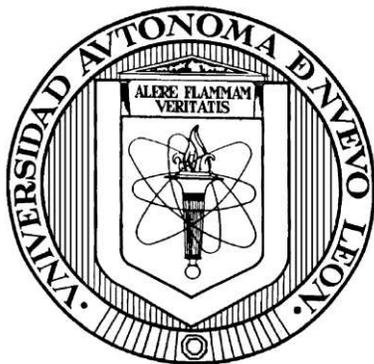


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**“HISTOMODULACIÓN DE CÉLULAS CONDRALES ALOGÉNICAS  
EN DIFERENTES MEDIOS DE TRANSPORTE Y SU APLICACIÓN EN  
LESIONES ARTICULARES: ESTUDIO  
EXPERIMENTAL EN CORDEROS”**

**Por**

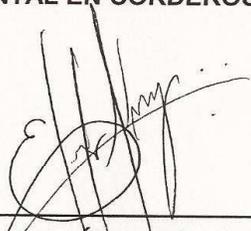
**DR. TOMÁS RAMOS MORALES**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN MEDICINA**

**AGOSTO, 2011**

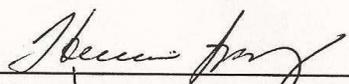
**“HISTOMODULACIÓN DE CÉLULAS CONDRALES ALOGÉNICAS  
EN DIFERENTES MEDIOS DE TRANSPORTE Y SU APLICACIÓN EN  
LESIONES ARTICULARES: ESTUDIO  
EXPERIMENTAL EN CORDEROS”**

Aprobación de la tesis:



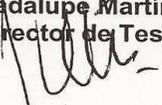
---

**Dr. med. Eduardo Alvarez Lozano**  
Director de la Tesis



---

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



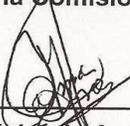
---

**Dr. med. Oscar Fernando Mendoza Lemus**  
Miembro de la Comisión de Tesis



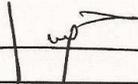
---

**Dr. med. José Carlos Jaime Pérez**  
Miembro de la Comisión de Tesis



---

**Dr. C. Alma Yolanda Arce Mendoza**  
Miembro de la Comisión de Tesis



---

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

**El presente trabajo se realizó 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 y en el Área de Cirugía Experimental del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Med. Eduardo Álvarez Lozano y la co-dirección de la Dra. en C. Herminia G. Martínez Rodríguez, del Dr. Med. Oscar F. Mendoza Lemus, del Dr. Med. José Carlos Jaime Pérez y de la Dra. en C. Alma Yolanda Arce Mendoza.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Primero a Dios porque en momentos buenos y difíciles he sentido su presencia.**

**Al Dr. Med. Jesús Ancer Rodríguez,  
Rector de la Universidad Autónoma de Nuevo León quien es parte importante de mi vida profesional y siempre cuento con su apoyo en cada uno de mis proyectos.**

**Al Dr. Med. Santos Guzmán López  
Director del Hospital Universitario porque en todo momento me ha expresado su apoyo y ayuda incondicional.**

**Al Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado  
Sub-director de estudios de posgrado de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario, por sus palabras de aliento durante la realización del proyecto.**

**Al Dr. Med. Oscar Mendoza Lemus  
Jefe de Servicio de Ortopedia y Traumatología por su apoyo profesional y económico durante el tiempo en que se desarrollo el proyecto.**

**Al Dr. Med. Eduardo Álvarez Lozano, de quien es la idea original de este trabajo y por ayudarme en la dirección del proyecto.**

**La Dra. en C. Herminia G. Martínez Rodríguez jefa del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. por participar en la codirección del proyecto y por los consejos que me ofreció en todo momento.**

**La Dra. en C. Alma Yolanda Arce Mendoza, Maestra del departamento de Inmunología por su colaboración y apoyo decidido para la terminación del proyecto.**

**Al Dr. Med. José Carlos Jaime Pérez por todos sus consejos desde el inicio de este proyecto.**

**Al Dr. Med. Oscar de la Garza Castro por su ayuda y consejos para la terminación del proyecto.**

**Al Dr. Ph. D. Julio Sepúlveda Saavedra, jefe del departamento de Histología por permitir utilizar las instalaciones, para realizar los estudios histológicos.**

**Al Dr. En C. Jorge Lara Arias por su valiosa participación y colaboración en cada una de las etapas del desarrollo de esta investigación.**

**Al Dr. en C. Adolfo Soto Domínguez por su valiosa ayuda en la realización de los estudios histológicos y de Inmunohistoquímica.**

**MSP. Cesar Luna Gurrola por su valiosa colaboración en el desarrollo del análisis estadístico.**

**A profesores y residentes del Depto. de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario porque de alguna forma participaron conmigo en la terminación de este proyecto.**

## **DEDICATORIA**

**A mi esposa Rosalinda por su apoyo incondicional, por su sonrisa y palabras de aliento que me reconfortan en todos los momentos de mi vida.**

**A mis hijos Tomas, Jessica y Rocío que durante mi vida me han inspirado en todos mis proyectos.**

**A mis Padres Pedro y Leonor que me enseñaron que el estudio, la disciplina y el trabajo son parte del éxito en la vida.**

**A todas las personas que apoyan de diferentes maneras los proyectos de investigación y para que cada vez se desarrollen mas trabajos.**

## 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>CAPÍTULO I.</b>	
<b>RESUMEN</b>	
<b>CAPÍTULO II.</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2.1. El Cartílago Articular</b>	<b>1</b>
<b>2.1.1. Estructura y Ultraestructura</b>	<b>1</b>
<b>2.1.2. Condrocitos</b>	<b>1</b>
<b>2.1.3. Matriz Extracelular</b>	<b>2</b>
<b>2.2. Fisiología del Cartílago Articular</b>	<b>6</b>
<b>2.3. Características Mecánicas del Cartílago Articular</b>	<b>8</b>
<b>2.4. Bioquímica del Cartílago Articular</b>	<b>11</b>
<b>2.4.1. Colágeno</b>	<b>11</b>
<b>2.4.2. Proteoglicanos</b>	<b>13</b>
<b>2.4.3. Glicoproteínas</b>	<b>16</b>
<b>2.4.4. Integrinas</b>	<b>18</b>
<b>2.4.5. Otros Componentes Presentes en el Cartílago</b>	
<b>Articular</b>	<b>21</b>

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
2.5. Regulación de la Biología del Cartílago Articular	22
2.5.1. Factores Anabólicos: Factores de Crecimiento	23
2.5.2. Factores Catabólicos: Interleucinas	26
2.5.3. Proteasas de la Matriz Extracelular	28
2.6. Ingeniería de Tejidos	30
2.6.1. Diferentes Tipos de Matrices	35
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	37
<b>CAPÍTULO IV</b>	
<b>HIPÓTESIS</b>	38
<b>CAPÍTULO V</b>	
<b>OBJETIVOS</b>	39
5.1. Objetivo General	39
5.2. Objetivos Específicos	39
<b>CAPÍTULO VI</b>	
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	40
6.1. Modelo Experimental	40
6.2. Grupos de Estudio	40
6.3. Toma de Biopsia	41
6.4. Cultivo Celular	41
6.5. Inclusión Celular en las Diferentes Matrices Tridimensionales e Implantación	43

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>6.6. Fase Quirúrgica</b>	<b>45</b>
<b>6.6.1. Preoperatorio</b>	<b>45</b>
<b>6.6.2. Material Quirúrgico</b>	<b>45</b>
<b>6.6.3. Anestesia</b>	<b>45</b>
<b>6.6.4. Técnica Quirúrgica</b>	<b>46</b>
<b>6.6.5. Post-operatorio Inmediato</b>	<b>47</b>
<b>6.6.6. Post-operatorio Tardío</b>	<b>47</b>
<b>6.7. Ensayos Histológicos e Inmunohistoquímicos</b>	<b>48</b>
<b>6.7.1. Histológicos</b>	<b>48</b>
<b>6.7.2. Inmunohistoquímicos</b>	<b>48</b>
<b>6.8. Análisis de Imágenes</b>	<b>48</b>
<b>6.9. Estadística</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>RESULTADOS</b>	<b>50</b>
<b>7.1. Resultados Macroscópicos</b>	<b>50</b>
<b>7.2. Análisis Histológico de las Matrices Mediante la     Tinción de Hematoxilina y Eosina (H y E)</b>	<b>52</b>
<b>7.3. Inmunohistoquímica para la Identificación de Colágeno     Tipo I y II</b>	<b>54</b>
<b>7.4. Histología para la Demostración de Polisacáridos     Complejos (Glucosamina y Proteoglicanos) de la     Membrana Basal Mediante la Técnica de PAS con</b>	

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Diastasa</b>	<b>56</b>
<b>7.5. Identificación de Fibrosis en el Grupo III</b>	
<b>7.6. Análisis Estadístico</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO VIII</b>	
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO IX</b>	
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>CAPÍTULO X</b>	
<b>REFERENCIAS</b>	<b>73</b>
<b>APÉNDICE A</b>	
<b>A.1. Técnica Histológica</b>	<b>90</b>
<b>A.2. Técnica de Tinción con Hematoxilina y Eosina</b>	<b>90</b>
<b>A.3. Técnica de Tinción con el Método Tricrómico de Massón</b>	<b>91</b>
<b>A.4. Método Inmunohistoquímico para la Identificación de         colágeno Tipo I y II</b>	<b>91</b>
<b>APÉNDICE B</b>	
<b>B.1. Análisis Morfológico</b>	<b>93</b>
<b>B.1.1. Solución de Formalina al 10%</b>	<b>93</b>
<b>B.1.2. PBS 10X</b>	<b>93</b>
<b>B.1.3. PBS 1X</b>	<b>93</b>
<b>B.1.4. Hematoxilina de Gill</b>	<b>93</b>
<b>B.1.5. Eosina</b>	<b>94</b>

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>B.1.6. Solución de Alcohol-ácido</b>	<b>94</b>
<b>B.1.7. Solución de Agua Amoniacal</b>	<b>94</b>
<b>B.1.8. Hematoxilina Férrica de Weigert</b>	<b>94</b>
<b>B.1.9. Solución de Fucsina Ácida y Escarlata de Briebich</b>	<b>95</b>
<b>B.1.10. Solución Ácida Fosfomolibdica y Fosfotúngstica</b>	<b>95</b>
<b>B.1.11. Solución de Azul de Anilina</b>	<b>95</b>
<b>B.1.12. Solución Acuosa de Ácido Acético al 10%</b>	<b>95</b>
<b>B.1.13. Solución Fijadora de Bouin</b>	<b>95</b>
<b>B.1.14. Solución Enjuagadora Sulfurosa</b>	<b>95</b>
<b>B.1.15. Solución Metabisulfito de Sodio al 10%</b>	<b>95</b>
<b>B.2. Inmunohistoquímica</b>	<b>96</b>
<b>Técnica histoquímica para la demostración de polisacáridos complejos con Ácido Peryódico de Schiff (PAS) + diastasa</b>	<b>96</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1. Análisis Descriptivo de las Variables Porcentuales en Estudio</b>	<b>60</b>
<b>Tabla 2. Análisis Descriptivo de las Variables Porcentuales en Estudio, para el Medio con Fibrina</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 3. Análisis Descriptivo de las Variables Porcentuales en Estudio, para el Medio con Fibrina y Ácido Hialurónico</b>	<b>61</b>
<b>Tabla 4. Análisis Descriptivo de las Variables Porcentuales en Estudio, para el Medio con Ácido Poliglicólico</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 5. Análisis de Inferencia Mediante Pruebas de Hipótesis para Medias a una Confianza del 95%, Entre Grupos y Según el Medio Utilizado</b>	<b>64</b>
<b>Tabla 6. Análisis de Inferencia Mediante Pruebas de Hipótesis para Medias a una Confianza del 95%, Entre Medios y Según el Compuesto Producido</b>	<b>65</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1. Exposición de Cóndilo Medial y Preparación del Lecho Receptor</b>	<b>41</b>
<b>Figura 2. Proceso de Disgregación Enzimática</b>	<b>43</b>
<b>Figura 3. Diseño y Colocación del Implante</b>	<b>44</b>
<b>Figura 4. Cóndilos Mediales de los Corderos de los Tres Grupos Tratados con los Diferentes Implantes a los Seis Meses Post-Implante</b>	<b>51</b>
<b>Figura 5. Tejido Testigo para la Identificación de Fibras de Colágeno Tipo I y Tipo II</b>	<b>53</b>
<b>Figura 6. Tejido Utilizado como Control de la Técnica para la Identificación de Colágeno Tipo I</b>	<b>54</b>
<b>Figura 7. Tejido Utilizado como Control de la Técnica para la Identificación de Colágeno Tipo II</b>	<b>55</b>
<b>Figura 8. Matrices de los Grupos Experimentales Analizados para la Identificación de Colágena Tipo I</b>	<b>55</b>
<b>Figura 9. Matrices de los Grupos Experimentales Analizados para la Identificación de Colágena Tipo II</b>	<b>56</b>
<b>Figura 10. Matrices de los Grupos Experimentales Analizados para la Identificación de Glucosaminoglicanos y Proteoglicanos</b>	<b>57</b>

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 11. Matrices de los Grupos Experimentales Analizados para la Identificación de Glucosaminoglicanos y Proteoglicanos</b>	<b>58</b>
<b>Figura 12. Identificación de Fibrosis en las Matrices del Grupo 3</b>	<b>59</b>
<b>Figura 13. Diagrama de Caja de la Producción Porcentual de Colágeno Tipo I, Según Medio</b>	<b>62</b>
<b>Figura 14. Diagrama de Caja de la Producción Porcentual de Colágeno Tipo II, Según Medio</b>	<b>63</b>
<b>Figura 15. Diagrama de Caja de la Producción Porcentual de Gag's, Según Medio</b>	<b>63</b>

## ABREVIATURAS

<b><math>\alpha</math></b>	<b>Alfa</b>
<b><math>\beta</math></b>	<b>Beta</b>
<b><math>\mu</math></b>	<b>Micras</b>
<b><math>\mu</math>l</b>	<b>Microlitros</b>
<b>%</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>®</b>	<b>Registrado</b>
<b>°C</b>	<b>Grados Centígrados</b>
<b>Ac.</b>	<b>Ácido</b>
<b>C-</b>	<b>Carboxilo Terminal</b>
<b>cm<sup>2</sup></b>	<b>Centímetros Cuadrados</b>
<b>Cols</b>	<b>Colaboradores</b>
<b>Col I</b>	<b>Colágeno tipo I</b>
<b>Col II</b>	<b>Colágeno tipo II</b>
<b>c/u</b>	<b>Cada uno</b>
<b>EFG</b>	<b>Factor de Crecimiento Epitelial</b>
<b>EUA</b>	<b>Estados Unidos de Norte América</b>
<b>FDA</b>	<b>Food and Drug Administration</b>
<b>FGF</b>	<b>Factor de Crecimiento de Fibroblastos</b>
<b>G-1</b>	<b>Dominio Globular 1</b>
<b>Gag's</b>	<b>Glucosaminoglicanos</b>
<b>Gly</b>	<b>Glicina</b>
<b>g</b>	<b>Gramos</b>
<b>hrs</b>	<b>Horas</b>

<b>H y E</b>	<b>Hematoxilina y Eosina</b>
<b>ICAM</b>	<b>Molécula de Adhesión Globular</b>
<b>IGF1</b>	<b>Factor de Crecimiento Tipo 1 Similar a Insulina</b>
<b>ICA</b>	<b>Implante de Condrocitos Autólogos</b>
<b>IHQ</b>	<b>Inmunohistoquímica</b>
<b>IL</b>	<b>Interleucina</b>
<b>kDa</b>	<b>Kilo Daltons</b>
<b>MEC</b>	<b>Matriz Extracelular</b>
<b>mg</b>	<b>Miligramos</b>
<b>min</b>	<b>Minutos</b>
<b>ml</b>	<b>Mililitros</b>
<b>mm<sup>3</sup></b>	<b>Milímetros cúbicos</b>
<b>MMP</b>	<b>Metaloproteinasa</b>
<b>N-</b>	<b>Amino Terminal</b>
<b>PAS</b>	<b>Ácido Periódico de Schiff</b>
<b>PDGF</b>	<b>Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas</b>
<b>pb</b>	<b>Pares de Bases</b>
<b>PBS</b>	<b>Amortiguador Salino de Fosfatos</b>
<b>PG's</b>	<b>Proteoglicanos</b>
<b>pH</b>	<b>Logaritmo Negativo de la Concentración de Iones Hidrógeno</b>
<b>mRNA</b>	<b>Ácido Ribonucleico Mensajero</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por Minuto</b>
<b>SBF</b>	<b>Suero Bovino Fetal</b>
<b>TGF <math>\beta</math></b>	<b>Factor de Crecimiento Transformante beta</b>
<b>TIMP's</b>	<b>Inhibidor Tisular de las Metaloproteinasas</b>

<b>TNF</b>	<b>Factor de Necrosis Tumoral</b>
<b>VCAM</b>	<b>Molécula de Adhesión Vascular</b>

## CAPÍTULO I

### RESUMEN

Tomás Ramos Morales

Fecha de Graduación: Octubre, 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

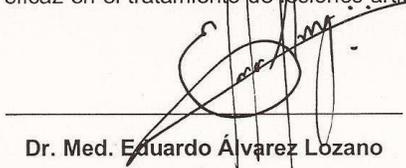
Facultad de Medicina

**Título del Estudio:** HISTOMODULACIÓN DE CÉLULAS CONDRALES ALOGÉNICAS EN DIFERENTES MEDIOS DE TRANSPORTE Y SU APLICACIÓN EN LESIONES ARTICULARES: ESTUDIO EXPERIMENTAL EN CORDEROS.

**Número de Páginas:** 96

**Área de Estudio:** Ingeniería Tisular

**Introducción:** Las lesiones del cartilago articular no se reparan debido a la escasa nutrición presente en la articulación. El implante de condrocitos autólogos es la única opción actual para la regeneración y reparación condral. Esta técnica requiere de dos tiempos quirúrgicos. Los condrocitos alogénicos incluidos en una matriz tridimensional representan una posibilidad para trasplante debido a la baja o nula respuesta inmune que provocan ya que solo se requiere de un tiempo quirúrgico. **Objetivo:** Determinar el uso de condrocitos alogénicos cultivados a partir de biopsias tomadas de corderos donadores en el tratamiento de lesiones condrales articulares de espesor total, en un modelo animal. **Material y Métodos:** Se incluyeron condrocitos alogénicos en tres diferentes matrices a base de fibrina, fibrina/ác. Hialurónico y ác. Poliglicólico. Los bioimplantes fueron transplantados y en corderos lesionados quirúrgicamente luego fueron estabulados durante seis meses. Se realizaron cortes histológicos para identificar la calidad de la matriz condral y se localizaron colágenos de tipo I y II mediante inmunohistoquímica. **Resultados:** Para el grupo de Fibrina, el 80% de las proteínas de colágena presente fue de tipo II, el 37.17% fue de colágeno tipo I y el 70.43% estuvo conformado por glucosaminoglicanos. La mezcla de fibrina/ác. Hialurónico estimuló la síntesis de colágeno tipo II y Gag's en un 83.90% y 72.77% y colágeno de tipo I en un 27.60%. disminuyó en comparación con el grupo 1. La matriz de ácido poliglicólico solo produjo 91.17% de colágeno tipo I y no se detectó colágeno tipo II y Gag's en este grupo. **Conclusiones:** La matriz de fibrina en combinación con el ácido hialurónico fue más eficiente para la producción de Colágeno tipo II y Gag's a seis meses post-implante. La utilización de condrocitos alogénicos cultivados in vitro, puede ser eficaz en el tratamiento de lesiones articulares de espesor completo.



---

Dr. Med. Eduardo Álvarez Lozano

Director de Tesis

## **CAPÍTULO II**

### **INTRODUCCION**

#### **2. 1. CARTILAGO ARTICULAR**

##### 2.1.1. Estructura y Ultraestructura

El cartílago articular es un tejido elástico avascular, aneural y alinfático localizado en las articulaciones diartrodiales del esqueleto, que facilita el deslizamiento y la lubricación de las superficies articulares, absorbe los traumatismos mecánicos y distribuye las cargas sobre el hueso subyacente. Al igual que otros tejidos conectivos del organismo, el cartílago articular está constituido por células, denominadas condrocitos, y por una matriz extracelular, siendo ésta la que le confiere sus peculiares características mecánicas.

El cartílago articular presenta cuatro capas en su profundidad. En cada una de ellas la estructura y composición, así como el volumen y la forma celular, el diámetro y la orientación de las fibras colágenas, y la concentración de proteoglicanos son variables<sup>1</sup>.

##### 2.1.2. Condrocitos

Los condrocitos son células altamente especializadas que producen y mantienen la matriz extracelular. Ocupan menos del 10% del volumen tisular total, con variaciones de unas articulaciones a otras. Cada condrocito está rodeado por tres capas concéntricas distinguibles por su composición, que se denominan, desde la célula hacia la periferia región pericelular, región

territorial y región interterritorial. Al conjunto formado por un condrocito y el microambiente que le rodea (matriz pericelular y matriz territorial), se le denomina condrón o condrona.

Los condrocitos de las distintas capas del cartílago articular difieren en la forma, el tamaño y, probablemente, en la actividad metabólica. Todos ellos contienen las organelas necesarias para sintetizar cada uno de los componentes de la matriz extracelular, incluyendo aparato de Golgi y retículo endoplasmático, si bien los condrocitos de la capa transicional presentan una mayor concentración de organelas para la síntesis proteica y los de la zona de cartílago calcificado sólo contiene unas pocas vesículas de retículo endoplasmático y de membranas de Golgi. Además, los condrocitos pueden contener filamentos intracitoplásmicos, lípidos, glucógeno y vesículas secretoras e incluso pequeños cilios que se extienden hacia el espesor de la matriz<sup>2</sup>. Los condrocitos se rodean a sí mismos con su matriz extracelular de forma que no se produce contacto intercelular.

### 2.1.3. Matriz Extracelular

Los condrocitos del cartílago articular están rodeados de un complejo microambiente constituido por agua y macromoléculas denominado matriz extracelular (MEC), que determina las características biomecánicas del tejido, como la resistencia y la elasticidad.

La composición de la MEC presenta variaciones individuales, entre distintas localizaciones anatómicas dentro de un mismo individuo, entre las diferentes capas del cartílago de una misma articulación. Es, además, un sistema dinámico que sufre constantemente la acción de factores anabólicos y

catabólicos. Pese a estas variaciones, la proporción de agua oscila entre el 60 y 80% del peso total del cartílago, quedando el resto repartido entre el colágeno y los proteoglicanos principalmente, y en menor medida lípidos, fosfolípidos, glicoproteínas y otras proteínas.

Las macromoléculas estructurales del cartílago (colágeno, proteoglicanos y proteínas no colágenas) contribuyen al 20 – 40% del peso total del cartílago, variando sus proporciones y su contribución a las propiedades tisulares dentro del propio cartílago; el colágeno contribuye al 60% del peso seco, los proteoglicanos al 22 – 25%, y las diversas glicoproteínas y las proteínas no colágenas al 15 – 20%.

Al igual que la morfología y la función de los condrocitos varía según la capa del cartílago en que se localicen, la composición de la matriz extracelular es diferente dependiendo tanto de la profundidad del cartílago en que se localice, como de la distancia a las células. Además, recientes estudios biológicos y mecánicos<sup>3,4</sup> han demostrado que la organización zonal tiene importancia funcional:

1. Zona superficial: que presenta a su vez dos capas; una más superficial, acelular, formada por finas fibrillas y escasos polisacáridos, por debajo de la cual se encuentra una matriz con escasez de proteoglicanos respecto a otras zonas. Cultivos de células de esta capa han demostrado que sus condrocitos degradan proteoglicanos más rápidamente y sintetizan menos colágeno y proteoglicanos que los de capas más profundas. Además presenta mayor concentración de agua y fibronectina. que constituye la zona de deslizamiento articular. En ella los condrocitos son elongados y se

disponen con su eje mayor paralelo a la superficie. Las fibrillas colágenas también son paralelas a la superficie. El contenido en proteoglicanos es el más bajo de todo el cartílago.

2. Zona de transición: tiene un espesor varias veces mayor que el de la capa superficial y está constituida por fibras colágenas de mayor diámetro, una concentración superior de proteoglicanos y una menor concentración de agua más baja.
3. Zona media o radial: esta capa contiene las fibras colágenas de mayor diámetro, la mayor concentración de proteoglicanos y la concentración de agua más baja. Los condrocitos son esféricos y forman a menudo columnas.
4. Zona de cartílago calcificado: es una delgada capa constituida por condrocitos de pequeño tamaño completamente rodeados por cartílago calcificado que separa el hueso subcondral de la capa media. Se caracteriza por pequeñas células picnóticas distribuidas en una matriz cartilaginosa densamente incrustada de sales de apatita. La zona más profunda se separa del hueso por una línea ondulante observada con hematoxilina-eosina de color azul, denominada marca de agua o marca de marea<sup>1</sup>.

Pero el cartílago articular no solamente puede estructurarse en cuatro capas de superficie articular a matriz ósea subyacente, sino que gracias a las variaciones de la matriz extracelular puede dividirse asimismo en tres regiones: pericelular, territorial e interterritorial, presentando variaciones tanto en su composición como en su función. Así, las dos primeras se encargan de satisfacer las necesidades de los condrocitos, unir las

membranas celulares a la matriz que la rodea, proteger a las células del daño originado por las deformaciones y cargas de la articulación y ayudar a transmitir señales mecánicas a los condrocitos cuando la matriz se deforma en los movimientos articulares. Por su parte, la misión principal de la región interterritorial es proporcionar al tejido sus propiedades mecánicas.

La región pericelular que rodea a los condrocitos está constituida fundamentalmente por proteoglicanos sulfatados<sup>5</sup>, biglicanos<sup>6</sup>, hialuronato<sup>7</sup>, una serie de glicoproteínas<sup>8</sup>, fibronectina<sup>9</sup>, laminina<sup>10</sup> y otros componentes como la Ancorina CII (molécula asociada a la membrana celular). Posee, asimismo, colágeno no fibrilar de tipo VI, que ha sido descrito exclusivamente en la matriz pericelular con niveles uniformemente bajos en las regiones territorial e interterritorial<sup>11,12</sup> no existiendo apenas fibrillas colágenas. Se han descrito expansiones citoplasmáticas de condrocitos que se proyectan dentro y a través de la matriz pericelular hacia la matriz territorial, localizada periféricamente.

La matriz territorial se dispone rodeando a condrocitos individuales o incluso parejas de condrocitos con sus respectivas matrices pericelulares y, en la zona radial, rodea a cada columna de condrocitos. Las delgadas fibras colágenas de la matriz territorial próxima a las células, se adhieren a la matriz pericelular. A distancia de la célula se entrecruza en diversos ángulos, formando una cesta de fibrillas alrededor de los condrocitos que los protege durante las cargas y la deformación que sufre la articulación. La matriz territorial, posee una mayor concentración que las demás, de proteoglicanos ricos en condroitín-sulfato<sup>13</sup>.

Un poco más hacia la periferia, la frontera entre la región territorial y la interterritorial viene marcada por un importante aumento en el diámetro de las fibras colágenas y un cambio en la orientación de las mismas, disponiéndose de forma más paralela. De todos modos, algunas fibras colágenas conectan ambas regiones, dificultando la diferenciación precisa de la frontera entre ambas. Por último, la matriz interterritorial ocupa la mayor parte del volumen del cartílago articular maduro y contiene las fibras colágenas de mayor diámetro. A diferencia de las fibras colágenas de la matriz territorial, éstas no están organizadas alrededor de los condrocitos y su orientación espacial presenta un cambio de 90° desde la zona superficial a la radial. De este modo, en la superficie las fibras poseen un diámetro relativamente pequeño, y generalmente se disponen, como su nombre indica, de manera radial o perpendicular a la superficie articular. En ella aparecen con mayor concentración los proteoglicanos ricos en queratán sulfato<sup>14</sup>.

## **2.2. FISIOLÓGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

Pese a que el tejido cartilaginoso, considerado globalmente, presenta una baja actividad metabólica debido a la escasa densidad celular que posee, los condrocitos *per se* son células metabólicamente muy activas, capaces de responder a diversos estímulos, como mediadores solubles (interleucinas y factores de crecimiento), agentes farmacológicos, componentes de la matriz, cargas mecánicas y cambios de la presión hidrostática<sup>2</sup>.

La nutrición de los condrocitos se realiza a partir de nutrientes del líquido sinovial, los cuales deben atravesar una doble barrera de difusión, el tejido

sinovial y el líquido sinovial en primer lugar y, posteriormente la matriz cartilaginosa. Según la mayoría de los investigadores, en los sujetos inmaduros, la nutrición se realizaría también por difusión desde el estrato óseo subyacente. Sin embargo, en la madurez dicha capacidad desaparece dejando como única fuente de nutrición al líquido sinovial. El paso de los nutrientes a través de la matriz cartilaginosa y la concentración de las mismas que pueden atravesarla, depende de la concentración, composición y organización de los proteoglicanos grandes, influyendo no solamente el tamaño de las moléculas (máximo de 20 Kd) sino también otros factores como pueden ser su carga eléctrica o su composición molecular<sup>14</sup>. El tiempo de difusión varía dependiendo del peso molecular, estructura, tamaño y carga de las moléculas. Los fragmentos de proteoglicanos y otros componentes de la matriz, productos del metabolismo normal, pueden salir rápidamente del cartílago. Las moléculas del líquido sinovial (interleucinas, prostaglandinas, etc) y algunos factores de crecimiento parecen desplazarse sin límite a través del tejido.

Esta complejidad para la nutrición de los condrocitos hace que sus requerimientos de oxígeno sean mucho menores que los de otras células del organismo y que dependan primariamente de un metabolismo anaerobio. La función y la actividad de los condrocitos es completamente diferente durante el desarrollo esquelético y cuando el desarrollo ya está completo. Así, durante el desarrollo, la densidad celular del tejido es elevada, encontrándose las células al máximo de su actividad metabólica, dividiéndose y sintetizando rápidamente grandes cantidades de matriz extracelular. Sin embargo, cuando el desarrollo ha terminado, la actividad

celular decae, disminuyendo la síntesis de matriz extracelular y la mayoría de los condrocitos no se dividirán jamás. No obstante continúan degradando macromoléculas de la matriz extracelular y sintetizando colágeno, proteoglicanos y otras proteínas para mantener el remodelamiento de la superficie articular<sup>15</sup>.

Al ser el cartílago un tejido carente de terminaciones nerviosas, este tipo de estímulos no son válidos en él. Algo similar ocurre con la respuesta inmune, ya que tanto monocitos como inmunoglobulinas tienden a ser excluidos del tejido en función a su tamaño.

### **2.3. CARACTERÍSTICAS MECÁNICAS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

El cartílago articular en las articulaciones diartroïdales está sometido a importantes cargas estáticas y dinámicas a lo largo de la vida del individuo. Para soportarlas, el colágeno, los proteoglicanos y demás moléculas deben organizarse en una matriz fuerte, resistente a la fatiga y muy sólida, capaz de soportar las elevadas cargas y las tensiones de las mismas<sup>1</sup>.

Las propiedades mecánicas del tejido dependen en gran medida de la interacción entre las macromoléculas de la matriz y el agua de la misma. Así el volumen, la concentración y la capacidad de respuesta a estímulos del agua tisular dependen de la interacción entre el agua y las macromoléculas estructurales, sobre todo con los grandes agregados de proteoglicanos que ayudan a mantener el fluido dentro de la matriz y las concentraciones de electrolitos.

Dado que estas macromoléculas presentan abundantes cargas negativas (debidas a los grupos sulfato y carboxilo de sus estructuras) se produce un

aumento en la concentración de sodio (carga positiva) y un descenso del potasio (carga negativa), desencadenándose un aumento de la osmolaridad y creándose un efecto Donan que se logra controlar debido a la red de colágeno.

Las propiedades biomecánicas del cartílago se comprenden mejor si se le considera como un material bifásico, integrado por una fase sólida y otra líquida. La parte sólida se describe como porosa y permeable; la parte líquida (el agua) puede hacerse fluir a lo largo de la fase sólida.

En líneas generales, el cartílago articular presenta una serie de propiedades, como son:

- a. Permeabilidad, o capacidad de fluir el agua a través del cartílago cuando se aplica un gradiente de presión. Al aplicarse una carga compresiva se compacta la matriz sólida, elevándose la presión en el intersticio, lo que fuerza al líquido a salir del tejido. En términos generales, la forma en que se reparte una carga entre la fase líquida (presión hidrodinámica) y la fase sólida (carga sobre la matriz sólida) está determinada entre otros factores por la porosidad, la solidez, las tasas de carga y el tipo de carga (compresión, tensión y rozamiento). Los experimentos de permeabilidad han demostrado una relación directa importante entre la permeabilidad y el contenido de agua, y una relación inversa entre la permeabilidad y el contenido de proteoglicanos.
- b. Viscoelasticidad, o capacidad para deformarse al aplicar una carga constante con relación al tiempo en que actúa la carga (hasta alcanzar un equilibrio). En el cartílago articular existen dos tipos de

mecanismos responsables de la viscoelasticidad: uno dependiente y otro independiente del flujo. El mecanismo dependiente del flujo es el mayor contribuyente al comportamiento viscoelástico. Bajo una carga constante, el soporte de la carga se transfiere de manera gradual de la fase líquida a la sólida.

- c. Propiedades tensiles: diversos estudios han puesto de manifiesto la respuesta tensil intrínseca de la matriz sólida de colágeno-proteoglicanos, revelando que las muestras de la zona superficial del cartílago son más rígidas que las de las zonas media y profunda. Ésto se debe a la alta concentración y al grado de orientación de las fibrillas colágenas.

Para mantener la estructura, composición y propiedades mecánicas del cartílago articular maduro es necesario que la articulación sufra carga y movimiento. De igual modo, alteraciones de carga y movimiento que excedan o no alcancen los niveles necesarios, pueden alterar el equilibrio entre los procesos de síntesis y degradación, y provocar cambios en la composición y en la ultraestructura del cartílago. Cuando se reduce la carga articular mediante una inmovilización rígida, se produce atrofia y degeneración del cartílago<sup>16,17</sup>. Por el contrario, la compresión continua y estática de las dos superficies articulares puede producir lesiones degenerativas graves y muerte de condrocitos en las áreas de contacto.

## 2.4. BIOQUÍMICA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

### 2.4.1. Colágenos

El colágeno es una proteína extracelular compuesta por tres cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ ). En cada una de ellas hay una secuencia tripeptídica característica (gly-x-y) que forma una hélice levógira. Los aminoácidos prolina e hidroxiprolina son muy frecuentes, conteniendo también hidroxilisina e hidroxilisina glicosilada. En cada molécula, tres residuos en la secuencia tripeptídica, ocupa el interior de la hélice, y da estabilidad a la hélice al permitir la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares. La hidroxilisina, por un lado, participa en la formación de uniones covalentes que estabilizan principalmente el ensamblaje fibrilar del colágeno. Los precursores del colágeno o procolágenos son sintetizados con largos extremos C- y N-terminales, una de cuyas funciones es estabilizar la cadena, algo necesario para la formación de la triple hélice.

El colágeno existe en el cartílago tanto en forma de homotrímeros (las tres cadenas  $\alpha$  son iguales entre sí), como en el tipo II, como en forma de heterotrímeros (las tres cadenas  $\alpha$  son diferentes), caso de los tipos VI y X. Estas extensiones de los propéptidos son escindidas por peptidasas específicas después de la secreción, pero antes de la formación de las fibras. el colágeno fibrilar, que es la forma biológicamente funcional, es consecuencia de una serie de modificaciones postraduccionales, tanto intra como extracelulares, que requieren cierto número de enzimas.

En el cartílago articular hay varios tipos de colágeno genéticamente diferentes<sup>18,19,20</sup>, siendo el principal el tipo II, que representa entre 90-95% del total, aunque también contiene los tipos I, V, VI, IX, X y XI. La proporción

de colágeno varía entre el 50 y el 90% del peso seco del cartílago y es máxima en la superficie, donde sufre tensiones constantes, por lo que la condición física de las fibras colágenas es crucial: una disminución de la tensión del cartílago más blando con separación de las fibras colágenas. En general, la función principal del colágeno en el cartílago es proporcionar al tejido propiedades tensiles e inmovilizar los proteoglicanos en la MEC. Más en detalle, el colágeno tipo X, que se localiza en el límite entre el cartílago calcificado y el no calcificado<sup>21,22</sup>, podría intervenir en el soporte estructural del cartílago articular; el de tipo II forma el volumen principal de la fibrilla, el de tipo XI condiciona el tamaño de la misma, y el IX facilita la interacción con las moléculas de proteoglicanos.

Los diferentes tipos de colágeno del cartílago articular varían no solamente en su distribución en la MEC, sino también en su estructura tridimensional. Así, el colágeno tipo II parece distribuirse de manera uniforme por la MEC y sus monómeros se alinean cabeza con cola, de manera que se sobreponen y crea agujeros en la estructura tridimensional del cartílago. El colágeno tipo XI se asocia a la superficie de las fibrillas formando una nueva fibrilla heterotípica. Se ha observado que además de las uniones covalentes entre las cadenas de colágeno de tipo II hay uniones entre los tipos II y IX, y entre las cadenas de colágeno de tipo XI<sup>23</sup>. Aún no se conocen las funciones de los colágenos de tipos VI y X en el cartílago articular, aunque parece que el tipo VI está localizado en la cápsula pericelular de los condrones, realizando una importante tarea en la unión del condrocito a la matriz pericelular<sup>11,12</sup>. Por su parte, el tipo X, que se localiza en la zona calcificada profunda de las articulaciones maduras<sup>21,22</sup> parece jugar un papel determinante en el

proceso de mineralización que tiene lugar inmediatamente por encima del hueso subcondral.

Por su parte, se sabe que el colágeno tipo IX regula el diámetro de las fibras de colágeno tipo II de forma proporcional a la concentración<sup>24</sup> y se localiza en el condrón en los lugares donde el colágeno tipo II alcanza el diámetro mínimo necesario para formar la superestructura tan estrechamente tramada de la cápsula pericelular<sup>11, 25</sup>.

#### 2.4.2. Proteoglicanos

Los proteoglicanos son macromoléculas complejas que, por definición, están formadas por un núcleo proteico con varios dominios globulares al que se unen largas cadenas de polisacáridos (glicosaminoglicanos).

Los glicosaminoglicanos están formados por una cadena larga, no ramificada, de unidades repetidas de polisacáridos. El 80 – 90% de los proteoglicanos del cartílago son grandes<sup>26,27,28</sup> y se denominan agreganos debido a sus propiedades de agregación. Están formados por un gran centro proteico de 2.25Kd, al que se adhieren cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato. En el extremo N-terminal de la proteína central, uno de los dominios globulares (G1) tiene la función específica de unión al hialuronato a través de la llamada proteína de unión, formada y sulfatada por los condrocitos, y que se ocupa de estabilizar la unión entre el hialuronato y el dominio G1, formando un complejo agregano-hialuronato. Los principales agreganos son el condroitín sulfato en sus distintas isoformas (principalmente el condroitín-6-sulfato), el queratán sulfato y el dermatán sulfato.

El hialuronato es también un glicosaminoglicano, aunque se diferencia de los agreganos en que no está sulfatado, no posee proteína central y no forma proteoglicanos. Dado que el hialuronato no está ramificado, pueden unirse a él múltiples moléculas de agregano, formándose grandes macromoléculas, siendo ésta la manera que se piensa que hace que los grandes proteoglicanos queden inmovilizados dentro de la red de colágeno del cartílago. También existen proteínas de enlace que estabilizan la asociación entre los monómeros y el hialuronato y que desempeñan la función de dirigir la unión de los agregados. La formación de los agregados ayuda al anclaje de los proteoglicanos a la matriz, previniendo su desplazamiento durante la deformación del tejido.

Atendiendo a la proporción de condroitín sulfato/hialuronato, se puede hablar de dos poblaciones de agregados de proteoglicanos: una caracterizada por una baja velocidad de sedimentación, con una baja proporción de condroitín sulfato/hialuronato y pocos monómeros por agregado y otra caracterizada por una elevada velocidad de sedimentación, una proporción de condroitín sulfato/hialuronato más alta y mayor número de monómeros por agregado<sup>29</sup>. Las regiones superficiales del cartílago articular contienen principalmente agregados de baja velocidad de sedimentación mientras que las regiones más profundas contienen ambos tipos de agregados. La pérdida de los agregados más grandes parece ser uno de los cambios precoces asociados con osteoartritis e inmovilización de la articulación<sup>30</sup>. El envejecimiento también se asocia con la pérdida de los agregados de proteoglicanos más grandes del cartílago articular<sup>31</sup>.

Otros proteoglicanos de menor tamaño presentes en el cartílago articular son el biglicano y la decorina, que poseen una proteína central de 30Kd, la fibromodulina y el colágeno IX (considerado un proteoglicano porque contiene una cadena de condroitín sulfato). El biglicano contiene dos cadenas de dermatán sulfato, y la decorina sólo una. Estos proteoglicanos pequeños no rellenan un gran volumen de tejido, ni contribuyen directamente a su comportamiento mecánico, sino que se unen a otras macromoléculas influyendo en la función celular. La decorina y la fibromodulina se unen al colágeno tipo II y pueden actuar organizando y estabilizando el entramado de éste. El biglicano se concentra en la matriz pericelular y puede interactuar con el colágeno tipo VI. Los proteoglicanos pequeños también pueden unirse al TGF- $\beta$ , modulando la actividad del mismo en el cartílago<sup>32</sup>.

La proporción de proteoglicanos en las distintas capas del cartílago articular es variable, lo mismo que en las distintas zonas radiales alrededor del condrocito.

El condroitín sulfato es el glicosaminoglicano más abundante en el cartílago articular, estando formada cada cadena por 25-30 unidades de disacáridos, con un peso promedio de 15-20Kd; las cadenas de queratán sulfato del cartílago articular son más cortas que las del condroitín sulfato, siendo su peso molecular medio de 5-10Kd.

Cada unidad de disacárido contiene al menos un grupo carboxilo o sulfato cargado negativamente, por lo que los glicosaminoglicanos forman largas fibras de cargas negativas, que repelen otras moléculas cargadas negativamente y que atraen cationes.

El cartílago contiene, asimismo, grandes proteoglicanos no agrecanos, aunque son similares a éstos en estructura y función, y que podrían representar agrecanos degradados. Además, el cartílago articular probablemente contenga otros pequeños proteoglicanos que aún no han sido identificados.

Las moléculas de agrecanos rellenan casi todo el espacio interfibrilar de la matriz cartilaginosa, contribuyendo en aproximadamente el 90% de la masa total de proteoglicanos de la misma; los grandes proteoglicanos no agrecanos constituyen menos del 10% y los pequeños proteoglicanos no agrecanos constituyen alrededor del 3%. Aunque estos últimos contribuyen relativamente poco a la masa total de proteoglicanos comparados con los agrecanos, gracias a su pequeño tamaño pueden estar presentes en un número de moléculas igual o mayor.

#### 2.4.3. Glicoproteínas

Las glicoproteínas extracelulares, que constituyen entre el 5 y 15% del peso seco del cartílago, tienen funciones de unión y ensamblaje entre la matriz extracelular y los condrocitos. Están constituidas por una base proteica a la que se unen algunos mono y oligosacáridos. Las glicoproteínas estructurales son del tipo de la ancorina CII, fibronectina y laminina<sup>2</sup>.

La ancorina CII, que forma parte de una familia de macromoléculas adhesivas de la superficie celular conocidas como calpactinas, es una proteína ligante de colágeno situada en la superficie del condrocito. Su función es contribuir al anclaje de los condrocitos a las fibras colágenas de la matriz extracelular<sup>33</sup>.

La fibronectina es una glicoproteína de gran tamaño que se presenta en forma de agregados en la matriz extracelular y la superficie de los condrocitos. También está presente en suero, donde actúa como opsonina y agente quimiotáctico. Tiene afinidad para unirse a otras moléculas como fibrina, colágena tipo II<sup>9</sup>, heparina, hialuronato<sup>34</sup>, componentes de la pared bacteriana, etc.

La laminina es una molécula polivalente presente en membranas basales y, unida a receptores, en la superficie de las células.

La proteína oligomérica de cartílago, una proteína ácida, sólo se ha observado en tejido cartilaginoso. Se concentra en la matriz de los alrededores del condrocito, uniéndose con él. Puede considerarse un marcador de recambio en el cartílago y de progresión de degeneración cartilaginosa en pacientes con osteoartritis<sup>35</sup>.

La interacción de todas estas glicoproteínas con los condrocitos se efectúa a través de otras glicoproteínas, las integrinas<sup>36</sup>. Estas constituyen una familia de glicoproteínas que regulan los procesos de adhesión, migración, proliferación y diferenciación celulares<sup>37</sup>, siendo de gran importancia en las conexiones entre la matriz extracelular y los condrocitos. Las integrinas identificadas en la superficie de los condrocitos adultos del cartílago articular son:  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 5$  y, en menor medida,  $\alpha v\beta 3$ .

Recientemente se ha aislado una nueva glicoproteína aniónica de alto peso molecular (aproximadamente 540Kd) cuya función es por el momento desconocida<sup>38</sup>.

Los condrocitos son capaces de sintetizar y organizar los componentes de la matriz extracelular. Un número de componentes de la superficie celular,

como los receptores de integrinas<sup>39,40,41</sup>, de ancorina CII<sup>42</sup>, sindecanos<sup>43</sup> o el receptor de hialuronano<sup>44</sup> pueden estar involucrados en la interacción entre los condrocitos y la matriz que los rodea. En el proceso de organización y estabilización de los componentes de la matriz del cartílago, las fibrillas de colágeno y los proteoglicanos interaccionan con moléculas específicas como proteoglicanos pequeños, ácido hialurónico y glicoproteínas.

#### 2.4.4. Integrinas

El reconocimiento de las integrinas como una familia de receptores de adhesión de la superficie celular es del año 1987<sup>45</sup> y son los principales receptores por medio de los cuales las células (los condrocitos, en el caso del tejido cartilaginoso) se adhieren a la matriz extracelular. Algunas integrinas también median importantes procesos de adhesión célula-célula, desempeñando un papel importante tanto en la etapa de desarrollo como en los organismos adultos.

Todas las integrinas son heterodímeros transmembrana compuestos por subunidades  $\alpha\beta$  y conectados al citoesqueleto. Las subunidades  $\alpha$  tiene un tamaño entre 120 y 180Kd y se unen no covalentemente a una subunidad  $\beta$  (90-110 Kd). La mayor parte de las integrinas se expresan en una gran variedad de células y la mayoría de las células expresan varias integrinas. Se conocen 8 subunidades  $\beta$  y 14 subunidades  $\alpha$ .

Cada integrina puede unirse a más de un ligando. Del mismo modo, todos los ligandos pueden ser reconocidos por más de una integrina. Casi todos estos ligandos son proteínas de la matriz extracelular implicadas en la adhesión de la célula al sustrato. Sin embargo, algunos sustratos como el

fibrinógeno pueden mediar la agregación celular, y algunas integrinas reconocen proteínas de la superfamilia de las inmunoglobulinas (molécula 1 de adhesión intercelular o ICAM-1, molécula 2 de adhesión intercelular o ICAM-2, y molécula de adhesión vascular o VCAM-1) y median la adhesión directa célula a célula. Estas moléculas de adhesión son solubles y se encuentran en sangre. También se segregan otros receptores de membrana celular como citoquinas, receptores de factores de crecimiento y el receptor de transferrina.

En estudios de la localización e identificación de integrinas en tejido cartilaginoso in vitro<sup>40</sup>, se han identificado integrinas no sólo en la superficie del condrocito, en fibras de colágeno de la matriz pericelular, sino también, sorprendentemente, en la matriz extracelular del cartílago.

El hallazgo de que las integrinas  $\alpha 1$ -,  $\alpha 3$ -,  $\beta 1$ - y  $\alpha 5\beta 1$  se distribuyen a lo largo del cartílago y la matriz pericondral in vivo e in vitro viene apoyado por los datos obtenidos con microscopía de fluorescencia y electrónica.

Los resultados de inmunoprecipitación de los sobrenadantes libres de células y de proteínas celulares confirman la presencia de integrinas y de colágeno tipo II en la matriz cartilaginosa, aunque todavía no está claro su significado funcional.

Las funciones principales de la familia de las integrinas son: enlace en la organización de la matriz extracelular, estabilización de los componentes de la matriz extracelular, modulación de la célula desde el interior de ésta y modulación del compartimiento celular a través de la matriz extracelular.

Así, además de su papel como receptores de adhesión, las integrinas son transductoras de señales desde la matriz extracelular al interior de la célula,

controlando así tanto el crecimiento celular como su diferenciación, morfología y migración. Las integrinas participan en procesos fisiológicos importantes como el desarrollo embrionario, hemostasia y trombosis, curación de heridas, mecanismos de defensa inmunitaria y no inmunitaria, y formación de tumores.

Ciertas integrinas ejercen un papel en el desarrollo vascular, de modo que la supresión de las mismas produce alteraciones en alguna de las etapas de la angiogénesis: adhesión, migración, proliferación, diferenciación y supervivencia de las células implicadas en la angiogénesis<sup>46</sup>. Las integrinas  $\alpha 5$ - están siendo estudiadas como herramienta terapéutica en situaciones en que sea necesario inhibir la angiogénesis o la osteoporosis. Sin embargo, la supresión del gen de la subunidad  $\alpha 5$ , aun siendo letal, permite un desarrollo considerable de órganos, y por tanto vasculogénesis y angiogénesis<sup>47</sup>.

Las integrinas por medio de señales intracelulares producidas a través de sus receptores, controlan la sobreproducción de colagenasas presente en los pacientes con artritis reumatoide<sup>48</sup>. Esta proliferación de metaloproteinasas por los sinoviocitos contribuye a la destrucción ósea y cartilaginosa característica de la enfermedad.

La integridad del cartílago articular requiere estimulación mecánica. Cuando ésta es anormal se desencadenan procesos de osteoartritis. Las integrinas intervienen en el mecanismo de hiperpolarización de la membrana celular que resulta de la estimulación mecánica del cartílago, a través de la secreción de interleucina 4<sup>49</sup>.

El colágeno tipo VI conecta las fibrillas de colágeno y/o estabiliza los haces de fibrillas<sup>50</sup>. Estas interacciones son importantes para el establecimiento de

la red tridimensional de componentes de la matriz del cartílago. Las interacciones de los componentes de la matriz con moléculas específicas hace que las macromoléculas se interrelacionen, proporcionando así una formación óptima de la red tridimensional. Las integrinas desprendidas de la superficie del condrocito pueden actuar conectando moléculas. Esta idea se confirma ya que los fibroblastos que no sintetizan integrinas de la membrana celular, sino también las de la matriz, estabilizando y organizando las estructuras de ésta<sup>51</sup>.

La expresión de las integrinas está regulada por factores de crecimiento<sup>52</sup>. Tanto el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) como el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF  $\beta$ ) estimulan la expresión en la superficie de las células de las subunidades de las integrinas  $\alpha 3$ -/ $\alpha 5$ -, así como la adhesión de los condrocitos a la fibronectina y al colágeno II. Sin embargo, ambos factores tienen efectos contrarios en la expresión de otras integrinas  $\alpha 1\beta 1$ , (el IGF-1 la aumenta y el TGF $\beta$  la disminuye). El hecho de que las células tratadas con TGF $\beta$  disminuyan su adhesión al colágeno VI sugiere que es precisamente la  $\alpha 1\beta 1$  la integrina que media la adhesión del condrocito al colágeno tipo VI.

#### 2.4.5. Otros Componentes Presentes en el Cartílago Articular

En la matriz extracelular del cartílago articular existen además otros componentes aunque en mucha menor proporción. Entre ellos están los lípidos que constituyen menos del 1% del peso húmedo del cartílago articular maduro y que se localizan tanto en las células como en la matriz. No se conoce exactamente cual es su función y, sin embargo, se sabe que

su cantidad varía con la edad y con la presencia de enfermedades degenerativas<sup>53</sup>.

Otro componente presente en el cartílago articular maduro en pequeñas cantidades es la Fosfolipasa A2, una enzima que parece ser importante tanto en el anabolismo como en el catabolismo del ácido araquidónico<sup>54</sup>.

También hay sustancias inorgánicas, como la apatita clacificada que se localiza en las vesículas osmofílicas pericelulares presentes en la zona radial del cartílago.

Asi mismo se sabe de la existencia de otras proteínas, cuya acción se desconoce, como la proteína de la matriz del cartílago y que pueden constituir hasta el 15% del peso seco.

## **2.5. REGULACIÓN DE LA BIOLOGÍA DEL CARTILAGO ARTICULAR**

El cartílago articular no es un tejido inerte, sino que es capaz tanto de sintetizar como de degradar de forma constante y regular todos los componentes de la matriz extracelular. Algunas moléculas son fundamentalmente potenciadoras de los fenómenos anabólicos del cartílago, especialmente los factores de crecimiento. Por el contrario otras, entre las que se encuentran las interleucinas, poseen efectos contrarios.

Los mecanismos de acción de ambos grupos de factores, anabólicos y catabólicos, son múltiples. En algunos casos potencian o inhiben directamente la síntesis de los componentes de la matriz extracelular (colágeno, agrecanos, etc.). En otros favorecen la actuación de moléculas que degradan el cartílago (proteasas) o de las proteínas tampón de las mismas (inhibidores tisulares de las proteasas). En los párrafos siguientes se

resumen los efectos más importantes de los factores de crecimiento y las interleucinas sobre el cartílago articular. A continuación se exponen, con mayor detalle, los datos existentes en la literatura a propósito de los factores de crecimiento que se han estudiado en el presente trabajo.

#### 2.5.1. Factores Anabólicos: Factores de Crecimiento

Los factores de crecimiento son polipéptidos, solubles y difusibles, producidos en cantidades limitadas, que regulan el desarrollo, proliferación, diferenciación y crecimiento celulares, y que se producen por la activación de protooncogenes. Así, están implicados en la terapia endocrina, en el paso de hormonodependencia a la hormonoindependencia, en la degradación de la matriz extracelular y en la adquisición del fenotipo metastásico. Los efectos de los diferentes factores de crecimiento sobre los condrocitos, y sobre la matriz extracelular.

Los estudios realizados sobre condrocitos demuestran que estas células también están bajo la acción de los factores de crecimiento, tanto durante el desarrollo como durante la vida adulta. Sin embargo, la mayoría de los trabajos se centran en el cartílago de crecimiento, a pesar de que algunos factores de crecimiento podrían estar implicados en la etiopatogenia de algunas patologías del cartílago articular<sup>8,55,56,57</sup>. Las principales familias de factores de crecimiento implicados en la biología del cartílago articular son las IGF, TGF, PDGF, EGF y FGF<sup>52</sup>; además, estudios recientes han puesto de relieve que también otros factores de crecimiento (neurotrofinas, etc.) podrían intervenir regulando la biología del cartílago articular.

Los factores de crecimiento transmiten su señal a las células sensibles mediante su unión al receptor específico. Los receptores de los factores de crecimiento son proteínas, también en la mayoría de los casos producto de protooncogenes, que tienen actividad proteín-kinasa. La mayor parte de receptores de crecimiento transmiten su señal vía tirosín-kinasa intracelular, es decir, mediante enzimas que modifican la conducta de las proteínas mediante fosforilación de la tirosina. Se han identificado más de 50 receptores con actividad tirosin-kinasa. Cada receptor del factor de crecimiento viene originado por un determinado y específico protooncogen, y así el erb-B1 es el responsable de la producción del receptor del EG, el oncogen c-ros del receptor del IGF, etc.

La unión del factor de crecimiento a su receptor da lugar a un sistema transductor de señales o segundo mensajero, constituido por proteínas citoplasmáticas, originadas por estímulos de otros oncogenes, poniéndose en marcha una serie de reacciones bioquímicas en cascada hasta llegar el estímulo a los oncogenes intranucleares. El efecto final es, pues, la activación de genes nucleares que determinan proliferación, diferenciación, y también muerte celular.

Los efectos de los factores de crecimiento sobre los condrocitos *in vivo* e *in vitro*, en función de la especie animal, la edad de los sujetos, etc<sup>58,59,60</sup>. Pero en términos generales se admite que los factores de crecimiento estimulan la síntesis de los componentes de la matriz extracelular del cartílago, inhiben las proteasas y activan los sistemas de inhibición de éstas<sup>61,62,63,64</sup>.

Sin embargo, y con carácter general, se admite que en condiciones basales la mayoría de los factores de crecimiento (bFGF, PDGF, EGF, TGF- $\beta$ ), salvo

el IGF-1, no tienen ningún efecto sobre la síntesis de PG en el cartílago normal<sup>65,66</sup>; es más, el EGF y el TGF- $\beta$  la inhiben<sup>67,68</sup>, pero el bFGF y el PDGF potencian al IGF-1<sup>52,69,70</sup>. Los factores de crecimiento tampoco producen ningún efecto tras inducir lesiones del cartílago, lo que podría atribuirse a defectos de los receptores y no a los propios factores.

Los resultados obtenidos por los diferentes autores al analizar los efectos de los receptores y no a los propios factores.

Los resultados obtenidos por los diferentes autores al analizar los efectos de los factores de crecimiento sobre el cartílago articular no son homogéneos, y en algunos casos, son contradictorios. Ello se debe, no tanto a las técnicas utilizadas para valorar la funcionalidad del cartílago articular, cuanto a factores dependientes del material estudiado. Entre ellos se encuentran la edad, las condiciones de estudio, la especie animal y la zona de cartílago o la articulación analizadas. Normalmente los condrocitos poco diferenciados o jóvenes responden mejor a los factores tróficos<sup>61,71</sup>, y los condrocitos de origen fetal son más sensibles a los factores tróficos anabolizantes que los adultos<sup>60</sup>. Además, en el caso del cartílago articular humano, también se ha evidenciado un declive continuado de la respuesta de los condrocitos a algunos factores tróficos y un cambio edad-dependiente en la sensibilidad a dichas sustancias; así, los condrocitos jóvenes (de donantes entre 10 a 20 años) responden preferentemente a 1 PDGF-AA, mientras que en los adultos la mejor respuesta se obtiene con el TGF- $\beta$ 1<sup>72</sup>. Las condiciones del cultivo, en grupo o en monocapa, también conllevan respuestas diferentes en las células y los resultados tampoco son iguales si se trata de estudios *in vivo*, cultivos primarios o de líneas celulares. Por otro lado es obvio que

puedan existir diferencias especie-específicas de respuesta a los diferentes factores de crecimiento. Finalmente, la articulación o la zona (oreja, tabique nasal) de donde se obtienen las muestras de cartílago influye en los resultados ya que la composición de la MEC y la densidad celular varía de una a otra y de un tipo de cartílago a otro (hialino vs fibroso).

## 2.5.2. Factores Catabólicos: Interleucinas

Otros factores implicados en la regulación del metabolismo del cartílago articular, y que en líneas generales desempeñan acciones opuestas a los factores de crecimiento, son las interleucinas. Las más importantes son las interleucinas 1, 6 y el TNF- $\alpha$ <sup>73,74,75</sup>.

La interleucina 1 (IL-1) es producida por los condrocitos, y se relaciona con la destrucción del tejido cartilaginoso por lisis de la matriz (acelera la degradación de proteoglicanos) y disminución de los mecanismos de regeneración, mediante su potente capacidad de inhibir la proliferación condrocitaria<sup>76</sup> y la síntesis de proteoglicanos. Dicho efecto lo consigue estimulando la producción de enzimas proteolíticas<sup>77</sup>. En cultivos aislados, además de incrementar la degradación de los proteoglicanos, parece producir un aumento en la degradación del colágeno tipo II, extremo que no ha podido ser comprobado en explantes completos<sup>78</sup>.

Además, existen evidencias que sugieren que la IL-1 $\beta$  regula la expresión de algunas isoformas del TGF. Concretamente estimula la síntesis de TGF- $\beta$ 3 mientras que reduce la de TGF- $\beta$ 1 y TGF- $\beta$ 3 representa un mecanismo de protección contra el catabolismo del tejido conectivo inducido por las

citoquinas. Por su parte, el TGF- $\beta$ , *in vivo*, puede inducir la producción de IL-6 por los condrocitos articulares<sup>79</sup>.

Los niveles de IL-6 están significativamente elevados en el líquido sinovial de pacientes con osteoartritis y artritis reumatoide. Sin embargo, los efectos de la IL-6 en la proliferación y el metabolismo de los proteoglicanos en el cartílago articular no son conocidos. Parece ser que el uso de IL-6 humana recombinante sobre cultivos de condrocitos articulares en el conejo produce una inhibición de la proliferación de los mismos en un 65%, y una supresión de la formación de colonias inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos beta. También deprime la síntesis de proteoglicanos en aproximadamente un 60%. Además, aumenta la degradación de proteoglicanos inducida por la IL-1 humana recombinante, si bien por sí sola no afecta a la degradación de los proteoglicanos<sup>80</sup>.

Por otra parte el TNF- $\alpha$  estimula la producción de enzimas proteolíticas, principalmente metaloproteasas<sup>81</sup>, e inhibe la síntesis de componentes de la MEC, permitiendo la degradación del cartílago<sup>77</sup>. Recientemente se ha visto que la colagenasa-3 se expresa en los condrocitos durante el desarrollo y en determinadas patologías, y que su mRNA es inducido por el TNF- $\alpha$ <sup>82,83</sup>.

Parece, según algunos estudios, que el TGF- $\beta$ 1 posee efectos antagónicos sobre los condrocitos en la osteoartritis a los producidos por el TNF- $\alpha$ <sup>84</sup>. Así, el curso clínico de la osteoartritis, con un periodo de enfermedad activa seguido de otro de remisión, podría explicarse por un patrón secuencial de estimulación de citoquinas autocrinas y de la expresión de receptores de las mismas, afectando asimismo a la síntesis de colagenasas.

La pérdida de cartílago en las osteoartritis se caracteriza por la degradación de la matriz y la muerte de condrocitos. La ceramida (mensajero lipóideo) está implicada en la transducción de la señal de las citoquinas catabólicas TNF e IL-1, así como en la apoptosis. La ceramida permanente en las células, en condrocitos aislados, parece estimular la expresión de las MMP-1, 3 y 13 a nivel del mRNA, la actividad de las MMP y la producción de la MMP-13. Según esto, la ceramida podría jugar un papel importante en la degradación del cartílago y en la apoptosis de condrocitos en procesos de pérdida de cartílago como los presentes en la osteoartritis<sup>85</sup>.

La artritis crónica es una enfermedad caracterizada por una inflamación articular persistente con la destrucción articular concomitante. Se ha visto que mediante antagonistas de los receptores de IL-1 se produce una reducción de las manifestaciones clínicas de la inflamación, aunque no parece acompañarse de reducción del daño articular<sup>86</sup>.

### 2.5.3. Proteasas de la Matriz Extracelular

Las proteasas son una serie de enzimas presentes en la matriz extracelular cartilaginosa y que son las responsables de la continua renovación de los componentes de la MEC. Son sintetizadas por los condrocitos e intervienen tanto en el recambio normal como en el patológico. Hay dos grupos principales de proteasas, las metaloproteasas (colagenasa, gelatinasa y estromelisin) y las catepsinas (catepsina B y D).

Las metaloproteasas deben su nombre a la necesidad de zinc en la zona activa para su funcionamiento. La acción de la colagenasa es altamente específica, porque es la única enzima capaz de separar en una sola zona la

parte de la molécula de la triple hélice a tres cuartas partes de distancia del extremo aminoterminal de la molécula. Una vez que la colagenasa termina su acción, actúa la gelatinasa separando las cadenas- $\alpha$  desnaturalizadas por ella. La estromelina puede actuar tanto sobre el colágeno tipo II, como sobre el tipo IX. Además se cree que una de sus principales funciones es la degradación de la proteína central del agregano, pese a que los productos específicos de dicha rotura que han sido identificados tanto in vivo como in vitro no se pueden atribuir a la estromelina. Por tanto, se cree que existe otra proteína aún no identificada que sería la responsable de la degradación del agregano, o bien actuaría sinérgicamente con ella. De todos modos, recientes estudios han demostrado que algunas proteasas, asociadas exclusivamente a la sinovitis en la artritis reumatoide, como por ejemplo la metaloproteasa-13 degrada colágeno tipo II y agregano<sup>87</sup>.

Las metaloproteasas son sintetizadas, como muchas otras enzimas del organismo, en forma de proenzimas, requiriendo para su activación modificación enzimática. Así, la colagenasa puede ser activada a través de la plasmina, activada a su vez a partir del plasminógeno por un factor activador del mismo<sup>88,89</sup>. Además, la estromelina puede producir una superactivación de la colagenasa para que ésta alcance su actividad máxima. Los mecanismos por los cuales se produce la activación de la proestromelina y la progelatinasa permanecen sin identificar. Estas enzimas activadas pueden ser desactivadas por medio de factores sintetizados por el propio condrocito y que reciben el nombre de TIMP's (inhibidores Tisulares de Metaloproteasas), que producen una inhibición irreversible de las mismas<sup>90</sup>. En condiciones de normalidad, el cartílago articular contiene

elevados niveles de inhibidores de las proteasas (principalmente  $\alpha$ 2-macroglobulina, inhibidor del activador del plasminógeno y TIMPs), de manera que algunos autores han propuesto como causa de osteoartritis los desequilibrios entre factores activadores e inhibidores de las proteasas. El otro grupo de proteasas son las catepsinas, con capacidad para degradar el agregano. Se conocen dos tipos diferentes, denominadas catepsina B y D respectivamente. Respecto a su capacidad para degradar proteoglicanos de la MEC se ha creado cierta controversia, ya que actúan a un pH óptimo de 5.5; sin embargo, existen ciertas evidencias de que en el cartílago articular, y principalmente en la matriz pericelular, podrían alcanzarse niveles de pH lo suficientemente bajos como para que las catepsinas actúen.

## **2.6. INGENIERÍA DE TEJIDOS**

La ingeniería tisular es una rama de la ciencia multidisciplinaria, cuyo principio básico es la utilización de un sustrato celular vivo asociado a un diseño y manipulación del medio extracelular para crear bioimplantes, con el único fin de reparar, reemplazar, mantener u optimizar el funcionamiento de órganos o tejidos lesionados.

La técnica de ingeniería tisular actualmente usada en la reparación de cartílago es: el trasplante de condrocitos autólogos. El cultivo e implantación de condrocitos autólogos es una alternativa para la reparación de los defectos articulares, esta es una de las primeras biotecnologías aplicadas a la cirugía ortopédica.

Las afecciones articulares representan un grave problema de salud en la población en general, de éstas las lesiones del cartílago articular, han sido y

continúan siendo un enorme reto para la terapéutica, desde tiempos muy remotos.

Son muchas las técnicas descritas para el tratamiento de las lesiones del cartílago articular. Sin embargo la mayoría tiene como denominador común un resultado variable e impredecible.

La implantación de condrocitos autólogos, es una técnica empleada en el tratamiento de las lesiones del cartílago articular, ha evolucionado hasta el desarrollo de bioimplantes compuestos por células cultivadas incluidas en biomateriales transportadores de características tridimensionales. Esto ha traído consigo el desarrollo de diferentes tipos de matrices para el transporte de las células condrales, cada una con resultados variables.

Hay que tomar en cuenta que el resultado final, en el trasplante de condrocitos autólogos, dependerá no solo de la matriz en la cual se incluyen las células sino de una serie de procesos que van desde la calidad celular, el tratamiento del tejido en el cultivo y finalmente del apego a las indicaciones adecuadas para cada paciente.

Numerosos estudios confirman la relación de la artrosis desarrollada como secuela de lesiones traumáticas, condrales y/o osteocondrales<sup>91</sup>

Es bien conocido que la capacidad de reparación del cartílago articular es limitada. Defectos de espesor parcial en el cartílago articular no pueden curar espontáneamente<sup>92</sup>.

La mayoría de las técnicas terapéuticas empleadas en la actualidad para el tratamiento de las lesiones condrales u osteocondrales se basan en la estimulación de la médula ósea para promover la migración de células

pluripotenciales<sup>93</sup> que repararan el defecto con un tejido fibrocartilaginoso de características biomecánicas inferiores al cartílago articular.

Las que no substituyen la superficie articular con injertos autólogos, alogénicos o con componentes sintéticos<sup>94</sup>.

Las lesiones del cartílago articular que no penetran el hueso subcondral, habitualmente no pueden reparar el defecto y progresan hacia la degeneración de la superficie articular.

Es importante hacer la diferencia entre el término reparación tisular que implica la sustitución de un tejido patológico por otro tejido de características similares al original, y el término regeneración que implica la sustitución de un tejido por otro de las mismas características morfológicas y genéticas.

La implantación de condrocitos autólogos (ICA) es una de las primeras biotecnologías disponibles en la ortopedia que actualmente está aprobado por la F. D. A. Esta técnica fue introducida en Suecia en 1987, y ha sido utilizada clínicamente en EUA desde 1995.

El tratamiento de lesiones condrales con ICA produce un tejido nuevo de características histológicas y mecánicas similares al cartílago hialino y han mostrado resultados clínicos alentadores hasta en un 75% de los pacientes.

Autores como Peterson y colaboradores.<sup>95</sup> reportan la respuesta a este tratamiento a dos años con una durabilidad intermedia en el tejido de reparación que oscilaba entre 5 a 11 años.

En sus trabajos Brittberg<sup>96</sup>, Minas y Nehrer<sup>97</sup> reporta que la implantación de condrocitos autólogos puede proveer la oportunidad de reemplazar la superficie articular destruida con un tejido autólogo similar en calidad, el cual es rodeado por un tejido cartilaginoso normal.

Sin embargo el hecho de ser un trasplante autólogo obliga a tener una fase de procuración celular la cual habitualmente se lleva a cabo a través de un procedimiento artroscópico, el cual aunado al procedimiento de implantación representa un doble riesgo quirúrgico para el paciente.

Numerosos estudios experimentales sustentan la utilización del cultivo e implantación de condrocitos alogénicos<sup>98-106)</sup> situándola como una técnica eficiente y segura con efecto inmediato en la detención del proceso degenerativo de las superficies articulares.

Esta bien descrito el llamado “Privilegio inmunológico del cartílago”<sup>105,106,107</sup>., el cual es debido en gran parte a la condición avascular del tejido, aunado a ésto, el proceso de digestión a la que son sometidas las células rechaza cualquier antígeno de superficie que pudiera despertar una respuesta inmunológica en el receptor.

Schreiber y colaboradores. en 1999<sup>100</sup> fueron unos de los pioneros en la investigación del uso de ingeniería tisular específicamente condrocitos alogénicos para el tratamiento de lesiones articulares, Fragonas y colaboradores. en el 2000<sup>99</sup> utilizaron suspensiones de condrocitos alogénicos embebidos en alginato para reparar lesiones articulares en conejos, Peras y colaboradores. en 2000<sup>103</sup> transplantaron condrocitos en gel de PGLA/ polydioxanona, Yao y colaboradores en 2000<sup>102</sup> utilizarón la técnica de condrocitos alogénicos para la reparación de defectos articulares completos en corderos.

Además del origen de las células a implantar un segundo punto de interés en la presente técnica han sido las matrices en las cuales se incluyen las células.

La implantación desde la técnica original ha evolucionado hasta el desarrollo de bioimplantes compuestos por células cultivadas incluidas en biomateriales transportadores de características tridimensionales lo cual da la ventaja de concentrar la densidad celular y cubrir de manera homogénea el defecto, sin embargo los resultados clínicos pueden variar de una matriz a otra de acuerdo a una variedad de factores inherentes a éstas.

Durante mucho tiempo se pensó que la matriz extracelular de un tejido constituía una estructura de soporte y nada más, actualmente es bien conocida su verdadera función como sistema dinámico que permite la interacción entre ella y el componente celular, contribuyendo a la migración celular, diferenciación, metabolismo, proliferación y muerte celular.

Las células quirúrgicamente implantadas requerirán de un microambiente óptimo para llevar a cabo su metabolismo, un medio adecuado es aquel que permita la suspensión celular y su distribución tridimensional en todo el defecto y el cual sea capaz de absorber y distribuir las solicitaciones biomecánicas hasta que sea substituido por la matriz extracelular.

La matriz ideal debe de tener una serie de propiedades que permita el soporte celular y promueva la viabilidad, reduciendo al mínimo la muerte de las células incluidas, debe permitir una adecuada fijación dentro del defecto, debe brindar protección a las células incluidas de las cargas articulares, debe de proveer un ambiente no hostil a las células incluidas, debe de ser inocua y no despertar respuesta inflamatoria, además de permitir la fijación de las células dentro de la misma y así evitar la migración celular fuera del implante, debe permitir la diferenciación celular, respetando la morfología y manteniendo el fenotipo celular y por último ser biodegradable para así

permitir su sustitución por la matriz extracelular del neocartílago en formación.

### 2.6.1 Diferentes Tipos de Matrices

Son muchos los materiales que han sido utilizados como matriz para la inclusión de células con el fin de conseguir la regeneración cartilaginosa, entre las que se mencionan principalmente alginato<sup>108, 109, 110</sup>, geles de colágeno<sup>111</sup>, polímeros a base de fibras de ácidos polihidroxi<sup>112-116</sup>, esponjas de ácido hialurónico<sup>117, 118</sup>, y geles de fibrina<sup>119</sup>. La fibra de carbono fue estudiada por Brittberg y colaboradores<sup>96</sup> comparándola con el uso de periostio, encontrando resultados similares en el grado de reparación. Noguchi y colaboradores<sup>104</sup> evaluaron el gel de colágeno como matriz en defectos cartilaginosos, encontrando la formación de cartílago hialino un año después, se ha observado respuesta celular diferente en la utilización de colágeno Tipo I y Tipo II. Minas y colaboradores<sup>97</sup> encontraron que con el uso de colágeno Tipo I se induce una diferenciación fibroblástica, mientras que el colágeno tipo II produce una diferenciación hacia una línea condroblástica con la producción de un tejido cartilaginoso de características hialinas, así mismo Noguchi y colaboradores<sup>104</sup> utilizaron el cartílago bovino como matriz para la inclusión de células condrales de conejo cultivadas e implantadas en defectos condrales de rodillas de conejo, ellos encontraron mejoría después de 12 semanas.

Sellerls<sup>102</sup> reportó el uso de matriz ósea desmineralizada como matriz con resultados satisfactorios. Los geles o adhesivos de fibrina se componen de dos derivados del plasma, la trombina y el fibrinógeno, que al combinarse

forma un coagulo estable de fibrina, el cual tiene la particularidad de ser reabsorbido de manera natural por el organismo. Los adhesivos de fibrina tienen tres aplicaciones básicas: En la hemostasis, como agente sellador, o como mecanismo acarreador de células o de agentes bio-activos como factores de crecimiento<sup>104</sup>. Visna y colaboradores en el 2003<sup>120</sup> obtuvieron muy buenos resultados utilizando condrocitos embebidos en una matriz de fibrina autóloga para el tratamiento de lesiones en superficies que soportan carga en el fémur. Recientemente se ha desarrollado una matriz acarreadora a base de poliesterouretano. Raimondi y colaboradores<sup>121</sup> demostraron que este polímero sintético biodegradable, fue más adecuado para la condrogénesis *in vitro* que las matrices de fibrina comercial y colágeno. Sin embargo, sugiere mejorar la técnica de inclusión celular debido a que la distribución celular fue inadecuada en esta matriz, hecho que resulta contrario a lo reportado con el adhesivo de fibrina<sup>117</sup>.

### **CAPÍTULO III**

#### **JUSTIFICACION**

Aproximadamente un 30% de los procesos degenerativos en las articulaciones de carga son debidos a lesiones condrales u osteocondrales localizadas, de diferentes etiologías, las cuales debido a la pobre capacidad regenerativa del cartílago articular, tienden a la progresión a mediano plazo, repercutiendo todo lo anterior en un progreso degenerativo articular generalizado, complicando de esta manera el tratamiento.

Las técnicas terapéuticas establecidas hoy en día basan su acción en la reparación del tejido cartilaginoso con un tejido de características similares, producido por la estimulación de las células de la medula ósea subcondral, teniendo la desventaja de que este tipo de tejido, conocido como fibrocartílago, es rico en colágeno Tipo I, el cual a diferencia del cartílago articular normal que posee principalmente colágeno Tipo II, no está diseñado genéticamente para soportar las cargas y demandas biomecánicas de una articulación, produciendo en poco tiempo la degeneración del fibrocartílago y continuando de este modo el proceso degenerativo.

El presente proyecto basa su acción en una técnica de ingeniería tisular descrita recientemente, y explora la posibilidad del uso de la biotecnología de Banco de Tejidos para el uso de células alogénicas en lugar de autólogas, lo cual representaría una ventaja al obviar un procedimiento quirúrgico de los dos requeridos en la técnica actual.

## **CAPITULO IV**

### **HIPOTESIS**

La implantación de condrocitos alogénicos cultivados a partir de biopsias tomadas de corderos donadores, incluidos en tres diferentes medios de transporte tridimensionales, será capaz de regenerar lesiones osteocondrales producidas en la rodilla de corderos receptores

## **CAPÍTULO V**

### **OBJETIVOS**

#### **5.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar el uso de condrocitos alogénicos cultivados a partir de biopsias tomadas de corderos donadores en el tratamiento de lesiones condrales articulares de espesor total, en un modelo animal.

#### **5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Establecer cultivos primarios de células cartilaginosas obtenidas a partir de biopsias de cartílago hialino de corderos donadores.
2. Definir el medio de transporte más adecuado para la sobrevivencia celular, comparando tres diferentes matrices tridimensionales:
  - a. Grupo I: Adhesivo de fibrina humana (Tisucol®, Baxter).
  - b. Grupo II: Matriz mixta (Fibrina/Ac. Hialurónico)
  - c. Grupo III: Acido poliglicólico (Coseal® Baxter)
3. Reestablecer una zona de cartílago articular con células tomadas en un primer grupo, de corderos donantes, las cuales son procesadas, cultivadas y expandidas en número para su implantación en corderos receptores.
4. Identificar la matriz extracelular formada por los injertos de neocartílago, mediante métodos histológicos e inmunohistoquímicos.

## **CAPITULO VI MATERIAL Y MÉTODOS**

### **6.1. MODELO EXPERIMENTAL**

Como modelo experimental utilizamos el cordero (*Ovis aries*), de 4-6 meses de edad y con un peso comprendido entre los 25 y 30 Kg. Se emplearon 31 animales donantes y 30 como receptores, los cuales fueron divididos en 3 grupos de 10 corderos cada uno, teniendo como variable la matriz en la que se incluyeron las células cultivadas, las cuales fueron fibrina humana, fibrina humana + ácido hialurónico y ácido poliglicólico.

### **6.2. GRUPOS DE ESTUDIO**

Los grupos fueron divididos de la siguiente manera de acuerdo a las condiciones de criopreservación a las cuales se sometió el injerto que iba a recibir el cordero receptor.

<b>GRUPO</b>	<b>MATRICES TRIDIMENSIONALES</b>	<b>LABORATORIO</b>
<b>I</b>	Fibrina Humana	BAXTER
<b>II</b>	Fibrina Humana + Ácido Hialurónico	BAXTER/GLYCOSAN BIOSYSTEM INC
<b>III</b>	Ácido Poliglicólico	BAXTER

### 6.3. TOMA DE BIOPSIA

La biopsia de cartílago, se obtuvo al momento de crear el lecho receptor del bioimplante, en el cóndilo medial de la rodilla izquierda (Figura 1), mediante la metodología que se describirá a continuación.

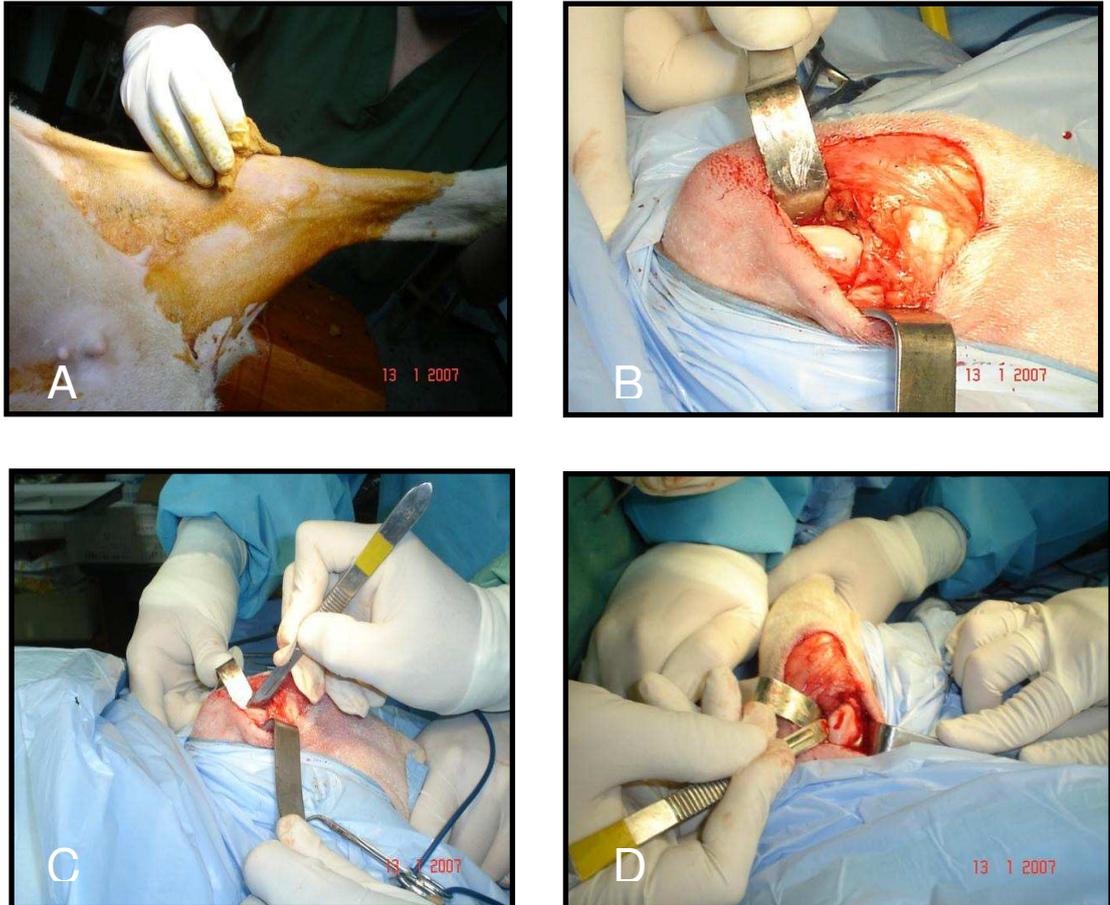


Figura 1. Exposición del cóndilo medial y preparación del lecho receptor. A) Limpieza y desinfección de la pierna izquierda del animal. B) Abordaje y exposición del cóndilo medial. C) Preparación del lecho receptor y extracción de la biopsia de cartílago articular. D) Lecho

### 6.4. CULTIVO CELULAR

La biopsia de cartílago articular se seccionó en pequeños cubos de aproximadamente  $1-3 \text{ mm}^3$ , en una campana de flujo laminar clase II (SterilGARD® III advance°. THE BAKER COMPANY, Gatehouse Road.

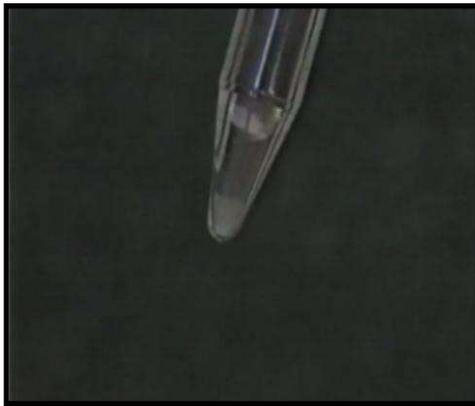
Sanford, USA). Los fragmentos de cartílago se trataron con tripsina (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. (Grand Island, NY, EUA. Para la digestión de la matriz condral, se trató al cartílago con colagenasa tipo II (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES, Grand Island, NY, EUA). Los condrocitos obtenidos, fueron inoculados en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (NUNC™ Creek Drive, Rochester, NY) para su crecimiento *in vitro* (Figura 2). El medio empleado fue Opti-MEM (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA) y 50 µg/ml de gentamicina (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA). Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> y una humedad relativa del 100%. Cuando los cultivos en monocapa alcanzaron entre el 70-80% de confluencia, se despegaron las células incubándolas con tripsina-EDTA (GIBCO-BRL LIFE TECHNOLOGIES. Grand Island, NY, EUA).



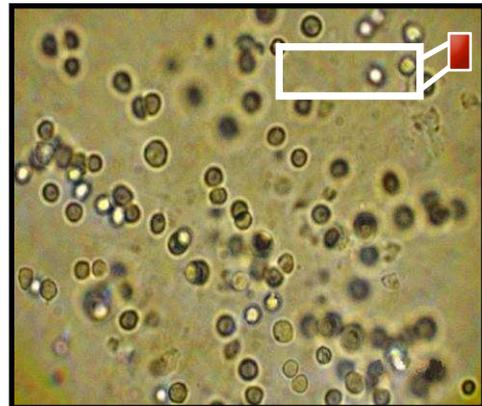
A. Ambiente Estéril



B. Digestión Enzimática



C. Centrifugación



D. Cultivo Celular

Figura 2. Proceso de digestión enzimática. A) Campana de flujo laminar. B) Biopsia de cartílago durante el proceso de disgregación mediante las proteínas proteolíticas. C) Pastilla celular generada durante la centrifugación. D) Condrocitos resuspendidos y listos para ser sembrados en los frascos de cultivo celular.

## 6.5. INCLUSIÓN CELULAR EN LAS DIFERENTES MATRICES TRIDIMENSIONALES E IMPLANTACIÓN

Para la inclusión celular, se adicionaron los condrocitos durante fases previas a la polimerización de los productos comerciales. Para la matriz formada a base de fibrina y ácido hialurónico, se mezclaron los productos durante la fase de polimerización. Para la matriz de ácido poliglicólico, se siguieron las instrucciones del laboratorio fabricante, hasta conseguir la consistencia deseada de polimerización. En todos los casos, se generó el bioimplante hasta obtener un conteo celular de  $15 \times 10^6$  células aproximado.

Una vez contruidos los implantes, se procedió a hacer la artrotomía y exponer el cóndilo medial de la rodilla izquierda, se generó la lesión condral, se preparó el lecho receptor y se tomó un molde de este último empleando una hoja de papel alumunio, se recortó de acuerdo al patrón de la lesión y con base a este templado, se diseñó el implante que posteriormente fue pegado en la zona lesionada con el pegamento biológico Tissucol (Baxter) (Figura 3). El mismo adhesivo fue empleado para fijar los implantes de los diferentes grupos.

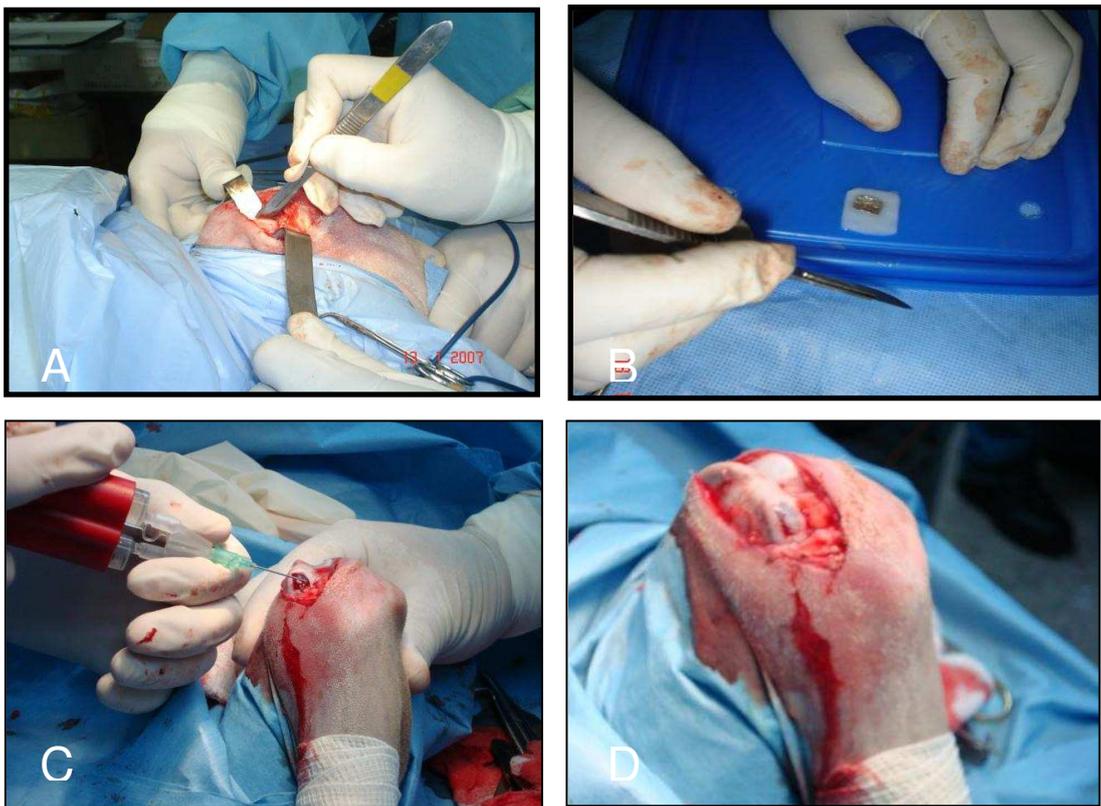


Figura 3. Diseño y colocación del implante. A) Generación del lecho receptor. B) Molde de aluminio con el patrón de la lesión. C) Aplicación del pegamento biológico para fijar al implante. D) Implante adherido al lecho receptor.

## **6.6. FASE QUIRÚRGICA**

### **6.6.1. Preoperatorio**

Los animales fueron trasladados al bioterio del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León una semana antes de la intervención. El día previo a la intervención fueron esquilados y lavados con solución antiséptica de Iodopovidona, 10gr. (Boehringer Ingelheim Promeco), con el fin de disminuir el riesgo de infección. Posteriormente fueron trasladados a un habitáculo aislado donde permanecieron en ayuno absoluto.

Una vez en quirófano experimental se realizó rasurado de la extremidad posterior izquierda.

### **6.6.2. Material Quirúrgico**

En todos los procedimientos se empleó el instrumental y material quirúrgico convencional utilizado en cirugía ortopédica.

### **6.6.3. Anestesia**

Se empleó anestesia general sin intubación endotraqueal. La administración de la medicación anestésica se llevó a cabo a través de la canalización de la vena cefálica presente en la extremidad anterior derecha con un catéter tipo Abbocat, de 18 Frenchs. Una vez canalizada se conectó a un sistema de goteo a través del cual se administró fluidoterapia de mantenimiento con suero glucosado al 5%.

La inducción anestésica se consiguió mediante la administración intravenosa de tiobarbital a una dosis de 12 mg/Kg. de peso, atropina 0,5mg/Kg. de peso y fentanil a una dosis de 0,015 mg/Kg. de peso. Posteriormente la anestesia fue mantenida con tiobarbital a una dosis de 10 mg/Kg. de peso y fentanil a una dosis de 0,015 mg/Kg. de peso.

#### 6.6.4. Técnica Quirúrgica

Una vez anestesiado el cordero fue colocado en posición decúbito supino, sobre la mesa quirúrgica y se realizó asepsia con solución Iodopovidona, 10gr. (Boehringer Ingelheim Promeco) de la extremidad posterior izquierda previamente rasurada, a continuación se colocaron campos y sábanas estériles, dejando la extremidad a intervenir aislada.

Se realizó una incisión cutánea pararotuliana medial en la zona condílea femoral de la pata trasera izquierda de aproximadamente 5-8 cms. se disecó hasta alcanzar la cápsula articular, procediéndose a realizar artrotomía sobre el alerón medial y la membrana sinovial, posteriormente se desplaza el mecanismo extensor externamente, e hiperflexionando la rodilla se expone la zona condílea de carga, posteriormente utilizando una bisturí No.10 se realizó un defecto condral hasta llegar a la placa subcondral el cual fue utilizado como nicho receptor en la zona de carga del cóndilo femoral medial, a continuación se tomó el bioimplante con las células condrales alogénicas incluidas que previamente antes de iniciar el procedimiento se colocaron en solución OPTIMEM® (Invitrogen Cat No. 31985) temperatura ambiente, se colocó el bioimplante en el nicho se tomó un molde de la morfología del defecto con una plantilla de aluminio y se verificó que éste lo cubriera en su

totalidad. Con el molde se realizó el diseño del bioimplante, el cual se fijó con Tissucol® (Baxter) y se tuvo cuidado de que sus bordes contactaran con el defecto articular receptor, posteriormente se reduce el mecanismo extensor y se realiza cierre por planos, suturando la cápsula articular y el tejido celular subcutáneo con puntos simples de Vicryl® 000, y la piel con nylon 000.

#### 6.6.5. Postoperatorio Inmediato

Al finalizar el procedimiento los corderos permanecieron en la sala de quirófano hasta su despertar de manera espontánea, permanece en quirófano por un espacio de una hora para vigilar su evolución período durante el cual se le administró 1 gramo de ampicilina intramuscular para iniciar así la profilaxis antibiótica. Una vez que el cordero intentaba incorporarse se procedía a trasladarlo al bioterio.

#### 6.6.6. Postoperatorio Tardío

Al ser trasladados al bioterio el cordero era colocado en un habitáculo individual donde permanecía aislado, la carga no fue restringida y los corderos dispusieron de comida y agua 'ad libitum' desde el primer día después de la intervención.

Durante los siguientes siete días post-quirúrgicos se les administró una dosis diaria de 1 gramo de ampicilina intramuscular, y se realizó limpieza diaria de la herida hasta su cicatrización, con solución antiséptica de Iodopovidona, 10gr. (Boehringer Ingelheim Promeco) al 10% y Veterín Fenicol®.

## **6.7. ENSAYOS HISTOLÓGICOS E INMUNOHISTOQUÍMICOS**

### **6.7.1. Histológicos**

Se valoró el grado de integridad de la porción cartilaginosa del injerto, y las características histológicas de la misma, teniendo en cuenta las condiciones de la matriz extracelular, la viabilidad celular, la presencia de tejido fibroso y la distribución del mismo. Para este objetivo se realizaron las técnicas histoquímicas como Tricrómico de Massón, para identificar las fibras de colágeno presentes en las zonas a evaluar. Para visualizar la integridad de las células se realizó la técnica de hematoxilina y eosina y finalmente, para la demostración de polisacáridos complejos como glucosaminoglucanos y proteoglicanos de la membrana basal, se llevó a cabo la técnica de ácido periódico de Schiff (PAS) con diastasa.

### **6.7.2. Inmunohistoquímico**

Con el objeto de identificar los antígenos relacionados con el cartílago normal y el degenerado, se realizaron técnicas inmunohistoquímicas, para detectar colágeno tipo I y colágeno tipo II, usando anticuerpos específicos para cada uno de ellos.

## **6.8. ANÁLISIS DE IMÁGENES**

Se colocaron los cubreobjetos 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.

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.

## **6.9. ESTADÍSTICA**

Se analizaron todos los valores antes recabados en una base de datos desarrollada en Excel y posteriormente se analizaron mediante el programa estadístico SPSS, se evaluaron las variables cuantitativas obtenidas mediante las medidas descriptivas tradicionales (medidas de tendencia central, de exposición y de dispersión) para el total de los grupos; posteriormente se segmentaron los grupos según la matriz a la que por azar fueron asignadas y se analizaron los mismos valores, observando el comportamiento gráfico de las mismas mediante diagramas de cajas.

Se compararon los productos obtenidos en los grupos antes mencionados y entre ellos mismos (a fin de determinar si existe una tendencia estadística a la producción general de los productos) mediante pruebas de hipótesis para medias a una confiabilidad del 95%.

## **CAPÍTULO VII**

### **RESULTADOS**

#### **7.1. RESULTADOS MACROSCÓPICOS**

Los corderos permanecieron estabulados durante seis meses y posterior a este tiempo fueron sacrificados mediante los métodos previamente descritos. Antes de la toma de biopsia, se tomaron imágenes de las zonas tratadas y se pudo apreciar que en el grupo I (Figura 4), las lesiones se encontraban cubiertas por un material con apariencia de cartílago.

En el grupo II, también se pudo observar un tejido condral similar al cartílago articular, en ambos grupos, también fueron evidentes lesiones semi-cubiertas con este material, mostrando zonas con aparente falta de cartílago. Para el grupo III, se observó total ausencia de tejido condral, y en algunos casos se pudieron apreciar áreas con evidente tejido de cicatrización. Sin embargo, para poder afirmar la calidad de estos tejidos, fue necesario dirigir anticuerpos específicos a cortes histológicos y poder determinar mediante inmunohistoquímica el tipo de colágeno presente en la zona lesionada.



Figura 4. Cóndilos mediales de los corderos de los tres grupos tratados con los diferentes implantes a los seis meses post-implante. Se pueden observar las zonas en las cuales se aplicaron los diferentes injertos con condrocitos alogénicos incluidos.

## **7.2. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE LAS MATRICES MEDIANTE LA TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA (H Y E)**

En las muestras de los grupos control experimentales, se observó la histología característica de cartílago hialino: recubierto de pericondrio con células condrogénicas, también se observaron condroblastos, condrocitos en sus lagunas, aislados o en grupos isógenos, en la matriz extracelular se observaron haces organizados de fibras de colágena de tinción en acidófila, ésto se comparó con la histología del cartílago fibroso (Figura 5 A y B).

Por otra parte, en las matrices analizadas de los grupos experimentales se observó un arreglo heterogéneo de las fibras de colágena, ya que en algunas áreas se observó que las fibras forman haces organizados de manera regular, mientras que en otras áreas las fibras se observaron de manera dispersa formando redes, este patrón se presentó en todos los grupos experimentales no existiendo diferencia entre ellos (Figura 5 C-F).

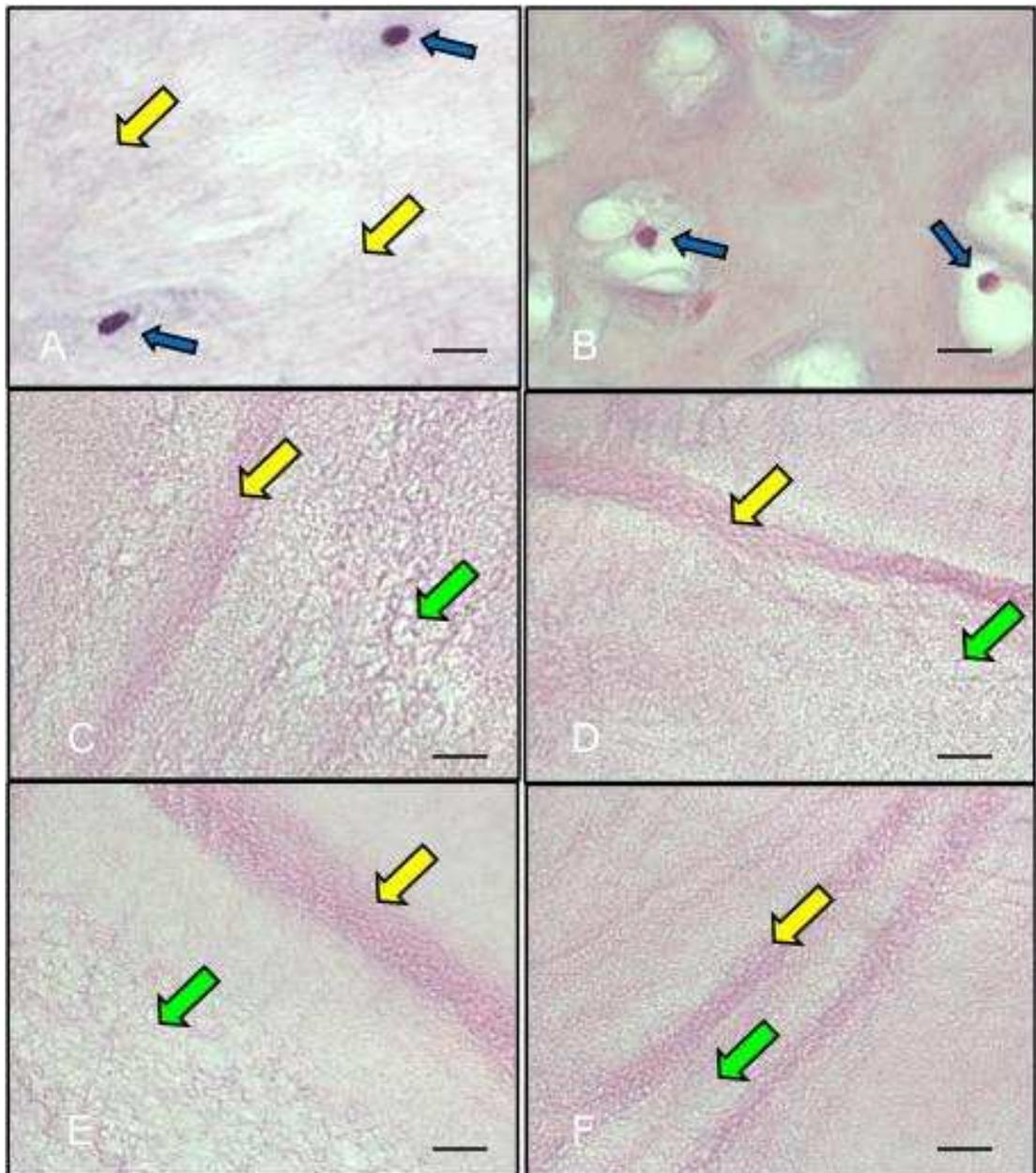


Figura 5. Tejidos testigo para la identificación de fibras de colágena tipo I y tipo II. Micrografía de luz: A) Cartílago fibroso, observe la tinción de acidófila de los haces de fibras (flechas amarillas), condrocitos (flechas azules). B) Cartílago hialino, misma descripción de A. C-F) Matrices de los grupos experimentales analizadas, observe el arreglo en forma de haces (flechas amarillas) o redes (flechas verdes) de las fibras de colágena con tinción acidófila. C y D) Grupo I. E y F) Grupo II. Embebido en parafina. H y E. Barra 10  $\mu$ m.

### 7.3. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COLÁGENA TIPO I Y TIPO II

Como controles de técnica se utilizaron cortes histológicos de tejidos testigo tales como: cartílago fibroso y hueso descalcificado para colágena tipo I (Figura 6) y cartílago hialino para colágena II (Figura 7), como control negativo de la técnica se omitió la incubación con el anticuerpo primario.

En las muestras analizadas de los grupos control y grupos experimentales se observaron resultados negativos para la presencia de colágena tipo I (Figura 8). En las muestras analizadas de los grupos control y grupos experimentales se observó positividad para la presencia de fibras de colágena tipo II (Figura 9) similar a la observada en los tejidos testigo.

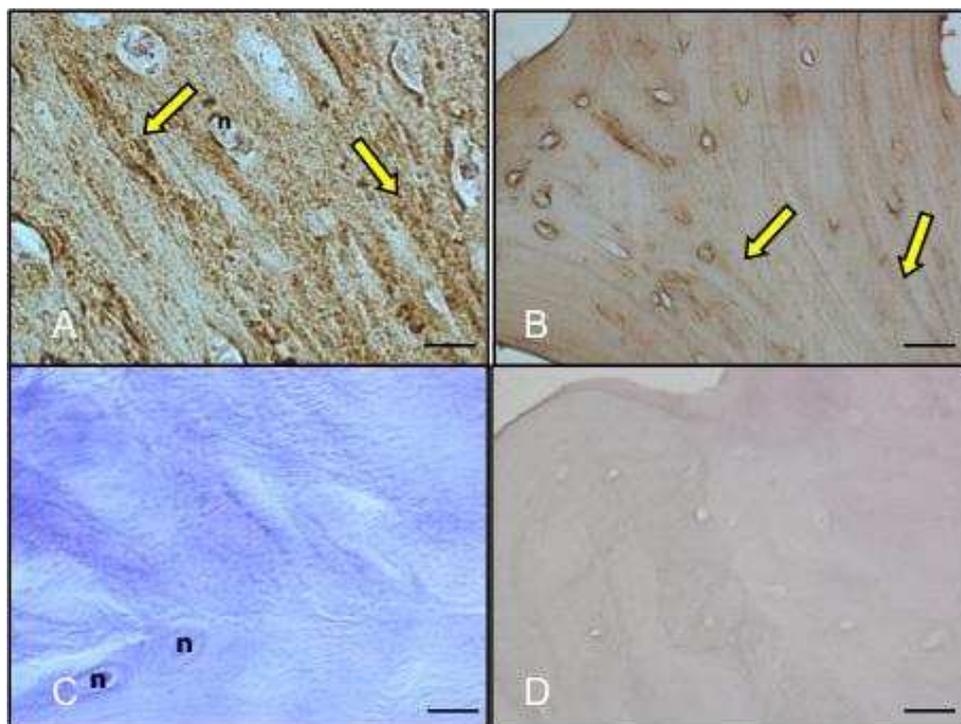


Figura 6. Tejidos utilizados como control de la técnica para la identificación de colágena tipo I. Testigos positivos. Micrografía de luz: A) Cartílago fibroso, observe la positividad en los haces de fibras (flechas), núcleos de condrocitos con su disposición lineal (n). B) Tejido óseo descalcificado, haces de fibras positivas (flechas). Controles negativos. Micrografía de luz. C) Cartílago fibroso, observe los haces de fibras con la tinción de contraste y núcleos de condrocitos (n). D) Tejido óseo descalcificado con resultados negativos en las fibras. Embebido en parafina. Inmunohistoquímica. Barra 10  $\mu$ m.

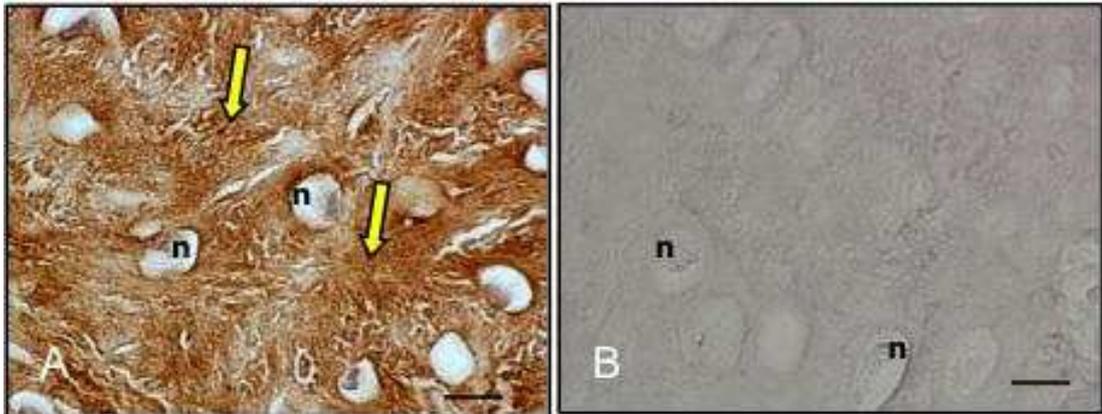


Figura 7. Tejidos utilizados como control de la técnica para la identificación de colágena tipo II. Testigo positivo. Micrografía de luz: A) Cartílago hialino, observe la positividad en los haces de fibras (flechas), núcleos de condrocitos (n). Control negativo. Micrografía de luz. B) Cartílago hialino, observe los haces de fibras con la tinción de contraste y núcleos de condrocitos (n). Embebido en parafina. Inmunohistoquímica. Barra 10 µm.

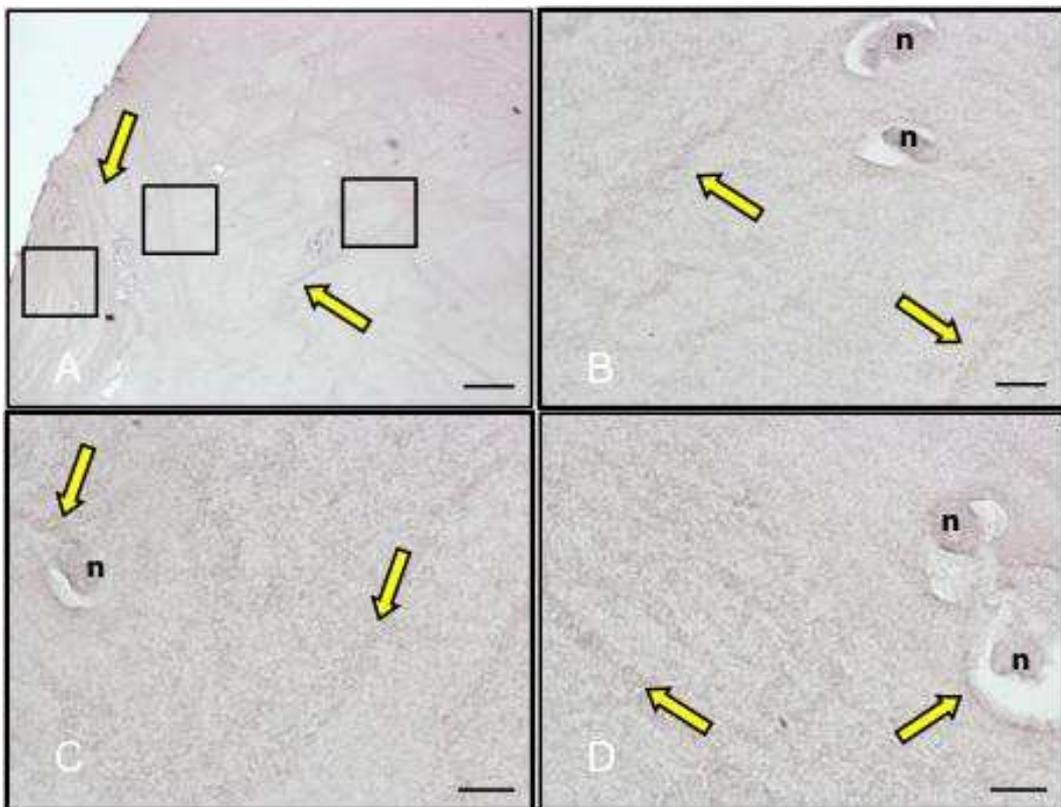


Figura 8. Matrices de los grupos experimentales analizadas para la identificación de colágena tipo I. Micrografía de luz: A) Micrografía panorámica de la muestra del grupo I, observe haces de fibras con tinción oscura (flechas amarillas). B, C y D) Amplificaciones de A: Observe una positividad disminuida en las fibras para colágena tipo I (flechas amarillas), núcleos de condrocitos (n). Embebido en parafina. Inmunohistoquímica. A: Barra 100 µm, B, C y D: Barra 10 µm.

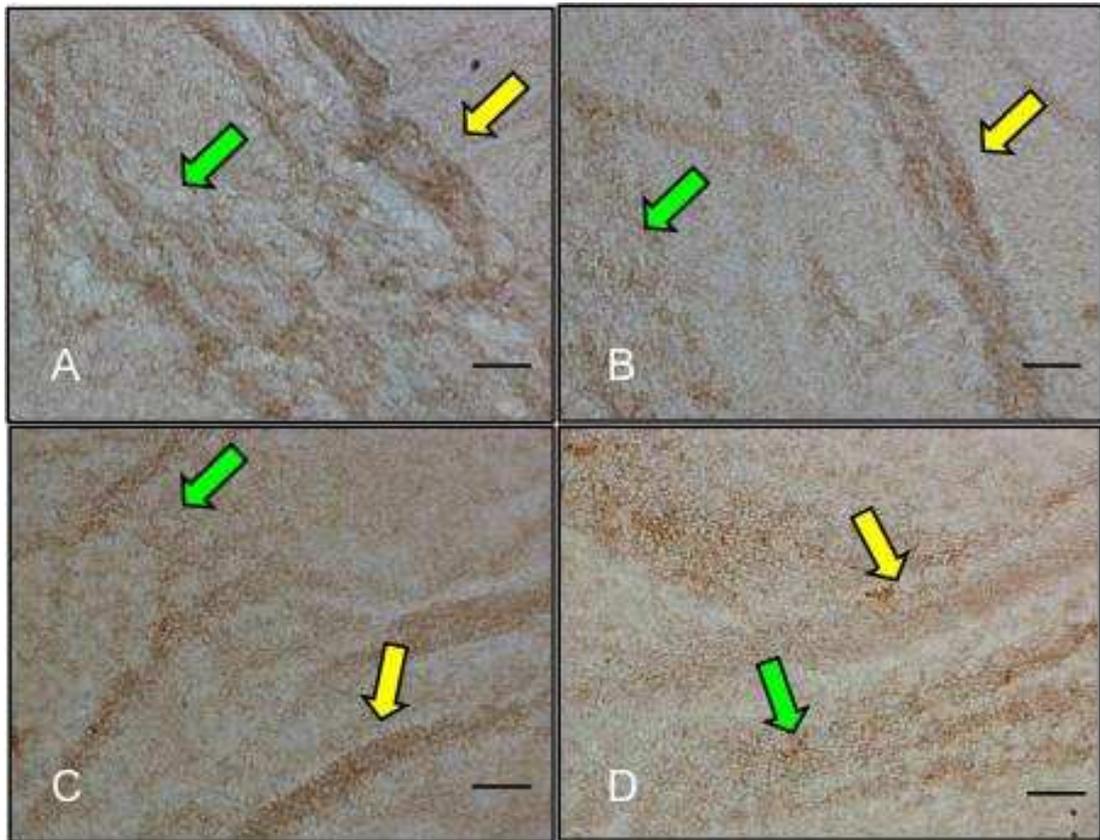


Figura 9. Matrices de los grupos experimentales analizadas para la identificación de colágena tipo II. Micrografía de luz: A) Grupo I, observe que fibras positivas forman haces (flecha amarilla), mientras que otras fibras positivas se organizan de forma reticular (flecha verde). B) Grupo II, misma descripción que A. C) Grupo I, misma descripción que A. D) Grupo IF, misma descripción que A. Embebido en parafina. Inmunohistoquímica. Barra 10  $\mu\text{m}$ .

#### 7.4. HISTOQUÍMICA PARA LA DEMOSTRACIÓN DE POLISACÁRIDOS COMPLEJOS (GLUCOSAMINOGLUCANOS Y PROTEOGLICANOS) DE LA MEMBRANA BASAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE PAS CON DIASTASA

En este apartado se decidió analizar la síntesis y secreción de componentes de la matriz extracelular como son los glucosaminoglucanos y los proteoglicanos, estos polisacáridos complejos pueden ser detectados con la técnica del ácido periódico de Schiff (PAS), observando su presencia como

una tinción magenta en la zona positiva para estos compuestos, sin embargo, como sucede en la mayoría de los tejidos y las células, se encuentran cantidades abundantes de glucógeno. Para evitar que ocurra un enmascaramiento de los compuestos de interés se puede pretratar la muestra con diastasa, ya que esta enzima digiere el glucógeno dejando solamente en la muestra los glucosaminoglucanos y los proteoglucanos. Esto se realizó en las muestras de las matrices de los grupos de estudio observando amplias zonas positivas tanto en el citoplasma de las células, en el espacio extracelular (Figura A-D), estos dos hallazgos demuestran claramente que las células están sintetizando y secretando componentes de la matriz.

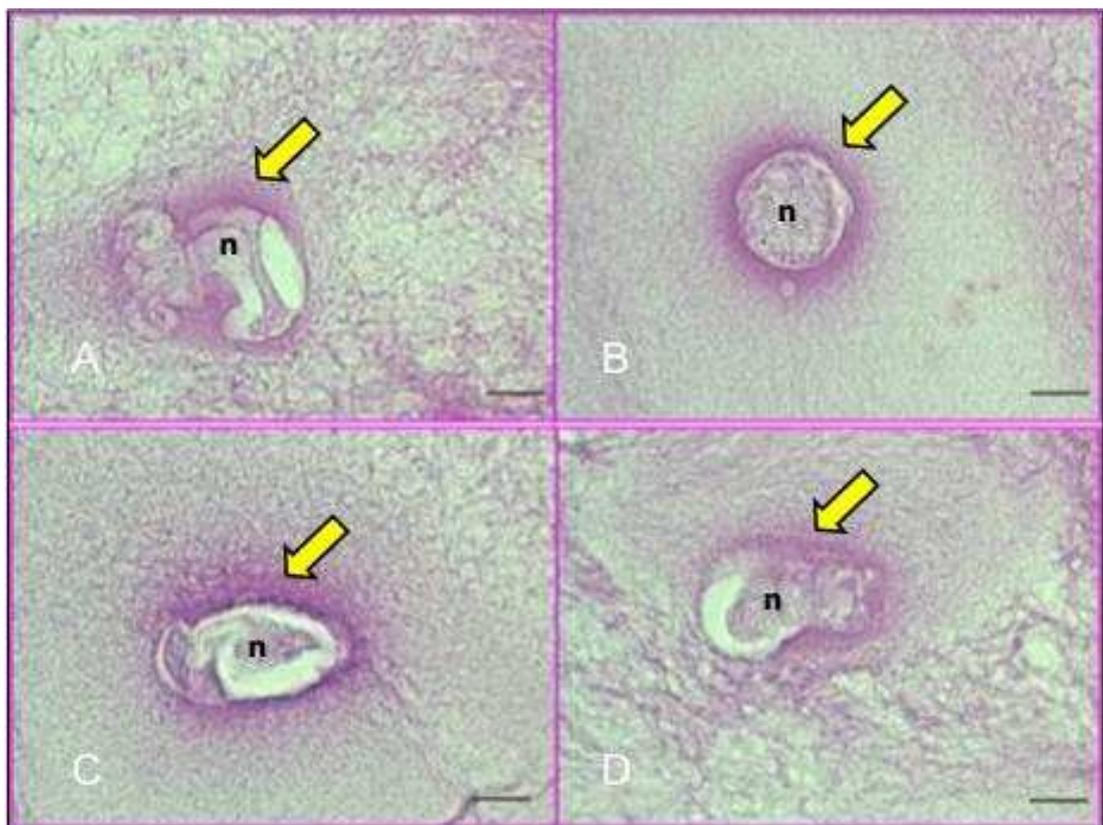


Figura 10. Matrices de los grupos experimentales analizadas para la identificación de glucosaminoglucanos y proteoglucanos. Micrografía de luz: A) Grupo I, observe la positividad alrededor de las células (flecha amarilla). B) Grupo II, misma descripción que A. C) Grupo I, misma descripción que A. D) Grupo II, misma descripción que A. Embebido en parafina. Histoquímica con PAS+ diastasa. Barra 10  $\mu$ m.

Otro dato importante fue que en zonas en las cuales se observan las fibras de colágena también se observó positividad para esta técnica (Figura 11 A-D), estos resultados sugieren que además de los glucosaminoglucanos y proteoglicanos que están siendo sintetizados por las células de la matriz, estos compuestos estén permitiendo un ensamble y organización de las fibras de colágena.

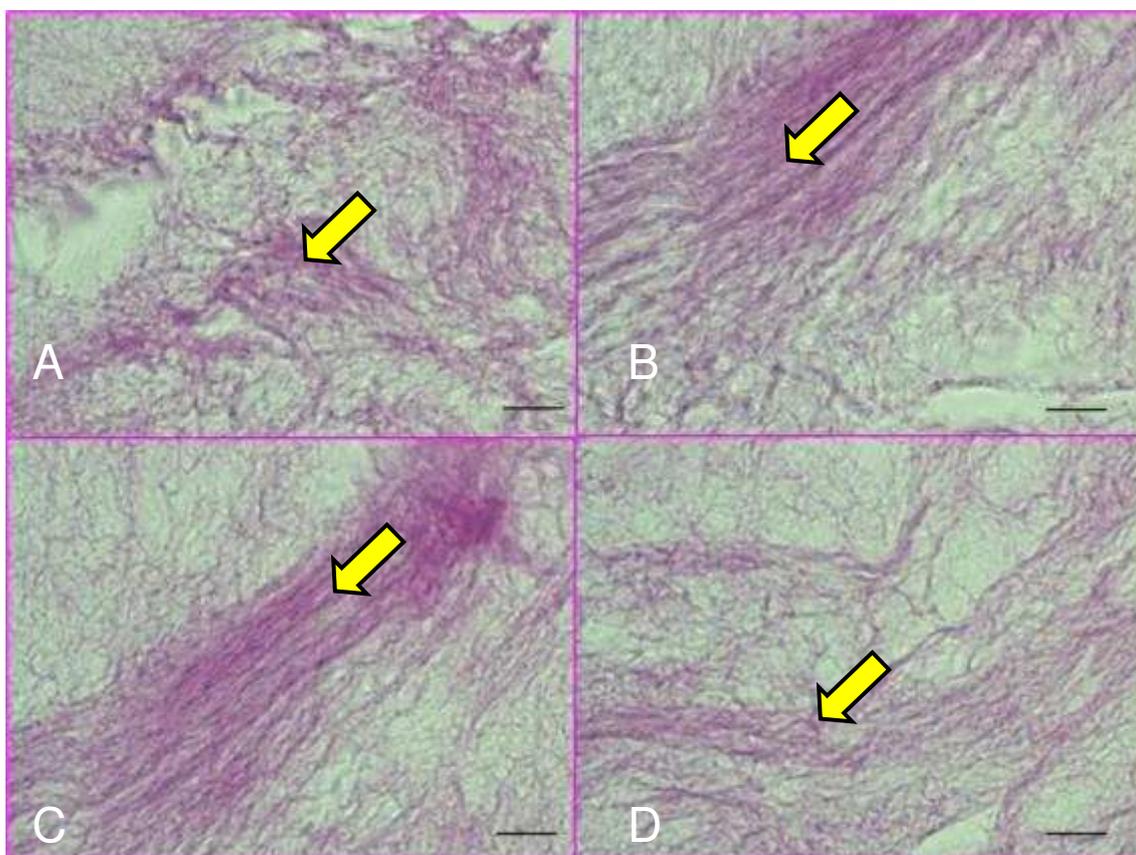


Figura 11. Matrices de los grupos experimentales analizadas para la identificación de glucosaminoglucanos y proteoglicanos. Micrografía de luz: A) Grupo I, observe la positividad en las fibras de colágena (flecha amarilla). B) Grupo II, misma descripción que A. C) Grupo I, misma descripción que A. D) Grupo II, misma descripción que A. Embebido en parafina. Histoquímica con PAS+ diastasa. Barra 10  $\mu$ m.

### 7.5. IDENTIFICACIÓN DE FIBROSIS EN EL GRUPO III

En las muestras del grupo 3 A-D no se observó la presencia de matriz, en estas muestras se observó una amplia zona de tejido fibroso, mediante

inmunohistoquímica se demostró la presencia de fibras de colágena tipo I, siendo negativa para colágena tipo II (Figura 12 A-D).

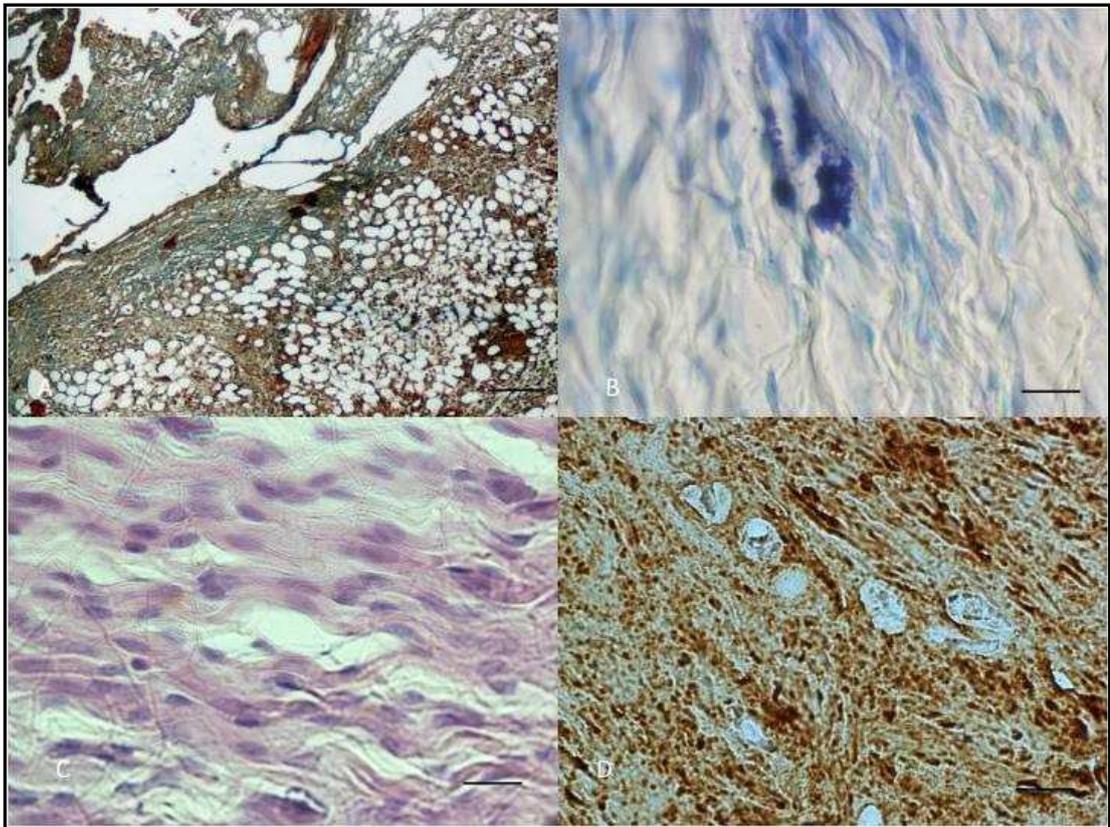


Figura 12. Identificación de fibrosis en las matrices del grupo 3 A-D. A) Micrografía de baja amplificación donde se observa una amplia área de fibrosis (color azul). Tricrómico de Massón. Barra 100  $\mu$ m. B) Micrografía donde se observa una amplia área de fibrosis (color azul). Tricrómico de Massón. Barra 10  $\mu$ m. C) Micrografía donde se observa una área de fibrosis (color rosa). H y E. Barra 10  $\mu$ m. D) Inmunohistoquímica para fibras de colágena tipo I, cartílago fibroso, observe la zona positiva en color café. Barra 10  $\mu$ m.

## 7.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se analizaron el total de resultados obtenidos de los 30 corderos evaluados, divididos aleatoriamente en tres grupos, realizando las evaluaciones de los compuestos a estudiar por triplicado; se observó de manera general que de las 90 evaluaciones realizadas, el promedio de colágeno tipo 1 fue del

51.98%, mientras que de colágeno 2 fue del 81.97% y de Gag's fue del 71.6%, como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.- Análisis descriptivo de las variables porcentuales en estudio**

	Colágeno 1	Colágeno 2	Gag's
<b>N</b>	90	60	60
<b>Media</b>	51.98	81.97	71.60
<b>Error típ. de la media</b>	2.983	.415	.328
<b>Mediana</b>	37.00	83.00	72.00
<b>Moda</b>	28	84 <sup>a</sup>	73
<b>Desv. típ.</b>	28.300	3.215	2.539
<b>Asimetría</b>	.639	-.630	-.317
<b>Error típ. de asimetría</b>	.254	.309	.309
<b>Curtosis</b>	-1.498	-.314	.116
<b>Error típ. de curtosis</b>	.503	.608	.608
<b>Mínimo</b>	24	75	65
<b>Máximo</b>	95	88	77

N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

Al analizar las evaluaciones, según el medio utilizado, Fibrina, Fibrina con Ácido Hialurónico y finalmente Ácido Poliglicólico, evaluando los mismos productos antes analizados, se presentó el comportamiento mostrado en las tablas 2, 3 y 4 respectivamente; en lo concerniente al grupo del Ácido Poliglicólico se presentó inestabilidad química del medio, lo que no permitió la producción del colágeno tipo 2 y Gag's. Al graficar mediante diagramas de cajas, podemos observar el comportamiento mostrado en las figuras 13, 14 y 15 para la producción de Colágeno tipo 1, tipo 2 y Gag's en los tres medios, eliminado el grupo de Ácido Poliglicólico en las dos últimas figuras, por los motivos antes expuestos.

**Tabla 2.- Análisis descriptivo de las variables porcentuales en estudio, para el medio de Fibrina**

Grupo		Colágeno 1	Colágeno 2	Gag's
Fibrina	N	30	30	30
	Media	37.17	80.03	70.43
	Error típ. de la media	.690	.615	.457
	Mediana	37.00	80.00	70.50
	Moda	35	80 <sup>a</sup>	73
	Desv. típ.	3.779	3.368	2.501
	Asimetría	-.138	.369	-.419
	Error típ. de asimetría	.427	.427	.427
	Curtosis	-.153	-.244	-.916
	Error típ. de curtosis	.833	.833	.833
	Mínimo	28	75	65
	Máximo	44	88	74

N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

**Tabla 3.- Análisis descriptivo de las variables porcentuales en estudio, para el medio de Fibrina con Ácido Hialurónico**

Grupo		Colágeno 1	Colágeno 2	Gag's
Fib. + Ac. Hialurónico	N	30	30	30
	Media	27.60	83.90	72.77
	Error típ. de la media	.486	.255	.367
	Mediana	27.50	84.00	72.00
	Moda	28	85	72
	Desv. típ.	2.660	1.398	2.012
	Asimetría	.475	.028	.479
	Error típ. de asimetría	.427	.427	.427
	Curtosis	-.548	-.337	-.356
	Error típ. de curtosis	.833	.833	.833
	Mínimo	24	81	70
	Máximo	33	87	77

N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

**Tabla 4.- Análisis descriptivo de las variables porcentuales en estudio, para el medio de Ácido Poliglicólico**

Grupo	Colágeno 1	Colágeno 2	Gag's
Ac. Poliglicólico	N	30	
	Media	91.17	
	Error típ. de la media	.450	
	Mediana	91.00	
	Moda	93	
	Desv. típ.	2.465	
	Asimetría	-.191	
	Error típ. de asimetría	.427	
	Curtosis	-1.108	
	Error típ. de curtosis	.833	
	Mínimo	87	
	Máximo	95	

N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

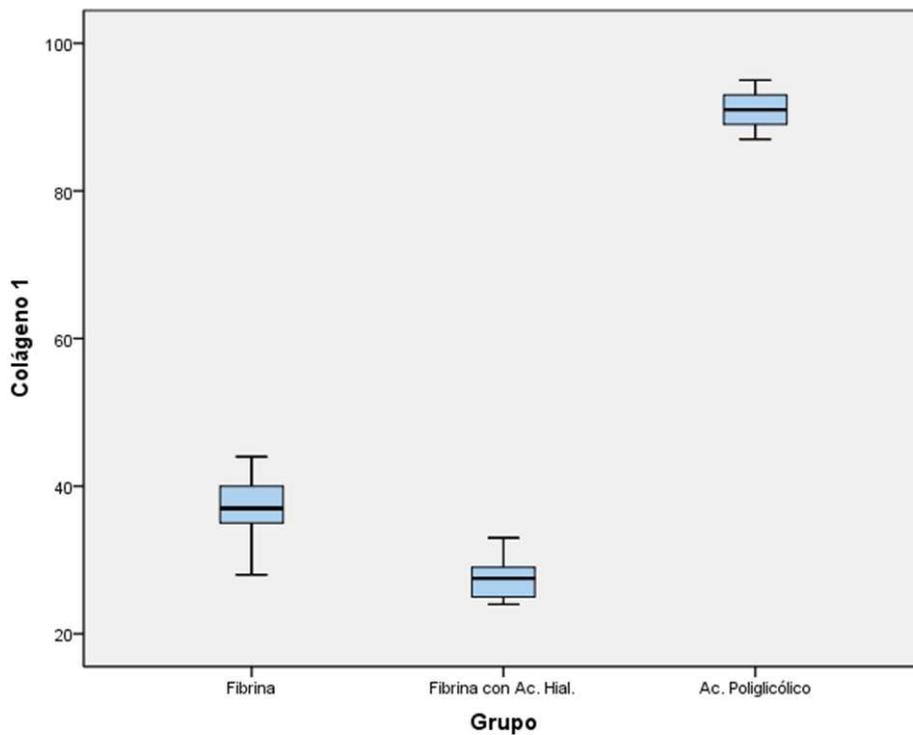


Figura 13. Diagrama de caja de la producción porcentual de colágeno tipo 1, según medio. N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

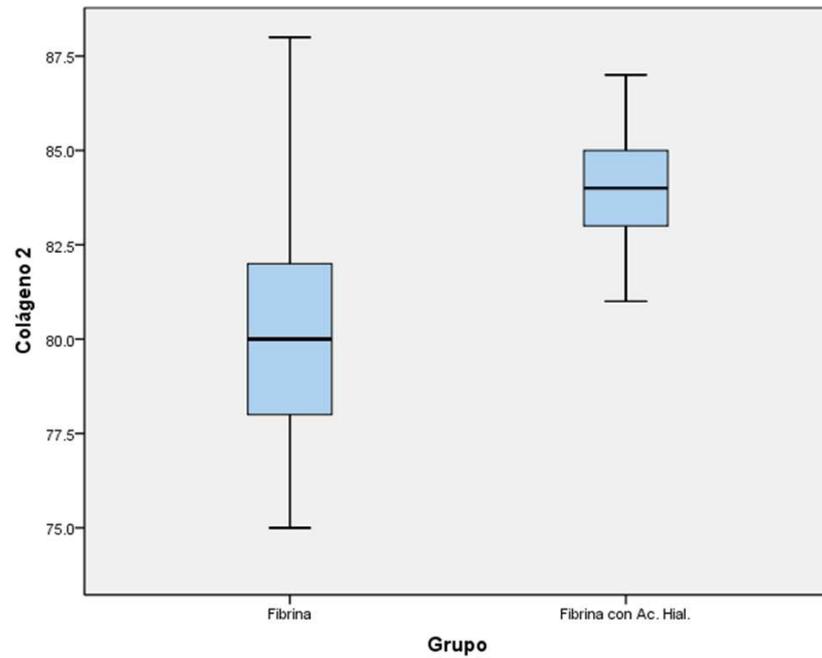


Figura 14. Diagrama de caja de la producción porcentual de colágeno tipo 2, según medio. N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

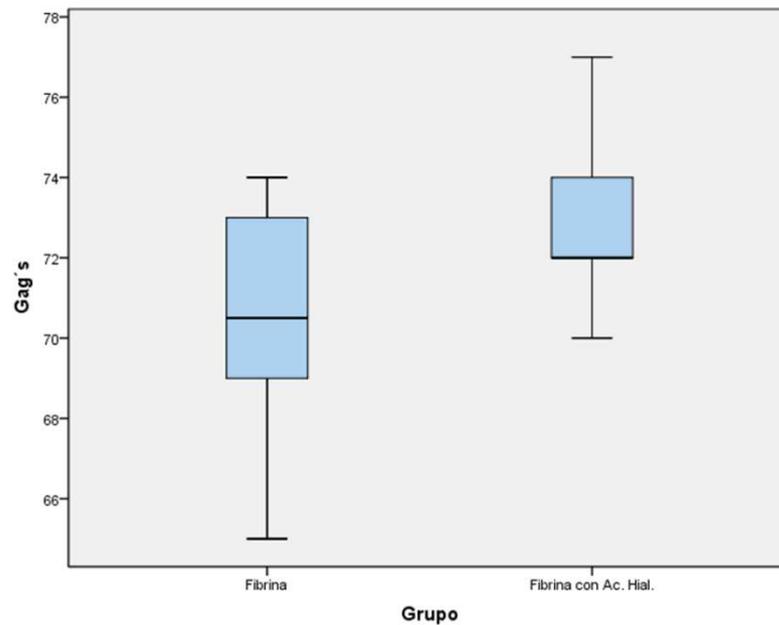


Figura 15. Diagrama de caja de la producción porcentual de Gag's, según medio. N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

Al comparar los promedios de producción de los compuestos de interés, según el medio utilizado, mediante pruebas de hipótesis para medias a una confiabilidad del 95%, se observó en el caso del colágeno tipo 1 un

promedio estadísticamente mayor del porcentaje de producción en el medio de Fibrina que en el medio de Fibrina con Ácido Hialurónico, en contraparte el medio de Ácido Poliglicólico produjo un porcentaje mayor que los otros dos medios; en lo concerniente a la producción de colágeno tipo 2 el medio de Fibrina con Ácido Hialurónico generó un porcentaje mayor que el medio de fibrina, observando el mismo comportamiento estadístico en lo concerniente al producto Gag's (tabla 4).

**Tabla 5.- Análisis de inferencia mediante pruebas de hipótesis para medias a una confianza del 95%, entre grupos y según el medio utilizado.**

	Grupo	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	Valor p
Colágeno 1	<b>Fibrina</b>	<b>37.17</b>	3.779	.690	< 0.0001
	Fib. + Ac. Hialurónico	27.60	2.660	.486	
	Fibrina	37.17	3.779	.690	< 0.0001
	<b>Ac. Poliglicólico</b>	<b>91.17</b>	2.465	.450	
	Fib. + Ac. Hialurónico	27.60	2.660	.486	
<b>Ac. Poliglicólico</b>	<b>91.17</b>	2.465	.450	< 0.0001	
Colágeno 2	Fibrina	80.03	3.368	.615	< 0.0001
	<b>Fib. + Ac. Hialurónico</b>	<b>83.90</b>	1.398	.255	
Gag's	Fibrina	70.43	2.501	.457	< 0.0001
	<b>Fib. + Ac. Hialurónico</b>	<b>72.77</b>	2.012	.367	

N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

Al comparar dentro de cada medio, la producción de los tres compuestos, a fin de evaluar si existe una mayor predisposición del medio para la generación de alguno de los mismos, podemos observar, mediante la misma técnica estadística antes descrita a la misma confiabilidad, la presencia de un porcentaje de producción estadísticamente superior de colágeno tipo 2 que de los otros dos compuestos y de Gag's que de colágeno tipo 1, en el caso del medio de fibrina; en el medio de Fibrina con Ácido Hialurónico se observó exactamente el mismo comportamiento. El análisis del tercer medio no se pudo realizar por la inestabilidad química del medio antes descrita.

**Tabla 6.- Análisis de inferencia mediante pruebas de hipótesis para medias a una confianza del 95%, entre medios y según el compuesto producido.**

Medios		Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	Valor p
Fibrina	Colágeno tipo 1	37.17	3.779	.690	< 0.0001
	<b>Colágeno tipo 2</b>	<b>80.03</b>	3.368	.615	
	Colágeno tipo 1	37.17	3.779	.690	< 0.0001
	<b>Gag</b>	<b>70.43</b>	2.501	.457	
	Colágeno tipo 2	80.03	3.368	.615	< 0.0001
	Gag	70.43	2.501	.457	
Fib. + Ac. Hialurónico	Colágeno tipo 1	27.60	2.660	.486	< 0.0001
	<b>Colágeno tipo 2</b>	<b>83.90</b>	1.398	.255	
	Colágeno tipo 1	27.60	2.660	.486	< 0.0001
	<b>Gag</b>	<b>72.77</b>	2.012	.367	
	Colágeno tipo 2	83.90	1.398	.255	< 0.0001
	Gag	72.77	2.012	.367	

N= 30 corderos en 90 mediciones / Fuente.- Instrumento estandarizado.

## CAPÍTULO VIII

### DISCUSIÓN

En este estudio experimental, en el cual condrocitos alogénicos fueron incluidos en tres diferentes matrices, el objetivo fue evaluar que variante es más efectiva en la reparación de un defecto condral. Este procedimiento es una técnica novedosa que pretende explotar la biotecnología de banco de tejidos para obviar uno de los dos procedimientos quirúrgicos<sup>122</sup> requeridos en la técnica clásica de Cultivo e Implantación de Condrocitos Autólogos (CICA), técnica estandarizada y aplicada por primera vez en el país dentro del Servicio de Ortopedia y Traumatología de nuestro Hospital.

De la misma forma que en la técnica clásica, las células obtenidas son cultivadas en monocapa. La utilización de células alogénicas evita la necesidad de una biopsia previa para la expansión de las células. Para su inclusión se eligieron tres diferentes matices GRUPO I: Matriz de Fibrina Humana, GRUPO II: Matriz de Fibrina Humana + Ácido Hialurónico, GRUPO III: Matriz de Ácido Poliglicólico, todas las matrices han comprobado su capacidad para mantener el fenotipo condrocítico, en diversos trabajos<sup>123-125</sup>.

Como animal de experimentación se eligió al cordero (*Ovis aries*), de 4-6 meses de edad y con un peso promedio entre los 20-30 kg; debido a su docilidad y al hecho de que como animal de rebaño, su interacción con otros animales de su misma especie es adecuada, permite que sea estabulado en un habitáculo común y aunado a la facilidad de su manejo. Además, a esta edad, el cordero presenta una madurez músculo-esquelética apropiada y representa un buen modelo experimental dentro de la escala filogenética y

su condición de cuadrúpedos brinda una mejor opción de carga frente a otras especies filogenéticamente inferiores como los conejos y cobayas<sup>126</sup>.<sup>127</sup>. El cartílago de la zona distal del fémur en el cordero es de espesor inferior al humano pero lo suficientemente grueso como para ser estudiado histológica e histomorfométricamente.

La utilización de polímeros bioabsorbibles como vehículos acarreadores de células es una característica de la segunda generación de CICA, las propiedades de este tipo de matriz permite a las células un medio tridimensional, en el cual pueden ser transportadas, brindan una distribución a lo largo de todo el defecto y ofrece las características necesarias para proliferar y conseguir comunicación intercelular y activarse para disgregar esa matriz y producir su propia matriz extracelular, además de permitir que células del tejido adyacente migren a su interior para interactuar con las células transportadas.

Actualmente un gran campo de investigación dentro de la ingeniería tisular es el desarrollo de matrices, con un objetivo común, el desarrollar, encontrar o perfeccionar una matriz que proporcione una estructura temporal que permita una adecuada inclusión de las células, biocompatible, que proporcione una buena adherencia celular, que tenga una alta porosidad, que sea bioabsorbible para ser degradada enzimáticamente por las células al ocurrir la reparación de la lesión con la consecuente producción de una nueva matriz extracelular, que permita la interacción con las células del tejido vecino y que guíe la migración de éstas a la lesión favoreciendo la regulación de actividad celular como proliferación y diferenciación celular, actividades necesarias para la regeneración del defecto<sup>128</sup>.

Es importante considerar que la matriz debe contar con propiedades biomecánicas que permitan soportar tempranamente las solicitaciones de carga sin comprometer la integridad del implante.

Existen numerosas matrices con distinta composición que han sido utilizadas como acarreadores celulares, por su composición se pueden clasificar en biológicas, sintéticas y mixtas, por sus características físicas pueden dividirse en sólidas, líquidas y geles.

Los componentes orgánicos como la fibrina y la combinación de fibrina y ácido hialurónico, han sido estudiados en el desarrollo de matrices con la intención de aprovechar el limitado efecto inflamatorio debido a reacción de cuerpo extraño que producen, esto gracias a su composición.

Los defensores de la utilización de las matrices sintéticas resumen como ventajas las cualidades bioquímicas y mecánicas alcanzadas con una matriz sintéticamente diseñada, las cuales pueden ser más fácilmente modificadas que en un polímero natural<sup>129</sup>.

Existen una amplia gama de polímeros sintéticos utilizados como acarreadores celulares, de ellos los más comúnmente usados son aquellos compuestos polilácticos en particular aquellos a base de ácido poli-glicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) y sus co-polímeros ácido láctico-glicólico, estos compuestos tienen muchas aplicaciones en el campo de la medicina y cuentan con la ventaja de ser absorbibles aunque con un grado de absorción lento, el cual puede ser modificado para diseñar una tasa de degradación acorde a las necesidades, son biocompatibles, y al ser biodegradadas a través de un proceso de hidrólisis a metabolitos no tóxicos que son excretados sistémicamente, la versatilidad que le proporciona estas

características permiten que hallan sido utilizadas como matriz para la inclusión celular, ya que presentan las características moleculares como la porosidad que permite el intercambio celular de nutrientes y productos de desecho, además de proporcionar un adecuado medio con adherencia y proliferación celular, permitiendo la libre producción de matriz extracelular propia de cada línea celular por lo que ha sido utilizada en ingeniería tisular en el sistema músculo-esquelético para la inclusión celular de condrocitos<sup>130</sup>.

131

En nuestro estudio al comparar la matriz utilizada cuantificando la producción de los compuestos como el Colágeno I, Colágeno II y Glucosaminoglicanos, el mayor porcentaje de producción del colágeno tipo I en el medio de Ácido Poliglicólico comparado con la matriz de Fibrina y de Fibrina con Ácido Hialurónico, nos permite concluir que las matrices biológicas a base de fibrina y aun más la combinación de esta última con el ácido hialurónico son un medio óptimo para minimizar la producción de este tipo de colágeno aeróbico característico del fibrocartílago, tejido de menor calidad para la asimilación de las sollicitaciones de carga, de la misma forma de estos dos medios principalmente de la combinación de fibrina con ácido hialurónico, permitieron que las células expresen en mayor cantidad el colágeno tipo II y glucosaminoglicanos, macromoléculas que interaccionan y son responsables de la capacidad osmótica del cartílago así como del adecuado funcionamiento biomecánico del mismo.

Nuestro estudio concluye al igual que los presentados por Visna y colaboradores<sup>120</sup> y las series de Gobbi y Marcacci<sup>132, 133</sup> en los cuales el uso de matrices biológicas como la fibrina y el ácido hialurónico proporcionan un

medio óptimo para la producción de un tejido de reparación de características histológicas y moleculares muy semejantes al cartílago hialino característico de las articulaciones sinoviales, con las condiciones biomecánicas adecuadas para brindar un adecuado funcionamiento articular; Así mismo en nuestro estudio a diferencia del trabajo de Freed y colaboradores<sup>134, 135</sup> encontramos que la matriz sintética de Ácido Poliglicólico ofrece un medio con una inestabilidad química que dificulta el adecuado desarrollo del tejido cartilaginoso de reparación.

Hay que destacar que el tamaño de la muestra fue calculado en necesidad de la potencia estadística, y que el período de estabilización fue limitado a 6 meses. La homogeneidad de la población de estudio y el control quirúrgico de la localización de la lesión, fueron factores que favorecieron estadísticamente el valor de los resultados, sin embargo cabe resaltar que el factor de la lesión constituye por si mismo una variante a considerar al transpolar los resultados obtenidos a lo que se esperaría encontrar en su aplicación clínica, ya que en todos los casos la lesión fue producida quirúrgicamente, lo cual brinda un ambiente muy distinto al de la mayoría de las lesiones observadas en la clínica. Hay una tendencia a ampliar la inclusión de criterios en los últimos estudios sobre las técnicas de reparación del cartílago, especialmente los que se refieren a discutir las técnicas de andamiaje<sup>136-141</sup>. En criterios generales, una mayor inclusión y consenso en torno a la exclusión y cómo hacer frente a problemas como la heterogeneidad de la localización de la lesión. Este estudio con una matriz (condrocitos alogénicos / incluidos en tres diferentes matrices), utilizados en la reparación del cartílago, que es la primera que se describe en la literatura

nos permite presentar los resultados histológicos e histomorfométricos después de seis meses de la cirugía y ahora sirve como un control para futuros estudios con los protocolos modificados. Estos resultados a corto plazo ilustran la viabilidad de la aplicación de la técnica descrita. Este concepto consiste esencialmente en un trasplante quirúrgico de un solo paso. Los resultados de este estudio piloto nos inspiran para buscar mejoras. Modificaciones futuras ya se han planeado, incluyendo la selección de los donantes sobre la base de algunas de las características ideales como sitio donante<sup>142</sup>, la edad<sup>143</sup> y la condición física, un control de calidad para el procedimiento en las células implantadas como la defendida por Saris y colaboradores<sup>144</sup>, y la mejora de la capacidad condrogénica de las matrices biológicas, y evaluar nuevas posibilidades a futuro como la adición de factores de crecimiento<sup>145, 146</sup>. Los resultados de los grupos correspondientes a las matrices de tipo biológicas han sido alentadores, si bien no así el de la matriz sintética a base de ácido poliglicólico. Llegados a este punto vemos el papel fundamental que juega el microambiente celular para la reparación del cartílago. A la vista de nuestros resultados nos planteamos dos líneas de trabajo. Por un lado la mejora del material acarreador celular que ya empleamos incluyendo ácido hialurónico, y por otro lado, uno de los aspectos que más nos atraen es la aplicación de técnicas propias de bioingeniería que permitan enriquecer la matriz con factores de crecimiento planteándonos el control de su liberación a través de nanotecnología.

## **CAPÍTULO IX**

### **CONCLUSIONES**

- Los condrocitos alogénicos cultivados in vitro, puede ser eficaz en el tratamiento de lesiones articulares de espesor completo.
- Las matrices de fibrina y la mezcla de fibrina/ácido hialurónico, son capaces de mantener el fenotipo, así como la síntesis de proteínas estructurales del cartílago articular.
- La matriz de ácido poliglicólico no fue capaz de mantener una estabilidad química que permita la vida, la proliferación y la producción de proteínas secretadas por los condrocitos alogénicos.
- La matriz de fibrina en combinación con el ácido hialurónico fue el resultado más eficiente para la producción de Colágeno tipo II y GAG's a seis meses post-implante. A pesar de no encontrar una diferencia estadística significativa.
- La matriz compuesta por la combinación de fibrina y ácido hialurónico fue capaz de inducir una disminución en la síntesis de colágeno tipo I, en comparación con el implante compuesto por fibrina.

## CAPÍTULO X

### REFERENCIAS

1. MANKIN HJ, MOW, VC, BUCKWALTER JA, IANNOTI JP, RATCLIFFE A. Forma y función del cartílago articular, en *Ciencias Básicas en Ortopedia*. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1997; 3-45.
2. BUCKWALTER JA, MANKIN HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. AAOS Instructional Course Lectures, 1998; volume 47: 477-86.
3. BUCKWALTER JA, ROSENBERG LC. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans: Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein. *J Biol Chem*, 1982; 257
4. AYDELOTTE MB, SCHUMACHER BL, KUETTNER KE. Heterogeneity of articular chondrocytes, en *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York, 1992; pp: 237-49.
5. POOLE CA. FLINT MH, BEAUMONT BW. Morphological and functional interrelationship of articular cartilage matrices. *Journal of Anatomy*, 1984; 138: 113-38.
6. MIOSGE N, FLACHSBART K, GOETZ W, SCHULTZ W, KRESSE, HERKEN R. Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee cartilage. *Histochemical Journal*, 1994; 26: 939-5.
7. MASON RM. Recent advances in the biochemistry of hyaluronic acid in cartilage, en *Connective Tissue Research: Chemistry, Biology and Physiology* (Ed. Detl Z, Adam M). New York, 1981; 87-112.

8. RATCLIFFE A, MOW VC. Articular Cartilage, en *Extracellular Matrix: Vol1. Tissue Function* (Ed. Comper WD). The Neatherlands: Harwood Academic publishers, 1996. 234-302.
9. GLANT TT, HADHAZY CS, MICKEZ K, SIPOS A. Appearance and persistence of fibronectina in cartilage. Specific interaction of fibronectina with collagen type II. *Histochemistry*, 1985; 82: 149-58.
  
10. DURR J, LAMMI P, GOODMAN SL, AIGNER T, VON DER MARK K. Identification and immunolocalization of lamin in cartilage. *Experimental cell Research*, 1996; 222: 225-33.
  
11. POOLE CA, AYAD S, SCHOFIELD JR. Chondrons from articular cartilage (I). immunolocalization of type VI collagen in the pericelular capsule of isolated canine chondrons. *Journal of Cell Science* , 1988 b; 90: 635-45.
  
12. POOLE CA, AYAD S, GILBERT RT. Chondrons from articular cartilage (V). immunohistochemical evaluation of type VI collagen organization in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *Journal of Cell Science*, 1992; 103: 1101-10.
  
13. MEACHIM G, STOCKWELL RA. The Matrix, en *Adult Articular Cartilage*. 2<sup>nd</sup> Ed (ED. Freeman MAR). Tunbridge Wells: Pitman Medical, 1979; 1-67.
  
14. FISCHER AE, CARPENTER TA, TYLER JA, HALL LD. Visualization of mass transport of small organic molecules and metal ions through articular cartilage by magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging*, 1995;13: 819-26.
  
15. BUCKWALTER JA, LANE NE. Aging, sports and osteoarthritis. *Sports med Arthrosc rew*, 1996; 4: 276-87.
  
16. BUCKWALTER JA. Activity vs rest in the treatment of bone, soft tissues and joint injuries. *Iowa Orthop j*, 1995 a; 13: 29-42.
  
17. BUCKWALTER JA. Osteoarthritis and articular cartilage use, disuse, and abuse: Experimental studies. *J Rheumatol*, 1995b; 43: 13-5.

18. EYRE DR. Collagen structure and function in articular cartilage: Metabolic changes in the development of osteoarthritis, in Kuettner KE, Goldberg VM (Eds): *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1995; pp 219-29.
  
19. EYRE DR, WU JJ, WODDS P. Cartilage-specific collagens: Structural studies, in Kuettner Ke, Schleyerbach R, Peyron JG (Eds): *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York, NY. Raven Press, 1992; pp119-31.
  
20. SANDELL LJ. Molecular biology of collagens in normal and osteoarthritic cartilage, in Kuettner KE, Goldberg VM (Eds): *Osteoarthritic Disorders*. Rosemont, IL. American Academy of orthopaedic surgeons, 1995; pp 131-46.
  
21. POOLE AR, MATSUI Y, HINEK A, LEE R. Cartilage macromolecules and the calcification of the cartilage matrix. *Anat Rec*, 1989;224:167-79.
  
22. ERLEBACHER A, FILVAROFF EH, GITELMAN S, DERYINCK R. Towards a molecular understanding of skeletal development. *Cell*, 1995; 80: 371-8.
  
23. EYRE DR, APONE S, WU JJ, ERICSSON LH, WALSH KA. Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen cartilage. *FEBS Lett*, 1987; 220: 337-41.
  
24. WOTTON SF, DUANCE VC, FYER PR. Type IX collagen: a possible function in articular cartilage. *FEBS letters*, 1988; 234: 14-7.
  
25. WOTTON SF, JEACOCKE RE, MACIEWICZ RA, WARDALE RJ, DUANCE VC. The application of scanning confocal microscopy in cartilage research. *Histochemical Journal*, 1991; 23: 328-35.

26. HEINEGARD D, OLDBERG A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J*, 1989,3 2042-51.
27. LINSENMAYER TF, CHEN Q, GIBNEY E, GORDON MK, MARDRANT JK, MAYNE R, SCMID TM. Collagen types IX and X in developing chick tibiotarsus: Analysis of mRNAs and proteins. *Devol Biol*, 1991; 111: 191-6.
28. SANDELL LJ, SUGAI JV, TRIPPEL SB. Expression of collagens I,II,III,X and XII and aggrecans mRNAs by bovine growth plate chondrocytes in situ. *J Orthop Res*, 1994; 12: 1-14.
29. BUCKWALTER JA, PITA JC, MÜLLER FJ, HOWELL DS. Structural differences between two populations of articular cartilage proteoglycan aggregates. *J Orthop Res*, 1994; 12: 144-8.
30. PITA JC, MÜLLER FJ, MANICOURT DH. Early matrix changes in experimental osteoarthritis and joint disuse atrophy. En: *Articular cartilage and osteoarthritis*. Kuettner KE, Schleverbach R, Peyron JG, (Eds). NY Raven Press, New York, 1992; pp.455-69.
31. BUCKWALTER JA, KUETTNER KE, THONAR EJ. Age-related changes in articular cartilage proteoglycans: Electron Microscopic studies. *J Orthop Res*, 1985; 3: 251-7.
32. HILDEBRAND A, ROMARIS M, RASMUSSEN LM, HEINEGARD D, TWARDZIK DRE, BORDER WA, RUOSLATCH E. Interactions of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with Transforming Growth Factor Beta. *Biochem J*, 1994; 302: 527-34.
33. PFAFFLE M, BORCHER M, DEUTZMANN R, VON DER MARK K, FERNÁNDEZ MP, SELMIAN O, YAMADA Y, MARTÍN G, RUGGIERO F, GARRONE R. Anchorin CII, a collagen-binding chondrocyte surface protein of the calpactin family. *Prog Clin Biol Res*, 1990; 349: 147-57.
34. KIELTY CM, WHITAKER SP, GRANT ME, SHUTTLEWORTH CA. Type VI microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *Journal of Cell Biology*; 1992; 118: 979-90.

- 35.** LOHMANDER LS, SANE T, HEINEGARD DK. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*, 1994; 53: 8-13.
- 36.** DIJKGRAAF LC, DE BONT LGM, BOERING G, LIEM RSM. Normal cartilage structure, biochemistry and metabolism: a review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*, 1995; 53: 924-9.
- 37.** TRELSTA RL: Matrix glycoproteins in KELLEY WN; HARRIS ED; RUDDY S; (eds): *Textbook of Rheumatology* (ed 3). Philadelphia, PA, Saunders, 1989; pp 42-53.
- 38.** CHOPRA R, AMASTASSIADES T. Specificity and synergism of polypeptide growth factors in stimulating the synthesis of proteoglycans and a novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures. *J Reumatol*, 1998; 25: 1578-84.
- 39.** LOESER RF. Integrin-mediated attachment of articular chondrocytes to extracellular matrix protein. *Arthritis Rheum*, 1993; 36: 1103-10.
- 40.** SHAKIBAEI M. Integrin expression on epiphyseal mouse chondrocytes in monolayer culture. *Histol Histopathol*, 1995; 10: 339-49.
- 41.** SHAKIBAEI M. Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res*, 1998; 240: 95-106.
- 42.** MOLLENHAUER J, BEE JA, LIZARBE MA, VON DER MARK K. Role anchorin CII, a 31000- mol-wt membrane, in the interaction of chondrocytes with type II collagen. *J Cell Biol*, 1984; 98: 1572-8.
- 43.** JALKANEN M, JALKANEN S, BERNFIELD M. Binding of extracellular effector molecules by cell surface proteoglycans. En: McDonald JA, MECHAM RP (Eds). *Receptors for extracellular matrix*. San Diego

44. MALESKI MP, KNUDSON CB, Hyaluronan-mediated aggregation of limb bud mesenchyme and mesenchymal condensation during chondrogenesis. *Exp Cell Res*, 1996; 225: 55-66.
45. HYNES RO. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 1987; 48: 549-54.
46. HYNES RO, BADER BL, HODIVALA-DILKE K. Integrins in vascular development. *Braz J Med Biol Res*, 1999; 32: 501-10.
47. BADER BL, RAYBURN H, CROWLEY D, HYNES RO. Extensive vasculogenesis, angiogenesis and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell*, 1998; 95: 507-19.
48. SARKISSIAN M, LAFYATIS R. Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol*, 1999; 162: 1772-9.
49. MILLWARD-SADLER SJ, WRIGHT MO, LEE H, NISHIDA K, CALDWELL H, NUKI G, SALTER DM. Integrin-regulated secretion of interleukin 4: a novel pathway of mechanotransduction in human articular chondrocytes. *J Cell Biol*, 1999; 145: 183-9.
50. HAGIWARA H, SCHRÖTER-KERMANI C, MERKER HJ. Localization of collagen type VI in articular cartilage of young and adult mice. *Cell Tissue Res*, 1993; 272: 155-60.
51. MAUCH C, MARK K VON DER, HELLE O, MOLLENHAUER J, PFAFFLE M, KREIG T. A defective cell surface collagen-binding protein in dermatosparactic sheep fibroblasts. *J Cell Biol*, 1998; 106: 205-11.
52. VEGA JA, GARCIA-SUAREZ O, MARTINEZ-ALMARGO A. Cartílago articular y factores de crecimiento. *Mapfre Medicina*, 2000; 11: 212-25.

- 53.** BONNER WM, JONSSON H, MALANOS C, BRYANT M. Changes in the lipids of human articular cartilage with age. *Arthritis Rheum*, 1975; 18: 461-73.
- 54.** VIGNON E, MATHIEU P, LOUISOT P, VILAMITJANA J, HARMAND MF, RICHARD M. Phospholipase A2 activity in human osteoarthritic cartilage. *J Rheumatol Suppl*, 1989; 18: 35-8.
- 55.** MUIR H. The chondrocyte, architect of cartilage. *Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. Bioessays*, 1995; 17: 1039-48.
- 56.** POOLE CA. Articular cartilage chondrons: form, function and failure. *J Anat*, 1997; 191: 1-13.
- 57.** HILL DJ, LOGAN A. Peptide growth factor and their interactions during chondrogenesis. *Prog Growth Factor Res*, 1992; 4: 45-68.
- 58.** SCHAFER SJ, LUYTEN FP, YANAGISHITA M, REDDI AH. Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet-derivate growth factor in bovine articular cartilage explants cultures. *Arch Biochem Biophys*, 1993; 302: 431-8.
- 59.** MARTIN JA, ELLEBROEK SM, BUCKWALTER JA. Age-related decline in chondrocytes response to insulin-like growth factor-I: the role of growth factor binding proteins. *J Orthop Res* 1997; 15: 491-8.
- 60.** NIXON AJ, LILICH JT, BURTON-WURSTER N, LUST G, MOHAMMED HO. Differentiated cellular function in fetal chondrocytes cultured with insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- $\beta$ . *J Orthop Res*, 1998; 16: 531-41.
- 61.** DAUGHADAY WH, ROTWEIN P. Insulin-like growth factor-I and II peptide messenger ribonucleic and gene structures, serum and tissue concentrations. *Endocrine Rev*, 1989; 10: 68-91.

62. SEYEDIN SM, ROSEN DM. Matrix proteins of skeleton. *Curr Opin Cell Biol*, 1990; 2: 914-9.
63. WANG E, WANG J, CHIN E, ZHOU Y, BANDY CA. Cellular patterns of insulin-like growth factor system gene expression in murine chondrogenesis and osteogenesis. *Endocrinology*, 1995; 136: 2741-51.
64. TAKIGAWA M, OKAWA T, PAN H, AOKI C, TAKAHASHI K, ZUE J, SUZUKI F, KINOSHITA A. Insulin-like growth factors I and II are autocrine factors in stimulation proteoglycan synthesis, a marker of differentiated chondrocytes, acting through their respective receptors in a clonal human chondrosarcoma derived cell line HCS-2/8. *Endocrinology*, 1997; 138:4390-400.
65. TYLER JA. Insulin-like growth factor I can decrease degradation and promote synthesis of proteoglycan in cartilage exposed to cytokines. *Biochem J*, 1989, 260: 543-8.
66. DEMARQUAY D, DUMONTIER MF, TSAGRIS L, BOURGIGNON J, NATAF V, CORVOL MT. In vitro insulin-like growth factor I interaction with cartilage cells derived from postnatal animals. *Horm Res*, 1990; 33:111-5.
67. CHANDRASEKHAR S, HARVEY AK, STACK ST. Degradative and repair responses of cartilage to cytokines and growth factors occur via distinct pathways. *Agents actions*, 1993; 39: 121-5.
68. VAN DE KRAAN PM, VITTERS EL, VAN DEN BERG WB. Inhibition of proteoglycans synthesis by transforming growth factor in anatomically articular cartilage of murine patellae. *Ann Rheum Dis*, 1992; 51: 643-7.
69. SMITH RJ, JUSTENJ, SAM LM, ROHLOFF NA, RUPPEL PL, BRUNDER MN, CHIN JE. Platelet-derived growth factor potentiates cellular response of articular chondrocytes to interleukin-1. *Arthr Rheum*, 1991; 34: 697-706.
70. HARVEY AK, STACK ST, CHANDRASHEKAR S. Differential modulation of degradative repair responses of interleukin-1-treated

chondrocytes by platelet-derived growth factor. *Biochem J*, 1993; 292:129-36.

71. SCHAFFER SJ, LUYTEN FP, YANAGISHITA M, REDDI AH. Proteoglycan metabolism is age related and modulated by isoforms of platelet-derived growth factor in bovine articular cartilage explants cultures. *Arch Biochem Biophys*, 1993; 302: 431-8.
72. GUERNE PA, BLANCO F, KAELIN A, DESGEORGES A, LOTZ M. Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Rheum*, 1995; 38: 960-8.
73. SIPE JD. Acute-phase proteins in osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum*, 1995; 25: 75-86.
74. WESTACOTT CI, SHARIF M. Cytokines in osteoarthritis: mediators or markers of joint destruction?. *Semin Arthritis Rheum*, 1996; 25: 254-72.
75. COMBE B. Inflammation and joint destruction during rheumatoid polyarthritis: What relation?. *Press Med*, 1998; 27: 481-3.
76. MATSUMOTO T, TSUKAZAKI T, ENOMOTO H, IWASAKI K, YAMASHITA S. Effects of interleukin-1  $\beta$  on insulin-growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Ann Rheum Dis*, 1994; 53: 128-33.
77. THUMB N. Function of cytokines in cartilage degradation. *Wien Med Wochenschr*, 1995; 145: 99-100.
78. XU C, OYAJOB I BO, FRAZER A, KOZACI LD, RUSSELL RG, HOLLANDER AP. Effects of growth factors and interleukin-1 $\alpha$  on proteoglycan and type II collagen turnover in bovine nasal and articular chondrocyte pellet cultures. *Endocrinology*, 1996; 137:3557-65.

- 79.** GUERNE PA, CARSON DA, LOTZ M. IL-6 production by human growth factors responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development. *Arthritis Reum*, 1995; 38: 960-0.
- 80.** JIKKO A, WAKISAKA T, IWAMOTO M, HIRANUMA H, KATO Y, MAEDA T, FUJISHITA M, FUCHIHATA H. Effects of interleukin-6 on proliferation and proteoglycan metabolism in articular chondrocyte cultures. *Cell Biol Int*, 1998; 22: 615-21.
- 81.** MITCHELL PG, CHEUNG HS. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and epidermal growth factor regulation of collagenase and stromelysin in adult porcine articular chondrocytes. *J Cell Physiol*, 1991; 149: 132-40.
- 82.** STAHL-BACKDAHL M, SANDSTET B, BRUCE K, LINDHAL A, JIMENEZ MG, VEGA JA, LÓPEZ-OTÍN C. Collagenase-III (MMP-13) is expressed during human fetal ossification and re-expressed in postnatal bone remodeling and in human rheumatoid arthritis. *Lab Invest*, 1997; 76: 717-28.
- 83.** BORDEN P, SOLYMAR D, SUCHARCZUK A, LINDMAN B, CANNON P, HELLER PA. Cytokine control of interstitial collagenase and collagenase-III gene expression in human chondrocytes. *J Biol Chem*, 1996; 271: 23577-81.
- 84.** SHLOPOV BV, GUMANOVSKA ML, HASTY KA. Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis Rheum*, 2000; 43: 195-205.
- 85.** SABATINI M, ROLLAND G, LEONCE S, THOMAS S, LESUR C, PEREZ U, DE NANTEUIL G, BONNET J. Effects of ceramide on apoptosis, proteoglycan degradation, and matrix metalloproteinase expression in rabbit articular cartilage. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000; 267: 438-44.
- 86.** VAN DEN BERG WB. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis: evidence of a dominant role for interleukin-1. *Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol*, 1997; 13: 577-97.

- 87.** KONTTINEN YT, AINOLA M, VALLEALA H, MA J, IDA H, MANDELIN J, KINNE RW, SANTAVIRTA S, SORSA T, LOPEZ-OTIN C, TAKAGI M. Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 a MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 1999; 58(1): 691-7.
- 88.** CAMPBELL IK, PICOLLI DS, BUTLER DM, SIGNLETON DK, HAMILTON JA. Recombinant human interleukin-1 stimulates human reticular cartilage to undergo resorption and humn chondrocytes to produce bot tissue- and urokinase type plasminogen activator. *Biochim Biophys Acta*, 1988; 987: 183-94.
- 89.** YAMADA H, STEPHENS RW, NAKAGAWA T, MCNICOL D. Human articular cartilage contains an inhibitor of plasminogen activator. *J Rheumatol*, 1988; 15: 1138-43.
- 90.** CAWSTON T. Matrix metalloproteinases and TIMPs: properties and implications for the rheumatic diseases. *Mol Med Today*, 1998; 4: 130-7.
- 91.** GOLDRING M.B. Molecular regulation of the chondrocyte phenotype. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2(6):517-520.
- 92.** RICHARD TULI, WAN-JU LI AND ROCKY S TUAN. Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003, 5:235-238.
- 93.** PRIDIE KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joint. *J Bone Joint Surg* 1959; 41B: 618-19.
- 94.** HANGODY L, KÁRPÁTI Z. A new surgical treatment of localized cartilaginous defect of the knee. *Hungarian J Orthop Trauma* 1994; 37:237-38.
- 95.** PETERSON L. Articular cartilage injuries treated with autologous chondrocyte transplantation in the human knee. *Acta Orthop Belg* 1996; 62: 196-200.

- 96.** BRITTBURG M, LINDAHL A, NILSSON A. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-895.
- 97.** MINAS T, NEHRER S. Current Concepts in the treatment of articular cartilage defects *Orthopedics*. 1996; 20: 525-538.
- 98.** KELLEY TF, SUTTON FM, WALLACE VP, WONG BJ. Chondrocyte repopulation of allograft cartilage: A preliminary investigation and strategy for developing cartilage matrices for reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2002; 127(4): 265-70.
- 99.** FRAGONAS E, VALENTE M, POZZI-MUCELLI M, TOFFANIN R, RIZZO R, SILVESTRI F, VITTUR F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials* 2000; 21(8): 795-801.
- 100.** SCHREIBER RE, IITEN-KIRBY BM, DUNKELMAN NS, SYMONS KT, REKETTIE LM, WILLOUGHBY J, RATCLIFFE A. Repair of osteochondral defects with allogeneic tissue engineered cartilage implants. *Clin Orthop* 1999; (367 Suppl): S382-95.
- 101.** RAHFOTH B, WEISSER J, STERNKOPT F, ALGNER T, VON DER MARK K, BRAUER R. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects of rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* 1998; 6(1): 50-65.
- 102.** YAO X, MA X, ZHANG Z. Chondrocytes allografts for repair of full-thickness defects in the condylar articular cartilage of rabbits. *Clin J Dent Res* 2000; 3(3): 24-30.
- 103.** PERAS C, SCHULTZ O, SITTINGER M, ZIPPEL H. Chondrocyte transplantation in PGLA/polydioxanone fleece. *Orthopede* 2000; 29(2): 112-0.
- 104.** NOGUCHI T, OKA M, FUJINO M, NEO M AND YAMAMURO T. Repair of osteochondral defects with graft of cultured chondrocytes. Comparison of allografts and isografts. *Clin Orthop* 1994;302:251-258.

- 105.** ELVES MW. Newer knowledge of the immunology of bone and cartilage. *Clin Orthop* 1979; 120: 232-49.
- 106.** LANGER F, GROSS AE, WEST M, UROVITZ EP. The immunogenicity of allograft knee joint transplants. *Clin Orthop* 1978; 132: 155-62.
- 107.** LANGER F, GROSS AE. Immunogenicity of allograft articular cartilage. *J Bone Joint Surg* 1974; 56A: 297-304.
- 108.** BRUCKNER P, HOERLER I, MENDLER M, HOUZE Y, WINTERHALTER KH, EICH-BENDER SG. Induction and prevention of chondrocyte hypertrophy in culture. *J Cell Biol* 1989; 109: 2537-45.
- 109.** HAUSELMANN HJ, FERNANDES RJ, MOK SS, SCHMID TM, BLOCK JA, AYDELOTTE MB. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994; 107: 17-27.
- 110.** CHUBINSKAYA S, HUCH K, SCHULZE M, OTTEN L, AYDELOTTE MB, COLE AA. Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 1211-20.
- 111.** KIMURA T, YASUI N, OHSAWA S, ONO K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop* 1984; 186:231-9.
- 112.** VACANTI C, LANGER R, SCHLOO B, VACANTI JP. Synthetic biodegradable polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation in vivo. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88: 753-9.
- 113.** FREED LE, MARQUIS JC, NOHRIA A, EMMANUAL J, MIKOS AG, LANGER R. Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 11-23.

- 114.** RUDERT M, WIRTH CJ, SCHULZE M, REISS G. Synthesis of articular cartilage-like tissue in vitro. *Arch Orthop Trauma Surg* 1998; 117: 141–6.
- 115.** SITTINGER M, REITZEL D, DAUNER M, HIERLEMANN H, KASTENBAURE E, HAMMER C. Resorbable polyesters in cartilage engineering: affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 1996; 33: 57–63.
- 116.** SITTINGER M, PERKA C, SCHULTZ O, HAUPL T, BURMESTER GR. Joint cartilage regeneration by tissue engineering. *Z Rheumatol* 1999; 58: 130–5.
- 117.** SOLCHAGA LA, DENNIS JE, GOLDBERG VM, CAPLAN AI. Hyaluronic acid-based polymers as cell carriers for tissue-engineered repair of bone and cartilage. *J Orthop Res* 1999; 17: 205–13.
- 118.** BUTNARIU-EPHRAT M, ROBINSON D, MENDES DG, HALPERIN N, NEVO Z. Resurfacing of goat articular cartilage by chondrocytes derived from bone marrow. *Clin Orthop* 1996; 330: 234–43.
- 119.** FORTIER LA, CABLE CS, NIXON AJ. Chondrocytic differentiation of mesenchymal cells in long-term three-dimensional fibrin cultures treated with IGF-1. *Trans Orthop Res Soc* 1996; 21: 110–5.
- 120.** VISNA P, PASA L, CIZMÁR I, HART R, HOCH J. Treatment of deep cartilage defects of the knee using autologous chondrograft transplantation and by abrasive techniques--a randomized controlled study. *Acta Chir Belg.* 2004 Nov-Dec;104(6):709-14.
- 121.** TOOLAN BC, FRENKEL SR, PEREIRA DS. Development of a novel osteochondral graft for cartilage repair. *J Biomed Mater Res* 1998; 41: 244-250.
- 122.** MARLOVITS S, ZELLER P, SINGER P, RESINGER C, VÉCSEI V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol* 2006; 57:24–31.

- 123.** CHRISTOPHER M R, KYRIACOS AA. Success Rates and Immunologic Responses of Autogenic, Allogenic, and Xenogenic Treatments to Repair Articular Cartilage Defects. *TISSUE ENGINEERING: Part B* Volume 15, Number 1, 2009
- 124.** ALMQVIST KF, DHOLLANDER A M, VERDONK CM, FORSYTH R, VERDONK R, VERBRUGGEN G. Treatment of Cartilage Defects in the Knee Using Alginate Beads Containing Human Mature Allogenic Chondrocytes. *Am J Sports Med* October 2009; vol. 37 no. 10 1920-1929
- 125.** ATALA A, KIM W, PAIGE KT, VACANTI CA, RETIK AB. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* 1994;152:641-3.
- 126.** BURWELL GR. Studies in the transplantation of bone, VII. The fresh composite homograft- autografts of cancellous bone: an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow containing bone grafts. *J Bone Joint Surg* 1964; 46A: 110-40.
- 127.** MIZUTANI A, FUJITA T, WATANABE S, SAKAKIDA K, OKADA Y. Experiments on antigenicity in allotransplanted cancellous bone. *Int Orthop* 1990; 14:243-8.
- 128.** GRIFFITH LG, NAUGHTON G. Tissue engineering—current challenges opportunities. *Science* 2002 Feb 8;295(5557):1009-14.
- 129.** ZAVAN B, CORTIVO R, VINDIGNI V, TONELLO C, ABATANGELO G. “Suitable scaffold for tissue engineering of cartilage” en *Basic Science, Clinical Repair and Reconstruction of Articular Cartilage DEfects: Current Status and Prospects*. S. Zanasi, M. Brittberg, M. Marcacci (Italy: Timeo 2006) Vol. I, p.395-399.
- 130.** HUANG Q, GOH JC, HUTMACHER DW, LEE EH. In vivo mesenchymal cell recruitment by a scaffold loaded with transforming growth factor beta1 and the potencial for in situ chondrogenesis. *Tissue Eng* 2002;8: 469-82.
- 131.** CATERSON EJ, NESTI LJ, LI WJ, DANIELSON KG, ALBERT JJ, VACARO AR. Three-dimensional cartilage formation by bone marrow-derived cells seeded in polylactide/ alginate amalgam. *J Biomed Mater Res* 2001;57: 394-403.

- 132.** GOBBI, A., KON, E., BERRUTO, M., FRANCISCO, R., FILARDO, G., AND MARCACCI, M. Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with Hyalograft-C: a clinical, arthroscopic, and histologic review. *Am J Sports Med* 34, 1763, 2006.
- 133.** MARCACCI, M., BERRUTO, M., BROCCETTA, D., DELCOGLIANO, A., GHINELLI, D., GOBBI, A., KON, E., PEDERZINI, L., ROSA, D., SACCHETTI, G.L., STEFANI, G., AND ZANASI, S. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 96, 435, 2005.
- 134.** FREED LE, GRANDE DA, LINGBIN Z, EMMANUAL J, MARQUIS JC, LANGER R. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 1994 Aug;28(8):891-9.
- 135.** FREED LE, VUNJAK-NOVAKOVIC G, BRION RJ, EAGLES DB, LESNOY DC, BARLOW SK, LANGER R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology(NY).* 1994 Jul;12(7):689-93.
- 136.** MARCACCI M, KON E, ZAFFAGNINI S. Arthroscopic second generation autologous chondrocyte implantation. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15:610–9.
- 137.** OSSENDORF C, KAPS C, KREUZ PC, BURMESTER GR, SITTINGER M, ERGGELET C. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthritis Res Therapy* 2007;9:R41.
- 138.** NEHRER S, DOMAYER S, DOROTKA R, SCHATZ K, BINDREITER U, KOTZ R. Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *Eur J Radiol* 2006;57:3–8.
- 139.** MANFREDINI M, ZERBINATI F, GILDONEA, FACCINI R. Autologous chondrocyteimplantation: a comparison between an open periosteal-covered and an arthroscopic matrix-guided technique. *Acta Orthop Belg* 2007;73:207 18.
- 140.** GOBBI A, KON E, BERRUTO M, FRANCISCO R, FILARDO G, MARCACCI M. Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with Hyalograft-C: a clinical, arthroscopic, and histologic review. *Am J Sports Med* 2006;34:1763–73.
- 141.** BEHRENS P, BITTER T, KURZ B, RUSSLIES M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MATC/MACI)-5-year follow-up. *Knee* 2006;13:194–202.

- 142.** TREPPO S, KOEPP H, QUAN EC, COLE AA, KUETTNER KE, GRODZINSKY AJ. Comparison of biomechanical and biochemical properties of cartilage from human knee and ankle pairs. *J Orthop Res* 2000;18:739–48.
- 143.** VERBRUGGEN G, CORNELISSEN M, ALMQVIST KF. Influence of aging on the synthesis and morphology of the aggrecans synthesized by differentiated human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2000;8:170–9.
- 144.** SARIS DBF, VANLAUWE J, VICTOR J. Characterized chondrocyte implantation results in better structural repair when treating symptomatic cartilage defects of the knee in a randomized controlled trial versus microfracture. *Am J Sports Med* 2008;36:235–46.
- 145.** GENES NG, ROWLEY JA, MOONEY DJ, BONASSAR LJ. Effect of substrate mechanics on chondrocyte adhesion to modified alginate surfaces. *Arch Biochem Biophys* 2004;422:161–7.
- 146.** ROWLEY JA, MADLAMBAYAN G, MOONEY DJ. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999;20:45–53.

## **APÉNDICE A**

### **A.1 Técnica histológica.**

- 1.- Obtener la muestra.
- 2.- Fijar con formalina al 10 % en PBS pH 7.2-7.4 por 24 hrs.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Deshidratar en alcoholes graduales del 60 al 100 %.
- 5.- Aclarar con xilol.
- 6.- Preincluir en parafina.
- 7.- Incluir en parafina.
- 8.- Obtener los cortes histológicos usando un microtomo.
- 9.- Adherir los cortes en el baño de flotación.
- 10.- Desparafinar e hidratar.
- 11.- Teñir.
- 12.- Deshidratar y aclarar.
- 13.- Montar el cubre objetos añadiendo resina sintética.

### **A.2 Técnica de tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E).**

- 1.- Desparafinar los cortes con xilol por 5 min.
- 2.- Hidratar con etanol-xilol por 5 min.
- 3.- Hidratar con etanol absoluto y alcohol etílico 96° por 2 min c/u.
- 4.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 5.- Sumergir los cortes en hematoxilina de Gill, 2 min.
- 6.- Enjuagar lentamente en agua de la llave (2 lavados).
- 7.- Sumergir rápidamente en alcohol ácido (1 inmersión).
- 8.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 9.- Sumergir rápidamente en agua amoniacal (2 inmersiones).
- 10.- Enjuagar lentamente con agua de la llave (2 lavados).
- 11.- Enjuagar lentamente con agua destilada.
- 12.- Sumergir los cortes en eosina (6 inmersiones).
- 13.- Deshidratar con alcohol etílico 96° (2 cambios) 2 min c/u.
- 14.- Sumergir en etanol absoluto (2 cambios) 2 min c/u.
- 15.- Sumergir en etanol-xilol 3 min.
- 16.- Sumergir en xilol (2 cambios) 2 min c/u.
- 17.- Montar con resina sintética.

### **A.3 Técnica de tinción con el método tricrómico de Massón.**

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %

Incluir en parafina

Usar cortes histológicos de 5 µm.

- 1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100 % y agua destilada.
- 2.- Usar como “mordente” el fijador de Bouin por 30-60 min a 56 °C, o toda la noche a temperatura ambiente.
- 3.- Lavar en agua corriente hasta que el color amarillo desaparezca.
- 4.- Enjuagar los cortes en agua destilada.
- 5.- Pasar los cortes a la hematoxilina férrica de Weigert durante 10 min.
- 6.- Lavar en agua corriente, 5 min o hacer 3 cambios de 15 seg.
- 7.- Enjuagar en agua destilada.
- 8.- Teñir con la solución de fucsina-escarlata por 5 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso o de preparación del colorante).
- 9.- Lavar varias veces en agua destilada hasta que ésta deje de teñirse.
- 10.- Pasar los cortes a la solución de ácidos fosfomolibdico-fosfotúngstico durante 10 min. Enjuagar brevemente con agua destilada.
- 11.- Teñir con la solución de azul de anilina durante 15 seg (el tiempo depende de la calidad y/o concentración y tiempo de uso del reactivo).
- 12.- Lavar con agua destilada hasta eliminar el exceso del colorante.
- 13.- Pasar al ácido acético por 1-2 min.
- 14.- Deshidratar en alcohol de 96° por unos seg (cuidar que no se decolore).
- 15.- Continuar con el alcohol absoluto hasta acarar en xilol y montar en resina.

### **A.4 Método inmunohistoquímico para la identificación de colágena tipo I y tipo II.**

Fijar los tejidos con solución de formalina al 10 % en PBS pH 7.2-7.4 por 24 hrs

Procesar por la técnica histológica e Incluir en parafina

Usar cortes histológicos de 4 µm.

- 1.- Desparafinar e hidratar los cortes en las siguientes soluciones:
  - Xilol (2 cambios) 5 min.
  - Etanol absoluto 3 min.

- Etanol 95 % 3 min.
- Etanol 70 % 3 min.
- Agua destilada 3 min.
- Solución Tris-buffer salino (TBS) 3 min.

- 2.- Exponer los antígenos con solución (TRS) 40 min. a 100 °C.
- 3.- Bloquear la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % 10 min.
- 4.- Lavar en solución buffer TBS 3-5 min.
- 5.- Bloquear las proteínas 30 min.
- 6.- Lavar en solución buffer TBS 3-5 min.
- 7.- Añadir el anticuerpo primario Toda la noche 4 °C.
- 8.- Lavar en TBS 3-5 min.
- 9.- Añadir el anticuerpo secundario 15 min.
- 10.- Lavar en TBS 3-5 min.
- 11.- Añadir la solución de estreptavidina-HRP 15 min.
- 12.- Lavar en TBS 3-5 min.
- 13.- Revelar con solución de sustrato-cromógeno 10 min.

### **CONTRATINCIÓN:**

- 1.- Lavar en agua destilada por 2 min (3 veces).
- 2.- Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 min.
- 3.- Lavar en agua corriente.
- 4.- Enjuagar en agua destilada.
- 5 Deshidratar gradualmente con:
  - Etanol 70 %, 2 cambios.
  - Etanol 95 %, 2 cambios.
  - Etanol 100 %, 2 cambios.
  - Xilol 2 cambios.
- 4.- Limpiar el exceso de xilol
- 5.- Montar con resina y almacenar los cortes en oscuridad.

### **Solución enjuagadura sulfurosa**

Agua	300 mL
Ac. Clorhídrico 1 N	15 mL
Metabisulfito de Sodio 10 %	18 mL

### **Solución metabisulfito de sodio 10 %**

Metabisulfito de Sodio 10 %	10 g
Agua	100 mL

## APÉNDICE B

### SOLUCIONES:

#### B.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

##### **B.1.1 Solución de formalina 10 %**

* Para preparar 500 mL	
Formalina 37 %	136 mL
PBS 1X	364 mL

##### **B.1.2. PBS 10 X**

* Para preparar 100 mL	
NaCl	8.0 g
KCl	0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g

Ajustar pH a 7.2  
Almacenar a 4 °C.

##### **B.1.3. PBS 1X**

* Para preparar 500 mL	
PBS 10X	50 mL
Agua destilada	450 mL
Ajustar pH a 7.2	
Almacenar a 4 °C.	

##### **B.1.4. Hematoxilina de Gill.**

Agua destilada	730 mL
Etilenglicol	250 mL
Hematoxilina anhidra (polvo)	2.0 g
* Si está en cristales pesar	2.36 g
Yodato de sodio	0.2 g

Sulfato de aluminio	17.6 g
Ácido acético glacial	2.0 mL

\* Para preparar se debe seguir el orden, agitar a TA por 1 hora, filtrar antes de usar por primera vez.

### **B.1.5. Eosina.**

#### Solución stock (concentrada):

Eosina amarillenta	1.0 g
Agua destilada	20 mL
Alcohol del 96°	80 mL

#### Solución de trabajo:

Tomar una parte de la solución stock y agregar en tres partes de alcohol de 80 °C. Antes de usar agregar 0.5 mL de ácido acético glacial, por cada 100 mL de colorante preparado y agitar.

### **B.1.6. Solución de alcohol-ácido.**

Alcohol de 70°	99 mL
Ácido Clorhídrico (HCl)	1 mL

### **B.1.7. Solución de agua Amoniacal.**

Agua destilada	99 mL
Hidróxido de Amonio	1 mL

### **B.1.8. Hematoxilina férrica de Weigert**

#### Solución A

Hematoxilina (anhidra)	1 g
Alcohol de 96°	100 mL

#### Solución B

Cloruro férrico acuoso al 29 %	4 mL
Agua destilada	95 mL
Ácido clorhídrico conc.	1 mL

#### Solución de trabajo:

Mezclar partes iguales de las soluciones A y B. (Debe renovarse periódicamente dependiendo del uso y consistencia, precipita con el tiempo).

#### Solución de Cloruro Férrico 29%

Cloruro férrico	14.5 g
-----------------	--------

Agua destilada	50 mL
----------------	-------

**B.1.9. Solución de fucsina ácida y escarlata de Biebrich.**

Escarlata de Biebrich al 1 %	90 mL
Fucsina ácida al 1 %	10 mL
Ácido acético glacial	1 mL

**\* Solución de escarlata de Biebrich**

Escarlata de Biebrich	1 g
Agua destilada	100 mL

**\* Solución de fucsina ácida**

Fucsina ácida	1 g
Agua destilada	100 mL

**B.1.10. Solución de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico.**

Ácido Fosfomolibdico	5 g
Ácido Fosfotúngstico.	5 g
Agua destilada	200 mL

**B.1.11 Solución de azul de anilina.**

Azul de anilina	2.5 g
Agua destilada	100 mL
Ácido acético glacial	2 mL

**B.1.12 Solución acuosa de ácido acético al 1%.**

Ácido acético glacial	1 mL
Agua destilada	99 mL

**B.1.13 Solución fijadora de Bouin**

Solución acuosa saturada de ácido pícrico	75 mL
Formaldehído (36-38 %)	25 mL
Ácido acético glacial	5 mL

**B.1.14 Solución enjuagadura sulfurosa**

Agua	300 mL
Ac. Clorhídrico 1 N	15 mL
Metabisulfito de Sodio 10 %	18 mL

**B.1.15 Solución metabisulfito de sodio 10 %**

Metabisulfito de Sodio 10 %	10 g
Agua	100 mL

## **B.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.**

Se utilizó el sistema LSAB+System-HRP usando el kit anti mouse and rabbit HRP/DAB (ab64264) de Abcam<sup>®</sup>, los núcleos se contrastaron con hematoxilina.

### **Técnica histoquímica para la demostración de polisacáridos complejos con Ácido Peryódico de Schiff (PAS) + diastasa.**

Fijar los tejidos con solución de formalina al 4 %

Incluir en parafina

Usar cortes histológicos de 5 µm.

1.- Desparafinar con xilol e hidratar pasando por alcohol 100 y agua destilada.

\* Si se desea remover depósitos de glucógeno, incubar los cortes con diastasa por 30 min. a 37 °C.

- Enjuagar en agua destilada 3 veces.

2.- Sumergir los cortes en la solución del ácido peryódico de 5 a 10 min.

3.- Enjuagar en agua destilada varias veces.

4.- Sumergir los cortes en el reactivo de Schiff por 20 min, revisar el color rosa pálido.

5.- Diferenciar los cortes en la solución enjuagadura sulfurosa, 2 cambios 2 min c/u.

6.- Enjuagar en agua destilada.

7.- Contrastar con hematoxilina de Harris o de Gill por 1 a 2 min.

8.- Lavar en agua corriente.

9.- Decolorar ligeramente en alcohol ácido y lavar en agua corriente.

10.- Virar con agua amoniacal, lavar en agua corriente y enjuagar en agua destilada.

11.- Deshidratar en alcoholes graduales hasta alcohol absoluto.

12.- Aclarar en xilol y montar en resina.