: Insall JN, Scott WN, eds. *Surgery of the Knee*, vol. 1, 3rd ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2001:341.

103. Steinwachs M R; Erggelet C; Lahm A; Gohlke-Steinwachs U. Clinical and cell biology aspects of autologous chondrocytes transplantation. *Der Unfallchirurg* 1999;102(11):855-60.

104. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002 Feb 8;295(5557):1009-14.

105. Vasita R.,Katti D.S. (2006) Growth factor-delivery systems for tissue engineering:a materials perspective *Expert Rev Med Devices*, 3 (1),pp.29-47

106. Kemp KC, Hovs J, Donaldson C. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Lymphoma*. 2005 Nov;46(11):1531-44.

107. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng*. 2005 May-Jun;11(5-6):787-802.

108. Noël D, Djouad F, Jorgense C. Regenerative medicine through mesenchymal stem cells for bone and cartilage repair. *Curr Opin Investig Drugs*. 2002 Jul;3(7):1000-4.

109. Giroto 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 Aug;24(19):3265-75.

110. Ballas CB, Zielske SP, Gerson SL. Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *J Cell Biochem Suppl*. 2002;38:20-8.

111. Pavesio A, Abatangelo G, Borrione A, Brocchetta D, Hollander AP, Kon E, Torasso F, Zanasi S, Marcacci M. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft

C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp.* 2003;249:203-17; discussion 229-33, 234-8, 239-41.

112. Tonello C, Zavan B, Cortivo R, Brun P, Panfilo S, Abatangelo G. In vitro reconstruction of human dermal equivalent enriched with endothelial cells. *Biomaterials.* 2003 Mar;24(7):1205-11.

113. Galassi G, Brun P, Radice M, Cortivo R, Zanon GF, Genovese P, Abatangelo G. In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the HA-based supporting scaffold. *Biomaterials.* 2000 Nov;21(21):2183-91.

114. Huang Q, Goh JC, Hutmacher DW, Lee EH. In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and the potential for in situ chondrogenesis. *Tissue Eng.* 2002 Jul;8(3):469-82.

115. Caterson EJ, Nesti LJ, Li WJ, Danielson KG, Albert TJ, Vaccaro AR, Tuan RS. Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/alginate amalgam. *J Biomed Mater Res.* 2001 Dec 5;57(3):394-403.

116. Schubert T, Anders S, Neumann E, Schölmerich J, Hofstädter F, Grifka J, Müller-Ladner U, Libera J, Schedel J. Long-term effects of chondrospheres on cartilage lesions in an autologous chondrocyte implantation model as investigated in the SCID mouse model. *Int J Mol Med.* 2009 Apr;23(4):455-60.

117. Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001;9 Suppl A:S36-40.

118. Sekiya I, Colter DC, Prockop DJ. BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Jun 8;284(2):411-8.

119. Majumdar MK, Wang E, Morris EA. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J Cell Physiol.* 2001 Dec;189(3):275-84.

120. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Apr 2;99(7):4397-402.

121. Bilgen B, Barabino GA. Location of scaffolds in bioreactors modulates the hydrodynamic environment experienced by engineered tissues. *Biotechnol Bioeng*. 2007 Sep 1;98(1):282-94.
122. Vunjak-Novakovic G, Goldstein SA. Biomechanical principles of cartilage and bone tissue engineering. In: Mow VC, Huijskes R, editors. *Basic Orthopaedic Biomechanics And Mechanobiology*, 3rd edn. Lippincott-Williams and Wilkens; 2005. pp. 343–408.
123. Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Bursac P, Martin I, Langer R, Freed LE. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog* 1998;14:193–202.
124. Rhee, H.W. Permanent phenotypic and genotypic changes of prostate cancer cells cultured in a three-dimensional rotating-wall vessel. *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2001; 37, 127 – 140
125. Pazzano D, Mercier KA, Moran JM, Fong SS, Di Biasio DD, Rulfs JX. Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnol Prog* 2000;16:893–6.
126. Evans CH, Ghivizzani SC, Smith P, et al. Using gene therapy to protect and restore cartilage. *Clin Orthop* 2000; 379: S214 – 219.
127. Martinek V, Fu FH, Lee CW, Huard J. Treatment of osteochondral injuries. Genetic engineering. *Clin Sports Med* 2001;20:403-16.
128. Martinek V, Fu FH, Huard J. Gene therapy and tissue engineering in sports medicine. *Phys Sports Med*1999;28:34-51.
129. Evans CH, Robbins PD. Possible orthopaedic applications of gene therapy. *J Bone Joint Surg (Am)* 1995; 77:1103-14.
130. Kang R, Marui T, Ghivizzani SC, et al. Ex vivo gene transfer to chondrocytes in full-thickness articular cartilage defects: a feasibility study. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 5: 139 –143.
131. Hirschmann F, Verhoeyen E, Wirth D, et al. Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:109 – 118.
132. Hofmann C, Sandig V, Jennings G, et al. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 10 099 – 10 103.
133. Ho YC, Chen HC, Wang KC, et al. Highly efficient baculovirus mediated gene transfer into rat chondrocytes. *Biotechnol Bioeng* 2004; 88: 643 – 651.
134. Li Y, Tew SR, Russell AM, et al. Transduction of passaged human articular chondrocytes with adenoviral, retroviral, and lentiviral vectors and the effects of enhanced expression of SOX9. *Tissue Eng* 2004; 10: 575 – 584.119.

135. Arai Y, Kubo T, Fushiki S, et al. Gene delivery to human chondrocytes by an adeno associated virus vector. *J Rheumatol* 2000; 27: 979 – 982.120.
136. Ulrich-Vinther M, Maloney MD, Goater JJ, et al. Light activated gene transduction enhances adeno-associated virus vector-mediated gene expression in human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 2095 – 2104.
137. Henning Madry, Greg Emkey, David Zurakowski, Stephen B Trippel. Overexpression of human fibroblast growth factor 2 stimulates cell proliferation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *J Gene Med* 2004; 6: 238 – 245.
138. Madry H., Zurakowski D., Trippel SB. Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation.
139. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell* 1978;15(4):1313–2118(6):928–32.
140. Watanabe S, Kim KN, Imagawa T, et al. On the mechanism of protection of distal joints after local gene transfer in collagen induced arthritis. *Hum Gene Ther* 2000; 11: 751 – 758.chondrocytes. *Clin Orthop* 2000; 378: 245 – 254.
141. Yang, Y. and El Haj, A. J.: Biodegradable scaffolds-delivery systems for cell therapies. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 6, 485–498 (2006).
142. Na, K., Park, J.H., Kim S.W., Sun, B.K., Woo, D.G., Chung, H.M., and Park, K.H.: Delivery of dexamethasone, ascorbate, and growth factor (TGF beta 3) in thermo-reversible hydrogel constructs embedded with rabbit chondrocytes. *Biomaterials*, 27, 5951–5957 (2006).
143. Au, A., Polotsky, A., Krzyminski, K., Gutowska, A., Hungerford, D.S., and Frondoza, C.G.: Evaluation of thermoreversible polymers containing fibroblast growth factor 9 (FGF-9) for chondrocyte culture. *J. Biomed. Mater. Res. A*, 69, 367–372 (2004).
144. Song, S.U., Cha, Y.D., Han, J.U., Oh, I.S., Choi, K.B., Yi, Y., Hyun, J.P., Lee, H.Y., Chi, G.F., Lim, C.L., Ganjei, J.K., Noh, M.J., Kim, S.J., Lee, D.K., and Lee, K.H.: Hyaline cartilage regeneration using mixed human chondrocytes and transforming growth factor-beta1-producing chondrocytes. *Tissue Eng.*, 11, 1516–1526 (2005).
145. Van der Kraan PM, Buma P, van Kuppevelt T, van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering [review]. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:631–7
146. Jones SM, Kazlauskas A Growth factor dependent signaling and cell cycle progression FEBS Letters 2001; 49:1116

147. Cross M, Dexter M. Growth factors in development transformation and tumorigenesis. *Cell* 1991; 64:271-28.
148. Jones J, Clemmons DR. Insulin-Like Growth Factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev* 1995; 16: 33-4
149. Rosen CJ, Donahue LR, Hunter SJ. Insulin-like Growth Factor and bone: the osteoporosis connection. *Endocrinol* 1994; 26: 83-2
150. Wiedlocha A, Sorensen V. Signaling internalization and intracellular activity of fibroblast growth factor. *Curr Top Microbiol Immunol* 2004; 286: 45-79
151. Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Rifkin BR. Biological role of Fibroblast Growth Factor-2. *Endocrine Rev* 1997; 18:26-45.
152. Douglas, W., Jackson, M. Timothy, Simon, and M. A. Harold, 2001: The articular cartilage repair dilemma-symptomatic articular cartilage degeneration-the impact in the new millennium. *Clin. Orthop* 391S, S14-S15.
153. Kim, H. K. W., M. E. Moran, and R. B. Salter, 1991: The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J. Bone Joint Surg.* 73A, 1301-1315.
154. Hunziker, E. B., 1999: Biologic repair of articular cartilage. *Clin. Orthop.* 367(Suppl.), 135-146.
155. Fortier, L. A., H. O. Mohammed, G. Lust, and A. J. Nixon, 2002: Insulin like growth factor-I enhances cell based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg. Br.* 84, 276-288.
156. Trippel SB. Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43: 129 - 132.28.
157. Y. M. Jenniskens, W. Koevoet, A. C. W. de Bart, H. Weinans, H. Jahr, J. A. N. Verhaar, J. DeGroot, G. J. V. M. van Osch. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGF $\beta$ 2 and FGF2. *OsteoArthritis and Cartilage.* 2006; (14), 1136-1146.
158. Richmon JD, Sage AB, Shelton E, Schumacher BL, Sah RL, Watson D. Effect of growth factors on cell proliferation, matrix deposition, and morphology of human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer. *Laryngoscope* 2005;115:1553-60.
159. Tianzheng Deng; Sha Huang; Shuxia Zhou; Lisheng He; Yan Jin. Cartilage regeneration using a novel gelatin-chondroitin-hyaluronan hybrid scaffold containing bFGF-impregnated microspheres. *Journal of Microencapsulation*, March 2007; 24(2): 163-174.
160. Shida J, Jingushi S, Izumi T, et al. Basic fibroblast growth factor stimulates articular cartilage enlargement in young rats in vivo. *J Orthop Res* 1996; 14: 265 - 272.

161. Marja M. Hurley, Christine Abreu, John R. Harrison, Alexander C. Lichtlers, Lawrence G. Raisz, Barbara E. Kream. Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Type I Collagen Gene Expression in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 1993; Vol. 268, (8). 5588-5593.
162. Singh N. K., Singh G. R., Amarpal, P. Kinjavdekar, Sharma, Mohanty A. K. T. R., Kumar S., Chae H. S., Yoo Y. M. Ahn C. N. 2007: Articular Cartilage Repair with Autografting Under the Influence of Insulin-Like Growth Factor-1 in Rabbits. *J. Vet. Med. A* 54, 210–218.
163. Tyler JA. Insulin-like growth factor 1 can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J*. 1989 Jun 1;260(2):543–548.
164. Y. M. Jenniskens, W. Koevoet, A. C. W. de Bart, H. Weinans, H. Jahr, J. A. N. Verhaar, J. DeGroot, G. J. V. M. van Osch. Biochemical and functional modulation of the cartilage collagen network by IGF1, TGF $\beta$ 2 and FGF2. *OsteoArthritis and Cartilage*. 2006; (14), 1136-1146.
165. N.Veilleux, M.Spector, Effects of FGF-2 and IGF-1 on adult canine articular chondrocytes in type II collagen–glycosaminoglycan scaffolds. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2005; Volume 13 (4) 278-286.
166. Takahashi T, Ogasawara T, Kishimoto J, Liu G, Asato H, Nakatsuka T, Uchinuma E, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI, Takato T, Hoshi K. Synergistic effects of FGF-2 with insulin or IGF-I on the proliferation of human auricular chondrocytes. *Cell Transplant*. 2006;15(4):367.
167. Jakob M, Demarteau O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, et al. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem* 2001;81(2):368-77.
168. Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes in vitro. I. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J Cell Biol* 1982;93:743-50.
169. Buckwalter JA, Mankin HJ. Degenerative joint disease. En: *Clinical Symposia*. New Jersey: Ciba-Geigy; 1995. p. 2-32.