

34



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

U. N. A. M.

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN

**“AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO
TRIDIMENSIONAL DE CONDROCITOS DE RATA
WISTAR ADULTA COMO MODELO EN EL ESTUDIO
DE LA OSTEOARTROSIS EXPERIMENTAL”**

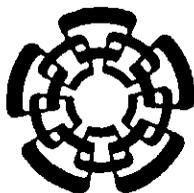
Trabajo de
Investigación Profesional

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A:
GUADALUPE MIRIAM HUERTA PEREZ

284244

ASESORES: DR. JUAN B. KOURI FLORES
DR. LUIS FELIPE JIMENEZ GARCIA



CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Aislamiento y mantenimiento tridimensional de condrocitos
de rata Wistar adulta como modelo en el estudio de la
osteoartrosis experimental.

que presenta la pasante: Guadalupe Miriam Huerta Pérez.
con número de cuenta: 9452155-3 para obtener el TITULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 12 de Junio de 2000

PRESIDENTE	<u>Dr. Luis Felipe Jiménez García</u>	
VOCAL	<u>Dr. Marco A. Vega López</u>	
SECRETARIO	<u>Q.B.P. Judith Martínez Zamitiz</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Dr. Andres Romero Rojas</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M.en C. A. Natahliel Soto Guevara</u>	

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Patología Osteoarticular del Departamento de Patología Experimental del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la asesoría del Dr. Juan B. Kouri Flores y la coasesoría del Dr. Luis Felipe Jiménez de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Para cada cosa hay un momento, y un tiempo

para cada propósito bajo los cielos:

Un tiempo para nacer y un tiempo para morir;

Un tiempo para plantar y otro para cosechar aquello que se plantó;

Un tiempo para matar y un tiempo para sanar;

Un tiempo para destruir y otro para construir.

Eclesiastés 3:1-3

ÍNDICE

Agradecimientos y Dedicatorias.....	I
Abreviaturas	IV
Índice de figuras.....	VI
Índice de tablas	VII
1. Resumen	1
2. Introducción	3
3. Marco teórico	
3.1.Características del cartilago articular hialino	
Localización.....	5
Clasificación.....	5
Composición.....	6
Estructura.....	17
Nutrición.....	19
Función.....	19
3.2.Cultivo de condrocitos	19
3.3. Geles de alginato	22
4. Objetivos	23
5. Hipótesis	23
6. Diseño experimental	24

7. Materiales y Métodos	
7.1. Aislamiento y encapsulación de condrocitos	
Obtención del explante	25
Digestión del explante	26
Formación de las perlas de alginato.....	27
7.2. Determinación de la viabilidad	28
7.3. Morfología del condrocito	28
Microscopía óptica	29
Microscopía electrónica de transmisión	29
7.4. Detección de colágena tipo II	30
8. Resultados	
8.1. Obtención del explante	32
8.2. Digestión del explante	32
8.3. Cinética de viabilidad	32
8.4. Microscopía óptica	34
8.5. Microscopía electrónica de transmisión	37
8.6. Detección de colágena tipo II	41
9. Discusión.....	45
10. Conclusiones.....	51
11. Referencias.....	52
12. Apéndice	
Preparación de reactivos.....	60

AGRADECIMIENTOS

Cuando se juntan el conocimiento, el talento y la calidad humana dan origen a ideas y resultados tan interesantes como este trabajo, por eso quiero agradecer al Dr. Juan B. Kourí Flores por brindarme la oportunidad de aprender a hacer ciencia y al Dr. Luis Felipe Jiménez García por los consejos y guía proporcionada.

En mi paso por la FES-Cuautitlán aprendí muchas cosas que he puesto en práctica y que han dado como resultado la elaboración de esta tesis, pero esto no se dio solo sino que siempre estuvieron presentes mis profesores y amigos a los cuales sólo les puedo decir GRACIAS.

La crítica constructiva y los consejos siempre hacen que uno mejore, por ello quiero externar mi agradecimiento a mis sinodales Dr. Marco A. Vega, Q.B.P. Judith Martínez Z., Dr. Andrés Romero R. y al M en C Natahriel Soto G. por ayudarme a enriquecer este trabajo.

Gracias a la M. en C. Karim Abbud L. por la ayuda y la asesoría proporcionada durante la realización de este trabajo.

En mi estancia en el CINVESTAV conocí a la O. Alicia Ramírez R., Q.B.P. Ma. Elena Montero de la Vega, M en C Alejandro Palma, Miguel, América, Benjamín, Ana, Tere, Karina y a Sandra quienes siempre estuvieron en la mejor disposición

de ayudarme y de transmitirme sus conocimientos de forma incondicional, pero sobre todo me ofrecieron una amistad sincera, la cual es correspondida.

A la Biol. Lourdes Rojas, Q.F.B. Sirenia González y al técnico Héctor Vargas de la Unidad de Microscopía del Depto. de Biología Celular del CINVESTAV por sus consejos y su valiosa ayuda en la realización de este trabajo.

En la vida hay cosas que no es posible darles un valor monetario pero sin embargo de alguna forma hay que reconocerlas por eso quiero manifestar mi gratitud a la familia Aviña Velázquez por el apoyo y la amistad que siempre me han brindado.

A todos ustedes

¡MIL GRACIAS!

DEDICATORIAS

Con dedicatoria especial a Dios que me ha permitido conocer parte de su mundo y me ha guiado a través de él.

Este trabajo está dedicado a mis padres, Raúl y Vicky, y mis hermanos, Raúl, Blanca y Gustavo, cuyas acciones desinteresadas realizadas durante mucho tiempo hoy dan frutos y aunque no hay modo de pagarlo, ojalá que esto pueda cubrir un poco la deuda.

Gracias por ser mi fuerza.

Abuefitos reciban este trabajo como recompensa al amor y a la fe que depositaron en mí.

Con cariño para mis tíos, tías, primos y primas que han estado a mi lado en todos los momentos de mi vida.



ABREVIATURAS

°C	Grado centigrado
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CO ₂	Bióxido de carbono
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient mixture F-12 (Ham) 1:1
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FBS	Suero fetal bovino
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gramo
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid
KCl	Cloruro de potasio
M	Molar
mL	Mililitro
mm	Milimetro
mM	Milimolar
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
Na ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de sodio

NaCl	Cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
OsO ₄	Tetraóxido de osmio
PBS	Búfer salino de fosfatos
RHT	Ruthenium hexamine trichloride
SSFE	Solución salina fisiológica estéril
rpm	Revoluciones por minuto
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

NaCl	Cloruro de sodio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato monobásico de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
OsO ₄	Tetraóxido de osmio
PBS	Búfer salino de fosfatos
RHT	Ruthenium hexamine trichloride
SSFE	Solución salina fisiológica estéril
rpm	Revoluciones por minuto
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del cartílago articular hialino en las articulaciones diartrodias.	6
Figura 2. Estructura de los proteoglicanos.	7
Figura 3. Síntesis y estructura de las fibras de colágena.	10
Figura 4. Microfotografías de los diferentes tipos de condrocitos.	16
Figura 5. Estructura del cartílago articular hialino.	18
Figura 6. Gráfica de la cinética de viabilidad de los condrocitos mantenidos en geles de alginato.	33
Figura 7. Fotografía de los condrocitos después de ser digerida enzimáticamente la matriz extracelular.	35
Figura 8. Fotografías de los condrocitos dentro de las perlas de alginato a los 1, 8, 14, 21, 57 y 100 días de incubación.	36
Figura 9. Microfotografías de condrocitos mantenidos en perlas de alginato durante 1, 8, 14, 21, 57 y 100 días.	39
Figura 10. Microfotografías de estructuras tipo colágena producidas por los condrocitos y de algunos gránulos presentes en ellos.	40
Figura 11. Inmunofluorescencia para detectar colágena tipo II en cartílago articular hialino de rata (control positivo).	42
Figura 12. Localización de colágena tipo II en las perlas de alginato.	43

Figura 13. Presencia de acúmulos y una malla de colágena tipo II producida por los condrocitos conservados en el gel de alginato. 44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características diferenciales de los glucosaminoglicanos.	11
Tabla 2. Algunos tipos de colágena y sus propiedades.	8

1. RESUMEN

Se mantuvieron condrocitos de rata Wistar de tres meses de edad en un sistema tridimensional empleando geles de alginato. Las células fueron obtenidas por medio de la digestión enzimática con tripsina y colagenasa del cartílago articular hialino del plato tibial, cóndilo y cabeza femoral. Posteriormente los condrocitos fueron atrapados en el gel de alginato al 1.2%, el cual gelificó en forma de perlas, en una solución de CaCl_2 102 mM.

Las perlas se mantuvieron en medio DMEM/F12 suplementado con FBS 10%, ácido ascórbico 25 $\mu\text{g/mL}$, gentamicina 50 $\mu\text{g/mL}$ y anfotericina B 1 $\mu\text{g/mL}$; se determinó el número de células viables, se observó la morfología celular y ultraestructural por medio de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión. Se detectó colágena tipo II (marcador fenotípico del condrocito) a través de inmunofluorescencia.

Antes de 28 días los condrocitos se mantuvieron viables hasta un 70%. El estudio de la morfología celular y ultraestructural de los condrocitos en cultivo antes de 14 días mostró células de forma redondeada, núcleo prominente, cromatina dispersa, un retículo endoplásmico abundante así como un gran número de mitocondrias. También se observaron algunas estructuras tipo colágena en la periferia celular. Lo anterior se confirmó al detectar colágena tipo II en ésta zona. A los 21 días los condrocitos comenzaron a mostrar signos de degeneración. Los resultados sugieren que el mantenimiento de condrocitos de rata adulta en perlas de alginato

se haga antes de 15 días para asegurar el fenotipo, viabilidad y actividad metabólica de los mismos.

2. INTRODUCCIÓN

La Osteoartritis (OA) es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por la degeneración del cartilago articular hialino de las articulaciones quedando expuesto el hueso contra el hueso lo que provoca un dolor intenso.

Esta enfermedad sobreviene con el envejecimiento aunque en los últimos años su incidencia ha aumentado en jóvenes deportistas (con un promedio de 27.4 años) que realizan ejercicios fuertes que sobrecargan sus articulaciones; según publicaciones internacionales especializadas en el tema (Abyad and Boyer, 1992; Levy et al., 1993; Ershova et al., 1992).

Las lesiones se presentan principalmente en rodillas, cadera, y hombros; aunque pueden presentarse en codos, manos, pies y tobillos; incluso en la mandíbula.

En México, la OA es la cuarta causa de visita médica dentro del área de Reumatología del IMSS, aunque se sabe que la enfermedad es más frecuente en personas de 65 años o más.

De acuerdo con el INEGI para el año 2000 el promedio de vida será de 74.4 años y para el 2030 de 79.2 años. Lo que significa que la población de la tercera edad aumentaría 4.7 % en el 2000; 6% en el 2010 y a 11.9% en el 2030. Esto justifica la prioridad que se le esta dando en las instituciones de salud a este tipo de enfermedades, que tienen un gran significado económico y social.

Dadas estas circunstancias, múltiples grupos de investigadores realizan trabajos con la finalidad de elucidar el mecanismo fisiopatológico de la enfermedad. Para

ello han establecido modelos animales y cultivos celulares. En este último aspecto se han realizado diversos ensayos encontrándose que el cultivo de condrocitos inmersos en geles de alginato presenta múltiples ventajas, entre ellas la de conservar el fenotipo celular y hacer más fácil la recuperación de las células cultivadas ya que el gel puede ser solubilizado por la adición de un agente quelante.

El tener un modelo *in vitro*, como el cultivo de condrocitos en perlas de alginato permite el estudio de la síntesis y degradación de la matriz extracelular, además que en él se pueden ensayar estrategias terapéuticas.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. CARACTERÍSTICAS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR HIALINO

El cartilago es un tipo de tejido conectivo, con las siguientes características.

LOCALIZACIÓN

Se ubica en dos regiones: las extraesqueléticas, como los anillos de la pared de la tráquea, los tubos aéreos de mayor calibre que comunican a los pulmones, laringe, nariz, entre otros sitios. La otra región donde se encuentra es en la superficie de las articulaciones móviles de los huesos (Ham y Cormack, 1984).

CLASIFICACIÓN

Existen tres tipos de cartilago:

- a) Hialino, es un tejido liso y brillante, que puede verse de color azul nacarado en animales inmaduros, de color blanco denso en adultos y ligeramente amarillento en los ancianos; dicho tejido se encuentra en la superficie y en el plato de crecimiento del hueso (Fig. 1).
- b) Elástico, este tipo de cartilago presenta una gran flexibilidad debido a la presencia de elastina; este tejido lo podemos encontrar en la oreja.
- c) Fibrocartilago, posee una gran cantidad de colágena y forma parte de los tendones y discos intervertebrales (Ham y Cormack, 1984).

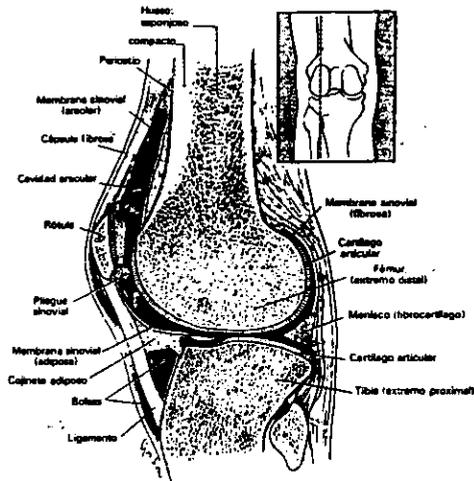


Figura 1. Localización del cartilago articular hialino en la articulación de la rodilla humana seccionada en el plano sagital que se indica en el recuadro (Cormack, 1988).

COMPOSICIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR HIALINO

El cartilago está constituido por:

a) Agua. El cartilago es un tejido hiperhidratado (60-80% del peso total), su contenido varía en cada sitio del cartilago y su presencia se debe a que forma un gel cuando se une a los proteoglicanos o a la colágena.

b) Una matriz extracelular compuesta por:

♣ Proteoglicanos constituidos por aproximadamente 100 monómeros de agregan, cada uno de ellos esta formado por una proteína central a la cual se le unen

covalentemente cadenas de glucosaminoglicanos (Tabla 1). Estos monómeros se enlazan a una cadena de ácido hialurónico a través de dos proteínas, como se muestra en la figura 2. Los principales proteoglicanos del cartilago (5-10% del tejido seco), son los que contienen condroitínsulfato-4 y queratínsulfato. Estas moléculas se localizan en el espacio interfibrilar de la matriz del cartilago proporcionando al tejido resistencia a la compresión y elasticidad (Heinegard y Oldberg, 1989).

Además los proteoglicanos ayudan a proveer de agua para la lubricación de la superficie, mantener la posición espacial de las fibras proteicas, influenciar la formación de fibras y posiblemente previenen la calcificación; además determinan la permeabilidad de la matriz (Alberts *et al.*, 1994).

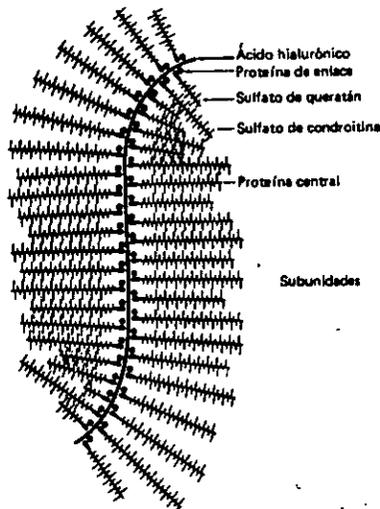


Figura 2. Representación esquemática de un agregado de agregcan (Murray *et al.*, 1994).

Tabla 1. Características diferenciales de los glucosaminoglicanos

Glucosaminoglicano	Composición	Sulfatos por unidad de disacárido	Otros residuos de azúcar
Ácido hialurónico	Ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina	0	-----
Condroitinsulfato	Ácido D-glucurónico y N-acetil-D-galactosamina	0.2-2.3	D-galactosa y D-xilosa
Dermatánsulfato	Ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina	1.0-2.0	D-galactosa y D-xilosa
Heparansulfato	Ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico y N-acetil-D-glucosamina	0.2-2.0	D-galactosa y D-xilosa
Heparina	Ácido D-glucurónico o ácido L-idurónico y N-acetil-D-glucosamina	2.0-3.0	D-galactosa y D-xilosa
Keratansulfato	D-galactosa y N-acetil-D-glucosamina	0.9-1.8	D-galactosamina, D-manosa, L-fucosa y ácido siálico

Alberts *et al.*, 1989.

♣ Colágena. Las fibras de colágena son polímeros contruidos por monómeros. Cada monómero esta formado por 3 cadenas largas y helicoidales -también llamadas cadenas α - que se unen por puentes de hidrógeno. El trímero se enrolla sobre sí mismo teniendo 2900Å de largo y 17Å de diámetro. Cada cadena tiene aproximadamente 1050 aminoácidos, su síntesis se muestra en la figura 3. La colágena es rica en prolina y glicina; ambos aminoácidos son importantes en la formación de la triple hélice. Cada tercer aminoácido es una glicina lo que le

facilita adquirir la estructura de triple hélice. Además, posee un gran número de residuos de lisina hidroxilados que le ayudan a mantener los puentes de hidrógeno entre las cadenas (Karp, 1984). La prolina, debido a los anillos de pirrolidona que posee, estabiliza la formación helicoidal en cada cadena α (Alberts *et al.*, 1994). Posteriormente se lleva a cabo una unión covalente lateral de las colágenas y se forman fibrillas y su agregación en forma escalonada constituyen una fibra de colágena (Fig. 3) de aproximadamente 64-70 nm, creando un patrón periódico en su estructura (Darnell *et al.*, 1986). Se han encontrado aproximadamente 15 tipos de moléculas de colágena, las principales están en tejido conectivo y son los tipos I, II, III, V y XI. En la tabla 2 se mencionan algunas características de los diferentes tipos de colágena (Alberts *et al.*, 1994).

La colágena constituye aproximadamente el 50% del peso seco del cartilago, existen varios tipos: II, VI, IX, XI y X, en diferentes concentraciones.

La colágena tipo II constituye el 95% de la colágena presente en el cartilago, es poco soluble, delgada, forma haces de fibras, su distribución es al azar aunque se encuentra en mayor proporción en la zona media del cartilago; la función de la colágena tipo II es la de dar forma, tensión, resistencia y fuerza al cartilago. La colágena tipo XI forma fibrillas con la tipo II; la colágena tipo VI es de cadena corta y se ubica en la matriz pericelular; la colágena tipo IX es de cadena corta y estabiliza las mallas formadas por la tipo II; y la colágena tipo X se ubica en la

zona profunda del cartilago. La colágena está organizada en haces de fibras insolubles de alta fuerza de tensión, la cual ayuda a contener a los proteoglicanos que son solubles y deformables dando al tejido la capacidad de presentar una deformación reversible (Sah *et al.*, 1992)

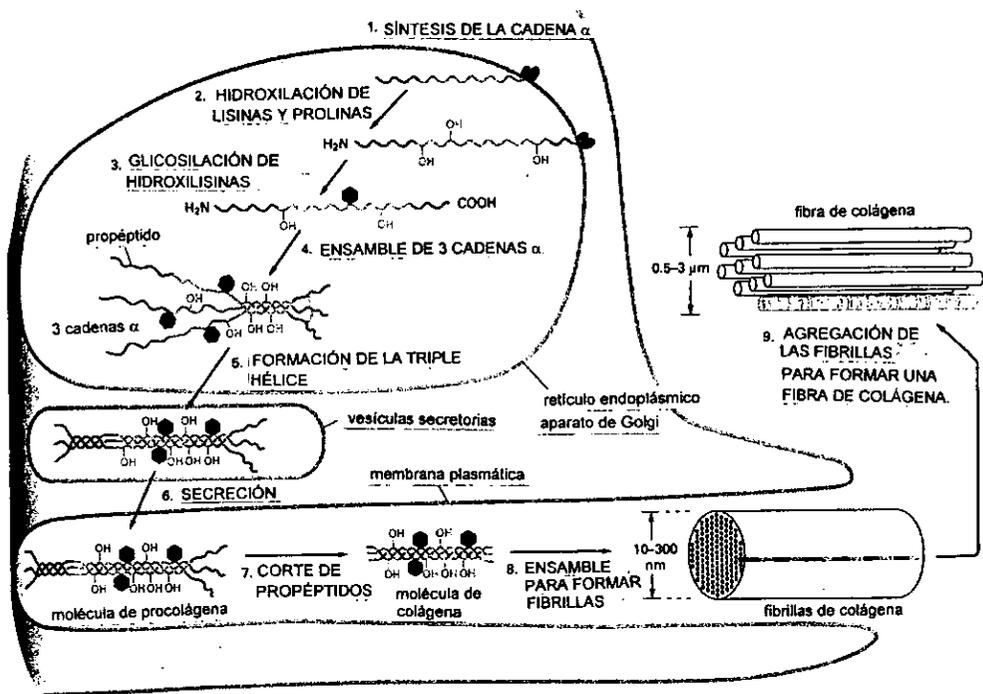


Figura 3. Formación de fibras de colágeno. El proceso inicia en los compartimentos rodeados por membranas (retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y vesículas) y termina en el espacio extracelular (Alberts *et al.*, 1994)

Tabla 2. Algunos tipos de colágena y sus propiedades.

	Tipo	Fórmula molecular	Forma polimerizada	Distribución
Formas fibrilares	I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	Fibrillas	Hueso, piel, tendón, ligamentos, córnea, órganos internos
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibrillas	Cartilago, discos intervertebrales, humor vitreo
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrillas	Piel, órganos internos, vasos sanguíneos
	V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$	Fibrillas con tipo I	Hueso, piel, tendón, ligamentos, córnea, órganos internos
	XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	Fibrillas con tipo II	Cartilago, discos intervertebrales, humor vitreo
Asociados a fibrillas	IX	$\alpha 1(IX)\alpha 2(IX)\alpha 3(IX)$ con fibrillas tipo II	Asociación lateral	Cartilago
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$ con algunas fibrillas tipo I	Asociación lateral	Tendón, ligamentos y otros tejidos
Formando mallas	IV	$[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$	Malla tipo laminar	Lámina basal
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Fibrillas de anclaje	Epitelio escamoso estratificado inferior

Alberts et al., 1994.

♣ Tenascina. Es otra proteína de matriz importante en la interacción inductiva de células mesenquimales. Contiene 6 cadenas idénticas de peso molecular alrededor de 210,000 daltones, se encuentra presente en el mesenquima embrionario que rodea al epitelio en órganos en los cuales el mesenquima es esencial para el desarrollo epitelial. Participa en la inducción de la diferenciación del epitelio (Darnell, 1986).

♣ Fibromodulina. Es una proteína aniónica que posee pequeñas cadenas de condroitín/dermatansulfato, parece estar asociada con las fibrillas de colágena y puede influenciar la fibrilógenesis de la colágena *in vitro* (Heinegard y Oldberg, 1989).

♣ Fibronectina (condronectina). Es una de las principales glicoproteínas es la fibronectina, la cual es un dímero de dos subunidades similares unidas por puentes disulfuro cerca de la región carboxilo terminal y esta doblada hacia una serie de dominios globulares separados por regiones flexibles de la cadena polipeptídica. La fibronectina es una molécula multifuncional en la cual los dominios globulares juegan diferentes papeles. Por ejemplo, un dominio se une a colágena, otro a heparina y otro más a receptores específicos de superficie.

Se ha encontrado que la secuencia peptídica Arg-Gli-Asp o RGD es la porción encargada de llevar a cabo la actividad de unión celular. La secuencia RGD es común en varias proteínas de adhesión extracelular y es reconocida por una familia de receptores homólogos llamados integrinas. Se encuentra en bajas

concentraciones en el cartilago articular normal, y es sintetizada por el condrocito (Darnell et al., 1986; Karp, 1984; Alberts et al., 1989).

♣ Proteínas de enlace. Son pequeñas glicoproteínas que estabilizan agregados, favorecen la agregación, controlan el espacio entre ellas así como su tamaño (Buckwalter et al., 1998).

♣ Las anexinas son una familia de proteínas relacionadas estructuralmente que muestran una unión a fosfolípidos dependiente de calcio. Son expresadas en todas las células de mamíferos excepto en las células rojas de la sangre. Son proteínas intracelulares abundantes y componen más del 2% del total de proteínas celulares. Han sido implicadas en múltiples aspectos de la biología celular incluyendo la regulación del tránsito de la membrana, actividad de transporte de los canales de calcio, inhibición de la fosfolipasa A₂, inhibición de la coagulación, transducción de señales mitogénicas y el establecimiento de interacciones célula-matriz (Raynal y Pollard, 1994).

♣ Algunos lípidos se encuentran en las células y en la matriz, su función no es conocida y las cantidades presentes varían con la edad (Buckwalter et al., 1998).

♣ Las glicoproteínas ayudan a organizar y mantener la estructura macromolecular de la matriz, además estabilizan la relación entre los condrocitos y otras macromoléculas.

♣ La fosfolipasa A₂ es sintetizada por los condrocitos, esta enzima es importante en el metabolismo del ácido araquidónico y sus productos son mediadores de la inflamación (Buckwalter et al., 1998).

Estas moléculas dan origen a la matriz extracelular que para su estudio se divide en:

- * Pericelular. Rodea a las células, se une a la membrana celular con la matriz. Contiene algunas fibras cortas de colágena y posee una alta concentración de proteoglicanos y glicoproteínas.
- * Territorial. Envuelve a las células y a la matriz pericelular, contiene fibras cortas de colágena y al parecer protege a las células de daños mecánicos.
- * Interterritorial. Es una región larga que ocupa la matriz, contiene fibras largas de colágena, y es la responsable de las propiedades mecánicas del cartilago.

c) El cartilago articular hialino tiene, además, una población celular heterogénea, denominada condrocitos, las cuales producen macromoléculas estructurales, colágena tipo II, IX, XI, y queratan sulfato, que son expresiones bioquímicas del fenotipo celular (Benya y Shaffer, 1982; Aydelotte et al., 1991, 1992). El condrocito establece un microambiente especializado o matriz extracelular y en contraste con lo encontrado en la mayoría de las células de otros tejidos no existe un contacto célula-célula. Cada célula puede ser la unidad funcional del cartilago, es la responsable de la síntesis de los componentes de la matriz así como de la renovación de la matriz extracelular mediante la producción de una serie de enzimas degenerativas como: estromelisin, es una enzima metalodependiente activada por IL-1 que destruye no sólo proteoglicanos sino que activa a la colagenasa que es una enzima constitutiva de una gran capacidad destructiva y

que es la causa principal de la degradación del cartilago (Buckwalter et al., 1998). Se describen cuatro tipos de condrocitos, de acuerdo a su morfología y zona en la que se ubican. En la zona superficial los condrocitos son alargados, con múltiples filopodias, tienen un gran núcleo eucromático con diversos poros nucleares y abundantes filamentos en el citoplasma (Fig. 4a, 4b); y en cartilago osteoartrósico humano (OA), bajo el tejido fibrilar se pueden apreciar agregados de condrocitos denominados "clones", los cuales tienen forma redondeada, filamentos incompletos, presencia de centriolo y cilio primario en la periferia de la célula, encontrándose en grupos de 2 a 5 células dentro de una laguna (Kouri et al., 1996a). Los condrocitos de la zona media se les denomina condrocitos secretores y su fenotipo varía dependiendo de su localización, los de la parte alta de la zona media o condrocitos secretores 2a se caracterizan por tener una forma irregular, prominente retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi abundante (Kouri et al., 1996b). Los condrocitos de la zona media profunda o secretores 2b tienen un abundante y dilatado retículo endoplásmico el cual contiene un material granular muy fino, tiene numerosas vacuolas secretoras y vesículas que contienen ese material granular, no se ha apreciado aparato de Golgi (fig. 4c, 4d), teniendo un patrón morfológico apoptótico. En la zona profunda se encuentran condrocitos en diferentes grados de degeneración, poseen núcleos picnóticos, citosol denso, envoltura nuclear dilatada, proyecciones y vacuolización del citoplasma, figura 4e, (Kouri et al., 1998; Kouri et al., 1997).

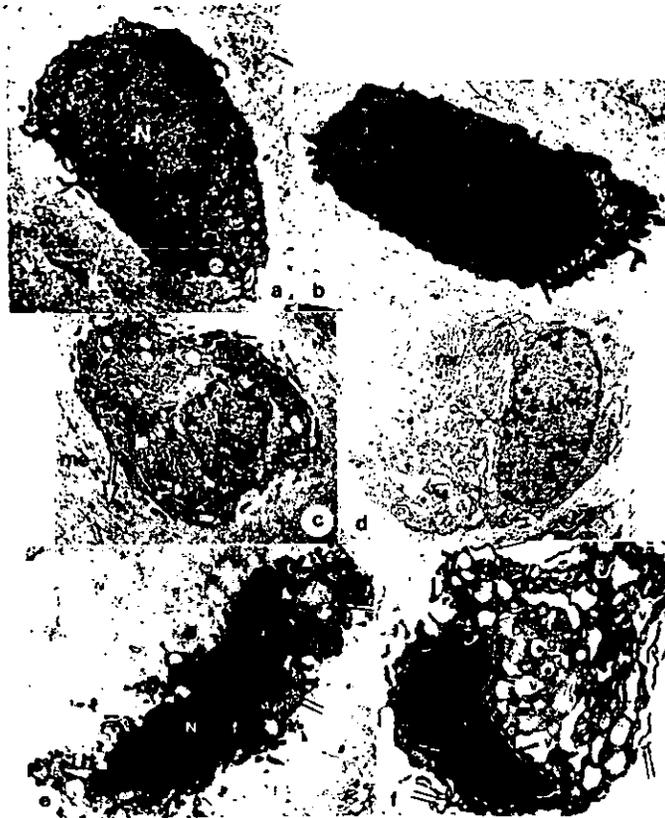


Fig. 4. Microfotografías de los diferentes tipos de condrocitos que se encuentran en el cartilago articular hialino. (a y b) Los condrocitos de la zona superficial, son alargados, presentan un reticulo endoplasmico rugoso abundante, núcleo (N) prominente vacuolas (V), proyecciones del citoplasma y en la matriz extracelular (me) se aprecian fibras de colágena (flechas) y algunos proteoglicanos teñidos con RHT (punta de flecha). X8500. (c y d) Los condrocitos de la zona media alta tienen una morfología redondeada, un abundante reticulo endoplasmico rugoso (rer), se observan algunas cisternas (puntas de flecha) con material electrolucente en su interior. X25000. (e) Los condrocitos de la zona media profunda presentan filopodias en su superficie y abundantes vesículas que se desprenden de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular (punta de flecha). Tienen un núcleo heterocromático (N) y en el citoplasma hay cisternas dilatadas y vacuolas (flechas dobles) con material granular dentro, también se observan paquetes densos de filamentos intermedios X9000. (f) Los condrocitos de la zona profunda o degenerados poseen un citoplasma muy vacuolado (v), un aparato de Golgi (g) discontinuo, núcleo picnótico (N) con un espacio pericelular alargado y proyecciones filiformes del citoplasma (flechas dobles). X1000. Kourí *et al.*, 1998.

ESTRUCTURA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR HIALINO

De acuerdo a las examinaciones histológicas del cartilago articular hialino, podemos apreciar que está constituido por 3 zonas:

a) Superficial, la cual es una capa de células elongadas y planas que parecen estar dispuestas en forma paralela a la superficie. Además existe una fuerte asociación entre la colágena y los proteoglicanos, aunque éstos están en menor cantidad (Fig. 5).

b) Media (alta y profunda), las células están en columnas cortas, células esferoidales con una alta concentración de organelos que intervienen en la síntesis de proteínas, hay una alta concentración de proteoglicanos y baja cantidad de agua (Fig. 5).

c) Profunda, es una zona calcificada, con un pequeño número de células picnóticas que están distribuidas en la matriz cartilaginosa y donde están incrustadas sales de apatita, figura 5, (Buckwalter et al., 1998).



Figura 5. Fotografía de un corte semifino de cartilago articular hialino normal de rata, teñido con azul de toluidina y observado al microscopio óptico. En él se muestra la superficie del tejido (punta de flecha), la zona superficial (ZS), zona media (ZM) y zona profunda (ZP). X400.

NUTRICIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR HIALINO

El cartilago articular de los animales maduros es totalmente avascular, aneural y alinfático. Su superficie no está recubierta por un pericondrio, ni por una membrana sinovial. Se cree que los nutrientes difunden a través de la matriz, a partir del liquido sinovial que baña la superficie del cartilago y desde los vasos sanguíneos que se encuentran en el hueso subcondral. Dicha difusión esta restringida al tamaño y carga de la molécula así como por su configuración estérica (Buckwalter et al., 1998).

FUNCIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR HIALINO

La función principal de este tejido es la de soporte, resistencia y movimiento de las articulaciones diartrodias como la rodilla, codo, tobillo, etc. (Kuettnner et al., 1982).

5.2. CULTIVO DE CONDROCITOS

Debido al aumento de las expectativas de vida en los humanos, las enfermedades crónicas degenerativas del cartilago, como la osteoartritis, se han presentado con mayor frecuencia, no sólo en personas de la tercera edad sino también en jóvenes. De aquí nace la importancia de estudiar la etiopatogenia de la osteoartritis, para ello se han establecido modelos *in vivo* en perros, conejos,

ratas, etc., y algunos otros *in vitro* como lo son los cultivos de condrocitos.

Los primeros cultivos de condrocitos se hicieron en monocapa (Manning y Bonner, 1967) pero mas tarde se demostró que las células cultivadas cambiaban de fenotipo y adquirirían un comportamiento bioquímico similar a los fibroblastos (síntesis de colágena tipo I) también conocida como dediferenciación (Benya et al., 1977; Chacko et al., 1969; Cheung et al., 1976; Deshmukh y Kline, 1976; Holtzer et al., 1978). Ante esta problemática los investigadores se dieron a la tarea de buscar la forma de mantener el fenotipo de los condrocitos aislados, empleando sistemas en donde se tratara de emular las características de la matriz extracelular, ya que sus observaciones indicaban que sin ella era más fácil la dediferenciación del condrocito. Para controlar este fenómeno se realizaron cultivos en suspensión líquida (Nevo et al., 1972; Deshmukh y Kline, 1976; Nerby et al., 1977); cultivos sobre capas delgadas de agar (Horwitz y Dorfman, 1970); en geles de colágena (Kimura et al., 1984; Thomas y Grant, 1988); y dentro de geles de agarosa (Benya y Shaffer, 1982; Bayliss et al., 1983; Aydelotte y Kuettner, 1988a; 1988b; Althouse et al., 1989).

En todos éstos sistemas de cultivo se observaba que los condrocitos no se dediferenciaban, lo que ayudó al estudio del comportamiento bioquímico de estas células en cultivo, el cual es muy semejante al realizado en el cartílago, ya que se demostró que se promovía la síntesis de colágena tipo II y de queratan sulfato (Benya y Shaffer, 1982; Aydelotte et al., 1991; 1992; Buschmann et al., 1992), pero se tenía una limitante, ya que una vez colocados los condrocitos en el medio

de soporte era muy difícil su recuperación.

Por su parte Guo et al., (1989), apoyándose en el trabajo de Kupchik et al., (1983) sobre el cultivo tridimensional de células cancerígenas en geles de alginato, dió inicio al cultivo en tres dimensiones de condrocitos. A partir de aquí otros investigadores tomaron como base este tipo de modelo para continuar estudiando al condrocito (Häuselmann et al., 1992; Binette et al., 1998; Lemare et al., 1998).

El cultivo en geles de alginato ha cobrado importancia debido a que presenta varias ventajas sobre los otros, algunas de ellas son la solubilización del gel por la adición de un agente quelante (Häuselmann et al., 1992), además este sistema brinda la posibilidad de conocer la biosíntesis y ensamble de los proteoglicanos, permite conocer como se inicia la organización de la matriz extracelular y aprender más sobre los procesos que se involucran en esta renovación así como su degradación, que da origen a enfermedades crónico degenerativas, entre ellas la osteoartritis.

En fechas recientes algunos investigadores han realizado cultivos de condrocitos empleando, en primer lugar, un cultivo en monocapa, con la finalidad de favorecer la proliferación celular aún cuando el condrocito se dediferencie, pero para lograr revertir el proceso se colocan en geles de alginato y tiempo después el fenotipo es restablecido (Binette et al., 1998; Lemare et al., 1998). Otros investigadores han empleado el cultivo tridimensional para realizar trasplantes de un tejido tipo cartilago (Perka et al., 2000).

5.3. ALGINATO

El alginato, un polímero lineal obtenido del alga *Macrocystis pirifera* y está constituido por unidades repetidas de ácido manurónico y ácido gulurónico los cuales forman un gel en presencia de calcio u otro catión divalente (Grant *et al.*, 1973; Kupchik *et al.*, 1983; Guo *et al.*, 1989; Häuselmann *et al.*, 1992). El proceso de gelificación puede ser reversible al estar el gel en contacto con sustancias quelantes de calcio como el EDTA, citratos y fosfatos (Häuselmann *et al.*, 1992; Petit *et al.*, 1996; Shakibaei y De Souza, 1997; Lemare *et al.*, 1998).

La formación del gel de alginato sirve como barrera protectora para la célula además tiene propiedades semejantes a la de la matriz extracelular, en este caso las cargas negativas del alginato son similares a las proporcionadas por los proteoglicanos que constituyen la matriz del cartilago (Häuselmann *et al.*, 1992; Shoichet *et al.*, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la metodología para el mantenimiento de condrocitos de rata Wistar adulta en geles de alginato, así como su caracterización fenotípica y estructural.

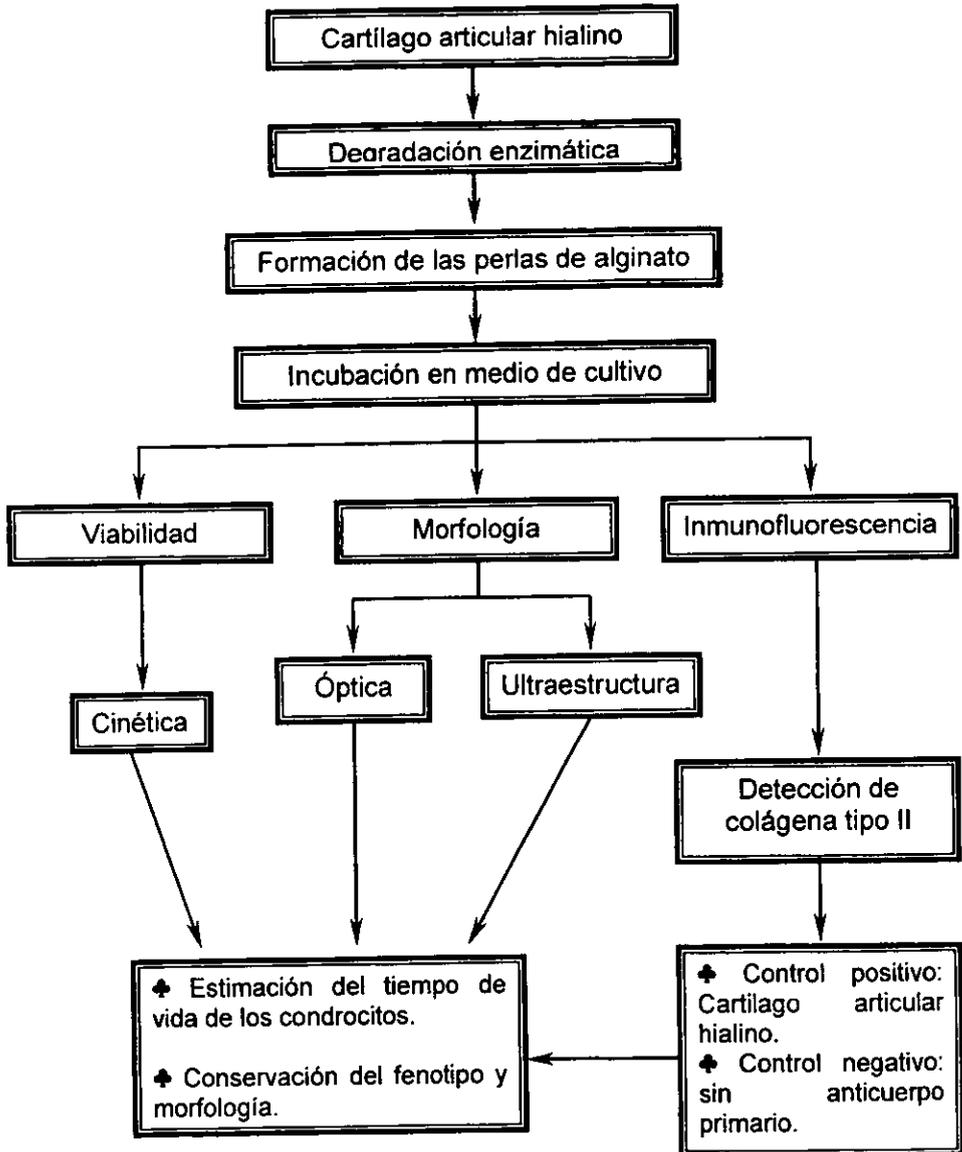
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Estandarizar la técnica para la obtención y degradación enzimática del explante de cartílago articular hialino de ratas Wistar macho.
- b) Establecer la metodología para el encapsulamiento de los condrocitos en geles de alginato.
- c) Estimar el tiempo de viabilidad de los condrocitos en cultivo.
- d) Determinar la morfología de los condrocitos en cultivo.
- e) Caracterizar fenotípicamente las células en cultivo.

4. HIPÓTESIS

Si los condrocitos aislados pueden conservar el fenotipo al ser encapsulados en geles de alginato, entonces el cultivo en geles de alginato podría servir como modelo en el estudio de diversos procesos existentes en la osteoartritis experimental; así como para el ensayo de nuevas estrategias terapéuticas.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. METODOLOGÍA

7.1. AISLAMIENTO Y ENCAPSULACIÓN DE CONDROCITOS

a) Obtención del explante

Los condrocitos se aislaron a partir de cartilago articular hialino que se obtuvo por disección, en condiciones estériles, de cóndilos femorales, platos tibiales y cabeza de femúr de 50 ratas macho Wistar de tres meses de edad con un peso de alrededor de 300 ± 50 g, a los cuales se les rasuró el pelo de las extremidades posteriores (rasuradora Trend Setter mod. DCA, 120V); los animales fueron sacrificados en atmósfera de CO₂ bajo supervisión veterinaria.

La parte inferior del animal primeramente se lavó con agua y jabón, y después se sumergió en un baño de alcohol al 50% para eliminar restos de pelo, orina y heces. Posteriormente el animal se pasó rápidamente por la flama del mechero; después se depositó sobre una charola de papel aluminio que contenía solución salina fisiológica estéril (SSFE).

Para iniciar la disección, el animal se colocó en una plancha de acrílico aséptica y el instrumental se depositó en una charola con una mezcla de alcohol 70%-benzal 1:1000. Cuando el material fue empleado se pasó por la flama del mechero, enfriándolo en la zona donde se hizo el corte de la piel. Seguido a esto se semiflexionó la articulación procediendo a descarnar el hueso de las masas musculares; después se cortó la tibia a una distancia aproximada de 1 cm por

debajo de la rótula, y el femúr se descubrió hasta dejar expuesta la cabeza femoral.

La articulación se pasó rápidamente por la flama del mechero para después ser depositada en 125 mL de solución A (ver apéndice) estéril.

Dentro de una campana de flujo laminar vertical (Alder mod. CFV-13), las articulaciones disectadas se colocaron en una charola de acero inoxidable estéril que contenía 100 mL de solución A estéril y ahí se separaron el cóndilo femoral del plato tibial y la cabeza femoral, para ello se rompió la cápsula que alberga a la rótula. Con la ayuda de un bisturí se cortaron los ligamentos externos e internos de la articulación así como el menisco. Cada porción fue depositada en una caja petri que contenía 20 mL de solución A estéril y bajo el microscopio estereoscópico aséptico se procedió a retirar el cartilago hialino, que se cortó en fragmentos de aproximadamente 4x4x1 mm (Kuettnner *et al.*, 1982), procediendo a realizar un lavado con solución A estéril y posteriormente se depositaron en un tubo Ependorff que contenía 1 mL de medio DMEM/F12 suplementado. El tejido obtenido y pesado se incubó a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% con medio DMEM/F12 suplementado (ver apéndice) durante 4 días.

b) Digestión del explante

Para iniciar la digestión del cartilago, el tejido se lavó 2 veces con 10 mL de SSFE durante 3 minutos colocándose después en un vial estéril con 10 mL de solución de tripsina 0.25%, se selló con papel parafilm y se incubó a temperatura ambiente

(25°C) durante 30 minutos (Srivastava et al., 1974) en agitación continua. Posteriormente se centrifugó a 900 rpm 10 minutos para eliminar la tripsina. La pastilla así obtenida se resuspendió en 10 mL de una solución de colagenasa tipo II 0.2% (van Susante et al., 1995), se selló con papel parafilm y se incubó a 37°C durante 3 horas (Häuselmann et al., 1992; Kuettner et al., 1982; van Susante et al., 1995; Srivastava et al., 1974). Posteriormente la solución se filtró a través de una malla de nylon (Kuettner et al., 1982), y se determinó el porcentaje de viabilidad empleando el colorante vital azul tripano. El filtrado se centrifugó a 900 rpm por 10 minutos, posteriormente el sobrenadante fue retirado, la pastilla se lavó dos veces con SSFE y el botón de condrocitos formado en el último lavado se dejó en una mínima cantidad de la solución antes mencionada.

c) Formación de las perlas de alginato

En condiciones estériles, los condrocitos fueron resuspendidos en un volumen de una solución de alginato al 1.2% para obtener una concentración aproximada de 1×10^5 células/perla, considerando que el volumen aproximado de cada perla de alginato es de 11 μ L. La suspensión alginato-condrocitos se depositó en una jeringa de 10 mL estéril y se hizo pasar a través de una aguja calibre 22. Las gotas formadas se depositaron en 10 mL de CaCl_2 102 mM estéril, aquí permanecieron 10 minutos con la finalidad de que gelificaran y sedimentaran. El sobrenadante (CaCl_2) fue retirado con una jeringa; posteriormente se adicionaron 10 volúmenes

de SSFE, se agitó en forma suave y se esperó nuevamente a que sedimentaran las perlas para extraer la SSFE por medio de una jeringa de 10 mL estéril. El procedimiento se realizó en 4 ocasiones y la quinta fue con medio de cultivo DMEM/F12 suplementado (van Susante et al., 1995).

Las perlas se colocaron en botellas de cuello angulado en una proporción de 1000 perlas por cada 50 mL de medio suplementado (Häuselmann et al., 1996). Se incubaron a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5%.

7.2. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD

La determinación de viabilidad de los condrocitos en las perlas de alginato se realizó cada semana durante dos meses, para ello se empleó el colorante vital azul tripano 0.4% (Mc Ateer y Davis, 1994). Para ello las perlas de alginato se disolvieron en una solución de citrato de sodio 55 mM y una alícuota se diluyó 1:10 con azul tripano. Para conocer el número de células/mL, la cuenta se hizo en un hemocitómetro en la cuadrícula para células blancas, sumándose el número de células presentes en las cuatro cuadrículas para células blancas, el valor obtenido se multiplica por 10000 (factor de dilución por volumen del hemocitómetro).

7.3. MORFOLOGÍA DEL CONDROCITO

La determinación de la estructura del condrocito en las perlas de alginato se hizo a través de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

Microscopía Óptica

Las perlas de alginato fueron fijadas con glutaraldehído 2.5%, en búfer de cacodilatos 0.1 M y CaCl_2 5 mM, durante 2 horas a temperatura ambiente seguido de 3 lavados de 10 minutos con búfer de cacodilatos 0.1 M y CaCl_2 5 mM; post-fijadas con OsO_4 1%, RHT 0.7%, en búfer de cacodilatos 0.1 M (Häuselmann *et al.*, 1994), por 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se deshidrataron con concentraciones crecientes de etanol y se colocaron en una mezcla de etanol-resina Spurr proporción 1:1 y 1:3 durante 2 horas cada una, seguido de tres cambios en resina pura dejándolas polimerizar a 60°C durante 36 horas. Se realizaron cortes semifinos de aproximadamente 1 μm de espesor (ultramicrotomo Reichert Jung Ultracut), los cuales fueron teñidos con azul de toluidina al 0.5%. Después fueron montados con resina sintética y observados al microscopio óptico (Leica DMLS) a diferentes aumentos (X100, X400, X630 y X1000).

Microscopía electrónica de transmisión

La metodología empleada en el procesamiento de las muestras es la misma que para la microscopía óptica.

Los cortes efectuados fueron de aproximadamente 80 nm de espesor o de coloración plateada/dorada los cuales fueron montados en rejillas de cobre de 400 mesh y se contrastaron con solución saturada de acetato de uranilo y citrato de plomo Reynolds durante 20 minutos y 1 minuto respectivamente. Los cortes se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 2000EX).

7.4. DETECCIÓN DE COLÁGENA TIPO II

La caracterización fenotípica de colágena tipo II se hizo por medio de inmunofluorescencia. Para ello las perlas de alginato fueron fijadas en paraformaldehído al 4% y CaCl_2 5 mM a 4°C durante 8 horas. Las perlas se lavaron 3 veces por 10 minutos en búfer de Tris-HCl y se colocaron en una solución de sacarosa 20% durante toda la noche a 4° C, posteriormente se incluyeron en O.C.T. o Cryomatrix (congelante de matriz de tejidos) y se seccionaron (10 μm de grosor) en criostato. Los cortes fueron montados en portaobjetos, cubiertos previamente con gelatina tipo A, y almacenados a -20°C durante 2 días. Para exponer el epítipo de la colágena tipo II se les colocó a los cortes 20 μL una solución de hialuronidasa testicular 0.05% y se dejó actuar durante 1 hora a 37°C (Lemare *et al.*, 1998; Hirsch *et al.*, 1996). Posteriormente se lavaron con búfer de Tris-HCl.

Para bloquear los sitios de unión inespecífica del anticuerpo se empleó 20 μL de albúmina sérica bovina libre de IgG 0.2% y Tritón X-100 0.02% en búfer de lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con búfer de lavado (Lemare *et al.*, 1998). Después se incubó en 20 μL del anticuerpo primario dil. 1:25 en búfer de bloqueo durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados con búfer de lavado y se colocó 20 μL del anticuerpo secundario marcado con FITC dil. 1:60, durante 90 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con búfer de lavado. La tinción de los núcleos se realizó con una solución

de yoduro de propidio (10 $\mu\text{g/mL}$) durante 5 minutos a temperatura ambiente y a resguardo de la luz. Posteriormente se hicieron tres lavados con búfer de lavado. Los cortes se montaron en portaobjetos empleando medio de montaje Vectashield (Polysciénce), cubiertos, sellados con esmalte de uñas y se observaron en un microscopio de fluorescencia (Leica DMLS).

Como control negativo el corte se incubó en ausencia del anticuerpo primario y los demás pasos se hicieron en las mismas condiciones que la muestra; además se empleó como control positivo un corte de cartílago de rata normal de 3 meses.

8. RESULTADOS

8.1 OBTENCIÓN DEL EXPLANTE.

Siguiendo la metodología propuesta para la obtención del cartílago articular hialino de la región del plato tibial, cóndilo femoral y cabeza de fémur se obtuvo un rendimiento de 61.464 ± 5.4 mg de tejido húmedo por cada rata que se sacrificó.

8.2 DIGESTIÓN DEL EXPLANTE.

Bajo las condiciones marcadas en la metodología se obtuvo un rendimiento del 80% de tejido digerido, este porcentaje se obtuvo de la siguiente relación $100 - \left[\left(\frac{\text{g de tejido no digerido}}{\text{g tejido húmedo}} \right) * 100 \right]$.

El número de condrocitos obtenido en la digestión fue de $3.09 \pm 1.04 \times 10^6$ células/mL, de las cuales $2.82 \pm 1.02 \times 10^6$ células/mL fueron viables, esto representa un 91.3% de viabilidad.

8.3. CINÉTICA DE VIABILIDAD

Se encontró que al inicio de la incubación de los condrocitos hay un porcentaje de células viables de 91.3%, el cual va disminuyendo cada semana alcanzando un porcentaje menor al 50% después de 28 días. Este suceso se puede apreciar mucho mejor en la figura 6, donde se observa que el descenso es lento en las primeras semanas pero después es más marcado.

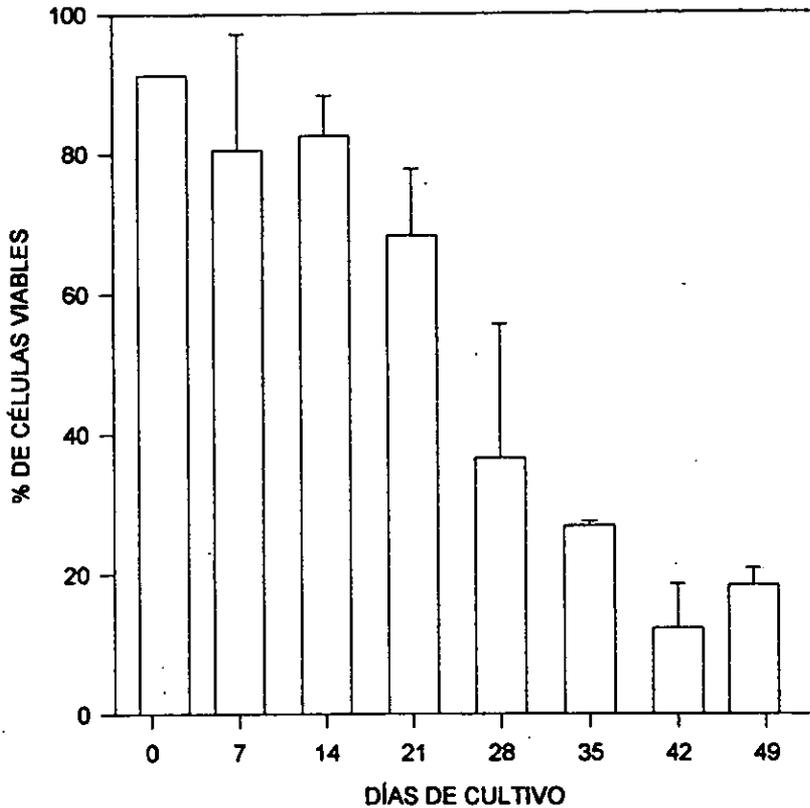


Fig. 6 Determinación del porcentaje de viabilidad de los condrocitos en cultivo tridimensional empleando el colorante vital azul tripano. Los resultados están expresados como la media y la desviación estándar de 3 experimentos.

8.4. MICROSCOPIA ÓPTICA

En la Fig. 7 se muestran condrocitos obtenidos después del empleo de tripsina y colagenasa en la digestión del cartilago articular hialino. La morfología de los condrocitos presenta una forma redondeada, delimitada por una membrana celular intacta, el núcleo es grande sin aparentes alteraciones. En el citoplasma se observa la presencia de algunos gránulos y vacuolas. Parte de esta morfología es conservada por algunos condrocitos durante su mantenimiento en las perlas de alginato (Fig. 8).

De primera instancia se hicieron cortes semifinos de las perlas de alginato incluidas en resina Spurr y teñidos con azul de toluidina; se observó que en el primer día después de la encapsulación (Fig. 8a) hay células, inmersas en el gel de alginato, con un citoplasma muy vacuolado, sin detectar la presencia del núcleo. En los cortes del día 8 y 14 (Fig. 8b y 8c) se observan grupos de condrocitos con cierta cercanía, en éstas células es posible apreciar un gran núcleo, citoplasma con algunos gránulos y la membrana celular completa. Caso contrario se ve en los días 21, 57 y 100 (Fig. 8d, 8e y 8f), donde las células se vieron deterioradas y éste daño aumenta con el transcurso del tiempo de cultivo.



Fig. 8. (a) Fotografía de condrocitos después de que el cartilago fue digerido con tripsina y colagenasa. X100; (b) puede observarse que tienen una forma redonda, un núcleo grande (N) y la presencia de gránulos (flechas). X1000

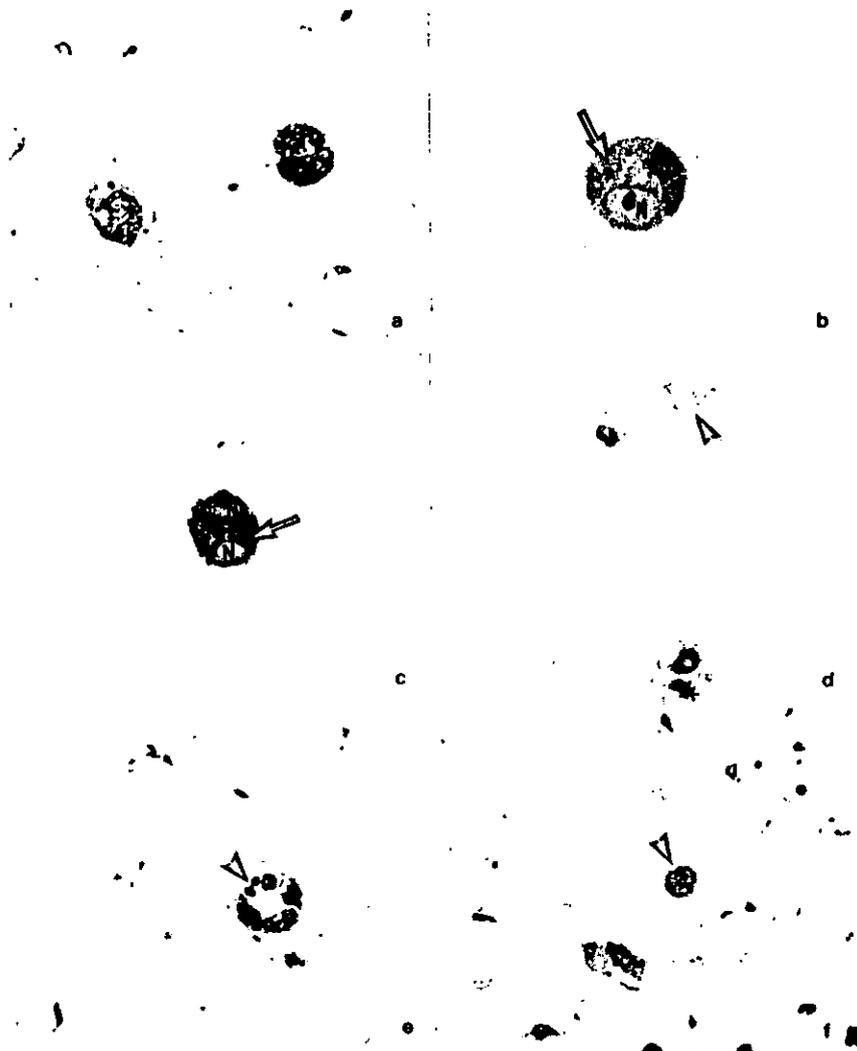


Fig. 8. Fotografía de condrocitos en una perla de alginato teñidos con azul de toluidina y observados en microscopio óptico. (a) Los condrocitos de un día de incubación se encontraron muy vacuolados y amorfos. X1000; (b) Condrocitos de 8 días de cultivo formando pequeños grupos de células. Se observa núcleo (N), algunos gránulos (flechas) y una membrana celular completa. X630; (c) La presencia de grupos de condrocitos continua hasta el día 14, los cuales mantienen la morfología típica de estas células. Núcleo prominente (N), gránulos (flechas). X1000; (d) Para el día 21 no se aprecia un citoplasma completo (flechas) y se observa restos celulares (punta de flecha). X1000; en los días 57 y 100, (e) y (f) respectivamente, del cultivo de condrocitos en perlas de alginato se observan sólo restos celulares (puntas de flechas) inmersos en la matriz de alginato. (e) X630; (f) X630.

8.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Se observó la ultraestructura de los condrocitos y se encontró que al inicio (Fig. 9a) había algunas células de forma ovoide, con un núcleo definido, cromatina dispersa, citoplasma muy vacuolado y la membrana celular se aprecia discontinua, de apariencia semejante a una célula necrótica.

Para el día 8 (Fig. 9b) los condrocitos tienen una forma ovoide, un núcleo prominente con cromatina dispersa, nucleolo centrado en algunas células y en otras es polar, y cromatina hacia la periferia nuclear. En el citoplasma es posible la presencia de un retículo endoplásmico rugoso abundante así como de aparato de Golgi, mitocondrias, algunas vacuolas y gránulos al parecer de origen lipídico (Fig. 10a). En la región pericelular de estas células es posible observar estructuras tipo colágena (Fig. 10c - 10f), así como algunas prolongaciones del citoplasma e incluso porciones pequeñas y vesículas despendiéndose del mismo (Fig. 10b). También se aprecia la formación de una malla fina formada por estructuras de forma puntiforme que pueden ser proteoglicanos teñidos con RHT (Fig. 10b, 10c y 10f).

A los 14 días de estar en las perlas de alginato se sigue observando la presencia de grupos de condrocitos, algunos de ellos tienen una morfología semejante a los condrocitos del día 8 (Fig. 9c). Además se observan otros condrocitos cuya forma es elongada, núcleo prominente alargado, cromatina dispersa, nucleolo polar y la cromatina en la periferia nuclear. En el citoplasma hay un gran retículo endoplásmico rugoso así como algunos gránulos y vacuolas. También es notoria

la presencia de prolongaciones del citoplasma así como de estructuras tipo colágena (Fig. 9c).

Es importante hacer notar la cercanía que hay entre las células de éstos grupos que se mantiene por más de una semana.

También se pudo apreciar la presencia de acúmulos de material fibrilar sobre la malla de alginato (Fig. 10d) al parecer estos agregados se ensamblan y dan origen a las estructuras tipo colágena, que se han observado en los días 8 y 14 (Fig. 10e y 10f).

Para el día 21 sólo se observan condrocitos muy deteriorados ya que el núcleo no presenta forma, la cromatina empieza a compactarse, tiene una membrana nuclear discontinua. El citoplasma esta desintegrado y con una gran presencia de vacuolas. No se observan organelos (Fig. 9d).

Los condrocitos de 57 y 100 días no pueden identificarse como tal ya que sólo se observan algunos restos celulares, como son algunas vacuolas y material denso en lo que ocupaba el espacio celular dentro de la malla de alginato (Fig. 9e y 9f).

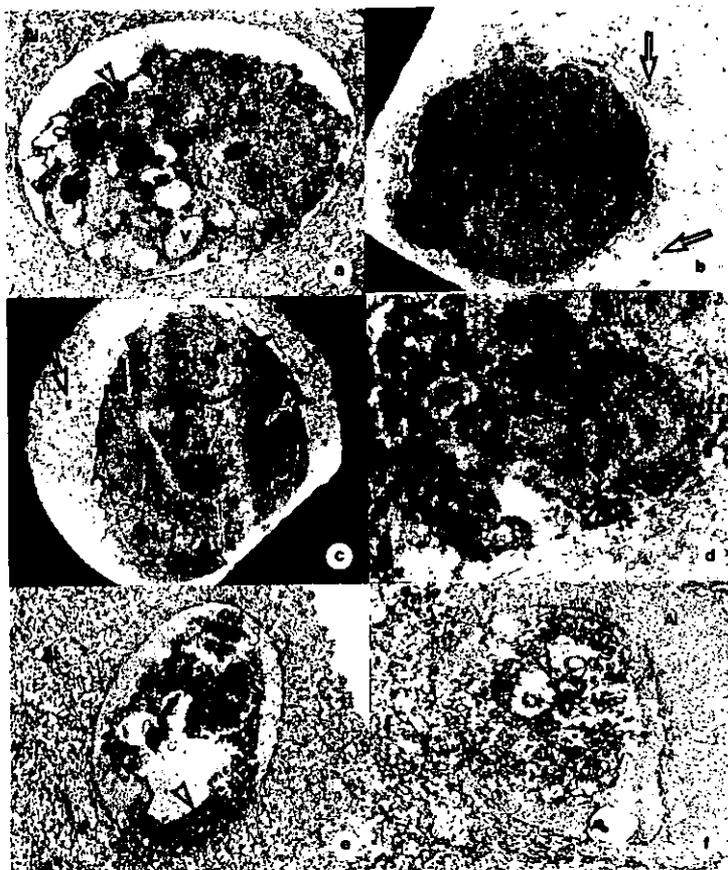


Fig. 9. Microfotografías de condrocitos en perlas de alginato. (a) Un día de incubación, los condrocitos han ocupado un espacio dentro del gel de alginato (Al) pero la célula está muy vacuolada (V) y con una membrana celular discontinua (punta de flecha), lo que indica su estado de degeneración. X6000. (b) Al día 8 de incubación, hay formación de grupos de condrocitos los cuales son de forma ovoide, un gran núcleo (N) y nucléolo (Nu), citoplasma con prominente retículo endoplásmico rugoso (RER), mitocondrias (M), gránulos (G) y vacuolas (V). En la periferia hay estructuras tipo colágena (flechas) y algunas prolongaciones del citoplasma. X3000. (c) Los grupos de condrocitos se mantienen hasta el día 14, la morfología observada es similar a la del día 8. Además observamos una célula elongada, núcleo alargado (N), nucléolo polar (Nu), retículo endoplásmico rugoso (RER) abundante, gránulos (G), vacuolas (V), proyecciones del citoplasma y estructuras tipo colágena (flechas). X3000. (d) Condrocitos de 21 días de alginato, nótese la compactación de la cromatina nuclear, membrana nuclear discontinua (punta de flechas) y la presencia de múltiples vacuolas (V) en el citoplasma. X15000. (e) Apariencia de condrocitos a los 57 días. X6000. (f) Restos de condrocitos a los 100 días de incubación. X8000. En ambas microfotografías (e y f) se observan vacuolas (V) y material denso (puntas de flechas). No hay presencia de núcleo ni de organelos. El alginato (Al) mantiene el espacio que ocuparon las células (puntas de flecha) pero no se observa membrana celular.

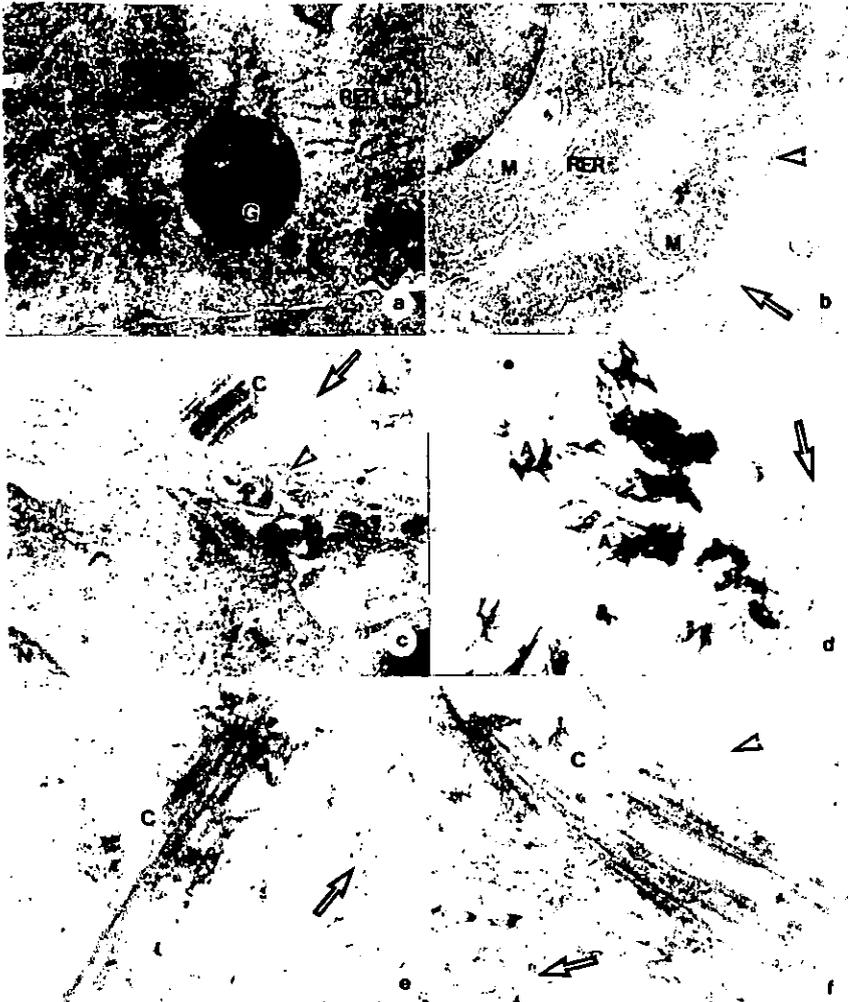


Fig. 10. (a) Ampliación de los gránulos observados en la figura 9. Estos gránulos (G) se encuentran distribuidos en el citoplasma junto con mitocondrias (M), vacuolas (V) y retículo endoplásmico rugoso (RER). X25000. (b) Parte del citoplasma que muestra la presencia de retículo endoplásmico rugoso (RER), parte del núcleo (N) así como porciones del citoplasma con algunos organelos. Nótese la presencia de pequeñas estructuras formando una fina malla de proteoglicanos teñidos con RHT (puntas de flecha) sobre el alginato (flecha). X20000. (c) Ampliación de las estructuras tipo colágena (C) sobre la matriz de alginato (flecha). X25000. (d) Ensamble de las fibras de colágena (flechas) en la matriz de alginato (punta de flechas) para dar origen a los acúmulos (A) que se detectaron en la inmunofluorescencia. X20000. (e y f) Estructuras tipo colágena (C) encontradas en la periferia de los condrocitos. Nótese que sobre la malla de alginato (flecha) se encuentra otra malla fina (puntas de flecha) que al parecer son proteoglicanos teñidos con RHT. (e) X80000; (f) X40000.

8.6. DETECCIÓN DE COLÁGENA TIPO II

En la figura 11a se observa el control positivo de la reacción para detectar colágena tipo II. La colágena se encuentra en la matriz pericelular y territorial de los condrocitos de la zona superficial y media, en tanto que en la zona profunda la localización es territorial (Fig. 11b). Aunque hay una marca muy tenue en el área interterritorial.

En la perla de alginato la localización de la marca del anticuerpo anticólágena tipo II se observó en las matrices pericelular y territorial de las células (Fig. 12) en forma de acúmulos, semejante a los observados en la microscopía electrónica (Fig. 10d). También se observa una ligera malla en la zona territorial (Fig. 13a). Aunque también se detectaron algunos acúmulos en lo que pudiera ser la zona interterritorial de la perla (Fig. 13b).

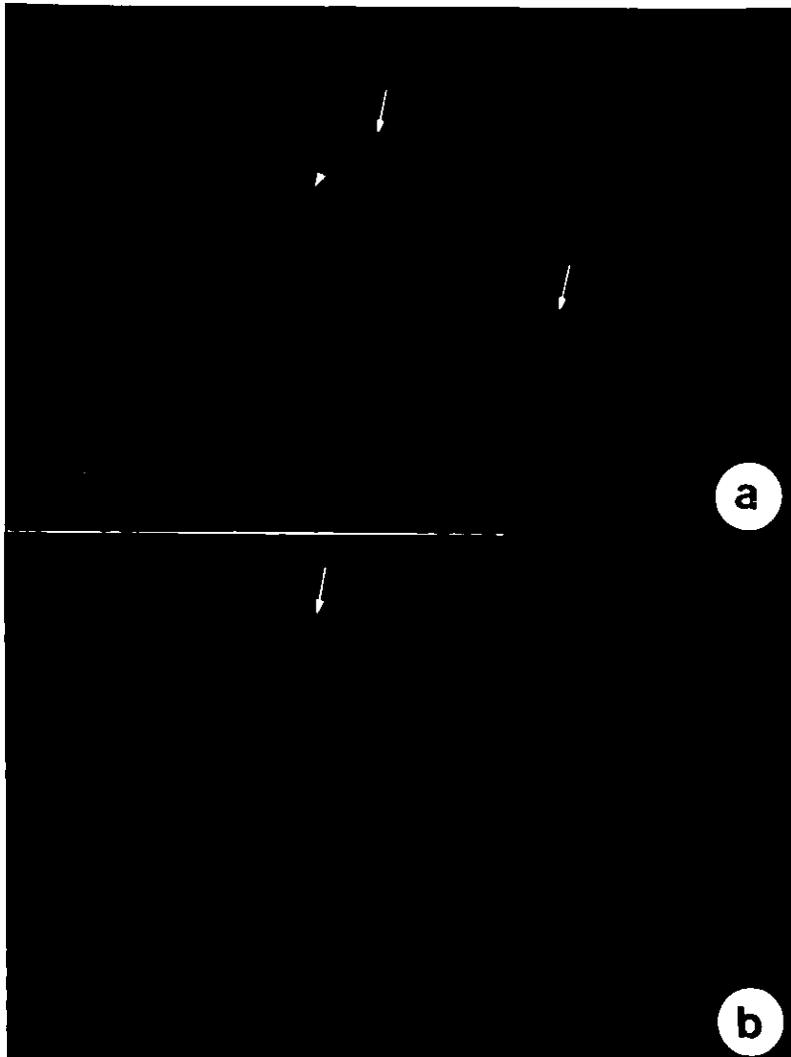


Fig. 11. Detección de colágeno tipo II por inmunofluorescencia y marcado con fluorescencia. (a) se observa la distribución de la colágeno en las zonas del cartilago. Se aprecia que en la zona superficial y media es pericelular (puntas de flecha) y territorial (flechas). X400. (b) En la zona profunda sólo es territorial. Hay una marca muy tenue en la zona interterritorial (flecha). X1000.

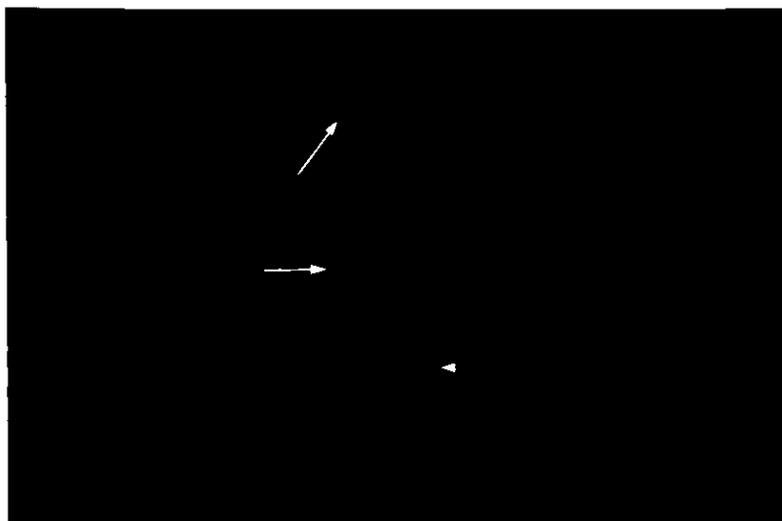


Fig. 12. La inmunofluorescencia indirecta para detectar de colágeno tipo II muestra la presencia de la proteína en forma acúmulos (flechas) cerca de algunos condrocitos (punta de flecha) inmersos en alginato, lo que correspondería a la matriz extrateritorial. X1000.

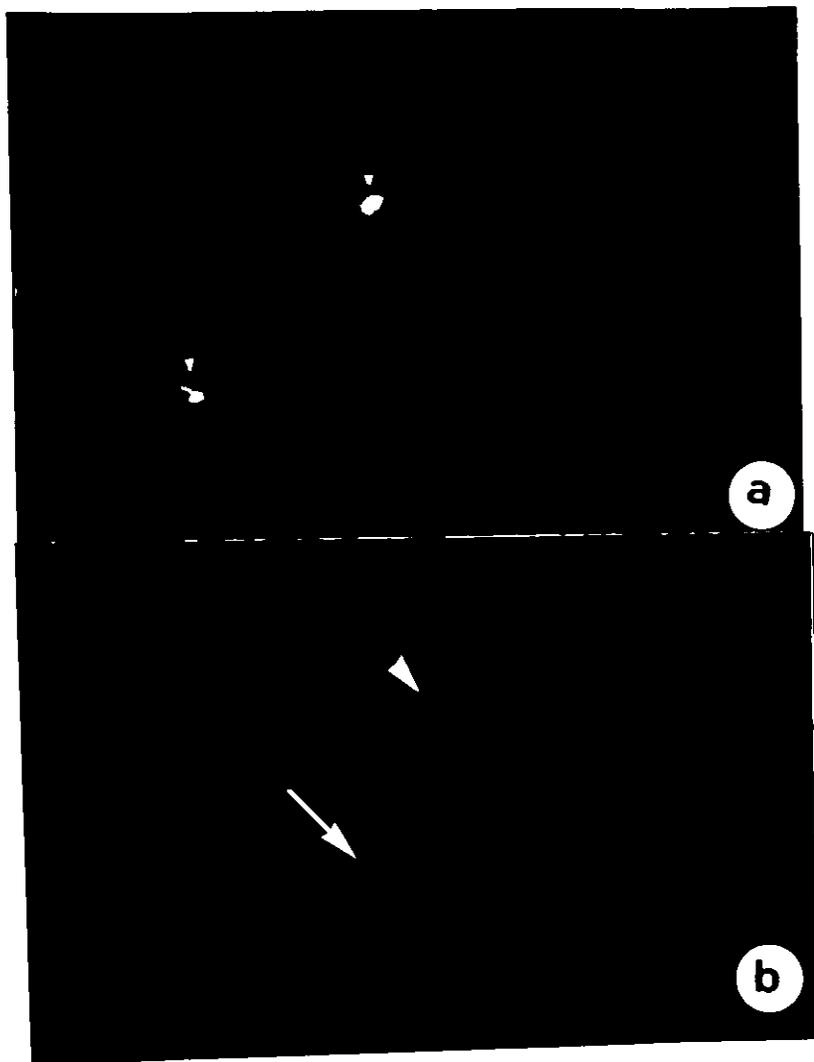


Fig. 13. (a) Acúmulos de colágena tipo II (puntas de flecha) detectada por Inmunofluorescencia. (b) En la región pericelular (flecha) se observaron algunos acúmúos de colágena tipo II (puntas de flecha). (a) y (b) X1000.

9. DISCUSIÓN

Se consideró que la cantidad de cartílago articular hialino obtenido fue importante debido al tamaño de las extremidades posteriores de la rata y a la dificultad que representa obtener el cartílago de las zonas del plato tibial, cóndilo y cabeza femoral.

Aún cuando la cantidad obtenida fue pequeña, en comparación con las empleadas por otros autores que trabajan con animales grandes o con humanos (Häuselmann *et al.*, 1992; Kuettnner *et al.*, 1982), se pudo realizar la digestión sin mayor problema. No obstante, el rendimiento del tejido digerido no pudo ser aumentado debido a que al dar más tiempo de incubación con las enzimas o al incrementar su concentración, la viabilidad celular disminuyó en forma importante. Considerando lo anterior se decidió mantener las condiciones marcadas en el protocolo inicial.

En la encapsulación de los condrocitos en geles de alginato está recomendado hacerlo en una proporción de 44×10^3 células por cada perla de alginato formada (Guo *et al.*, 1989), y en primera instancia así se realizó pero se observó muy poca población celular por lo que se decidió aumentar el número a 1×10^5 células, teniendo mejores resultados en las observaciones realizadas al microscopio óptico y en el electrónico de transmisión.

La disminución en la viabilidad y la presencia de células muy deterioradas en los primeros días de incubación pudo deberse al cambio de condiciones ambientales que sufrieron las células al ser colocadas en las perlas de alginato y a una baja

producción de matriz en el gel debido a la exposición a altas concentraciones de calcio durante la gelación (van Susante et al., 1995).

La morfología ultraestructural observada los días 8 y 14 de incubación coincide con la reportada en la literatura (Kuettner et al., 1982; Häuselmann et al., 1992; Shakibaei y De Souza, 1997; Kourí et al., 1996b). Además la presencia de grupos de condrocitos es explicada como resultado de una posible mitosis en los primeros días de cultivo de los condrocitos. Posteriormente las células hijas se van separando gradualmente por deposición de la matriz extracelular, como ocurre en el cartilago; la formación de estos grupos de condrocitos es observado entre el día 7 y el día 15 del cultivo en mayor proporción pero continúa por dos semanas más (van Susante et al., 1995; Petit et al., 1996; Shakibaei y De Souza, 1997; Lemare et al., 1998).

Dado que la viabilidad va descendiendo en forma lenta, y hay un porcentaje de células vivas menor al 50% al día 28 se decidió elegir como días óptimos entre el día 8 y el día 14 para emplear este sistema, tiempo en el que se asegura un buen porcentaje de viabilidad y células con morfología típica (Gibson et al., 1997; van Susante et al., 1995). Estos resultados difieren de los obtenidos por otros investigadores ya que ellos reportan que los condrocitos se pueden mantener metabólicamente activos y conservar su morfología hasta por 8 meses, en el caso de condrocitos de bovinos y de 3 meses para los condrocitos humanos (Häuselmann et al., 1994; Häuselmann et al., 1996; Petit et al., 1996; Ramdi et al., 1993; Beekman et al., 1994; Lemare et al., 1998); ésta diferencia se puede deber

a que en las condiciones en que fueron cultivados los condrocitos no cubrían con sus necesidades de factores que estimularan la proliferación o prolongaran su tiempo de vida; además de que la edad de las ratas que se emplearon pudo intervenir en ello ya que los autores citados anteriormente emplearon animales jóvenes (bovinos de 18 meses y conejos de 2 meses) y en este trabajo se utilizaron ratas adultas para hacer una correlación con un modelo de osteoartritis *in vivo*, en estos animales, que se maneja en el laboratorio. Así mismo se ha observado que en animales adultos y viejos el proceso de mitosis se ve disminuido (Srivastava *et al.*, 1972). En relación con lo anterior, en experimentos posteriores se observó que al emplear cartílago articular hialino de ratas jóvenes los condrocitos proliferaban en mucho mayor proporción que los obtenidos de ratas adultas, además de que se enriqueció el medio de cultivo con medio sobrenadante de un cultivo de condrocitos dediferenciados (cultivo en monocapa) y se detectó que la viabilidad de los condrocitos en perlas de alginato se conservaba por más de un mes, esto sustenta la necesidad de cubrir otro tipo de factores, además de los nutricionales, que el medio empleado no pudo proporcionar.

Es importante mencionar que la morfología ultraestructural que presentaron los condrocitos incubados durante los primeros 15 días (alargados y redondos) fue similar a la observada en los condrocitos de la zona superficial y media del cartílago. Häuselmann *et al.*, (1994) reportaron que los condrocitos de forma alargada se encontraban sólo en la superficie de la perla y después de 3 semanas iban desapareciendo, pero lo que se observó en este trabajo fue que estas células

se encontraban presentes tanto en la zona media como profunda de la perla de alginato y posiblemente participen en la construcción de la matriz extracelular dado que se apreciaron algunas estructuras tipo colágena y proteoglicanos en la periferia. Por otra parte, el patrón hipertrófico de los condrocitos de la zona profunda del cartílago fue semejante a la morfología observada en las células incubadas durante 21 días, lo que pudiera indicar que su degeneración ocurre por la misma vía: necrosis (Kourí et al., 1996a, 1997). En general, los resultados anteriores fueron indicativos de que en este sistema de mantenimiento los condrocitos presentaron una ultraestructura heterogénea similar a la del cartílago articular hialino (Aydelotte et al., 1991; Häuselmann et al., 1992, 1994), aunque su localización no sea semejante. También es importante resaltar el papel que jugó el alginato al sustituir, en cierto punto, a la matriz extracelular ya que como se observó en las microfotografías de los condrocitos en cultivo, la red de alginato tiene una apariencia semejante a la de la matriz extracelular del cartílago; esto pudiera indicar que para conservar el fenotipo es necesario mantener la forma de los condrocitos y ese rol lo desempeña la matriz extracelular.

La observación de condrocitos se hizo a partir del día 8 y se mantuvo hasta el día 14, esto pudiera ser producto de la mitosis de los condrocitos en los primeros días de mantenerlos en el alginato y posteriormente las células hijas lograron irse separando gradualmente por deposición de la matriz extracelular, como ocurre en el cartílago (van Susante et al., 1995; Petit et al., 1996; Shakibaei y De Souza, 1997; Lemare et al., 1998); en este caso la mitosis estuvo disminuida por los

motivos que se discutieron anteriormente.

La detección de colágena tipo II producida por los condrocitos, por medio de inmunofluorescencia, fue notoria al día 15 del mantenimiento de las células dentro de las perlas de alginato, lo anterior concuerda con lo reportado en la literatura donde indican que la síntesis de la proteína es evidente después del día 7, alcanza un máximo al día 15 y días después desciende (Petit et al., 1996). Debido a la sensibilidad de la técnica fue posible hacer dicha localización ya que la cantidad que se encontró presente era pequeña en comparación con la que se halla en el cartílago, como se muestra en las figuras 14-16. La importancia de caracterizar a la colágena tipo II radicó en el hecho de que es una proteína que sólo el condrocito sintetiza y detectarla en el sistema de mantenimiento propuesto fue indicador de la no dediferenciación, por lo que esta forma de conservar a las células in vitro demostró que brinda el medio necesario para que conserven su fenotipo.

La colágena tipo II detectada se localizó en la zona pericelular del condrocitos en el gel de alginato y de acuerdo con Petit et al.(1996), en esta zona se encuentra un 95% de la colágena tipo II, lo cual representa un porcentaje similar al hallado en el cartílago articular hialino, pero una porción de ella se distribuye en el alginato acumulándose en la zona intercelular y territorial para formar una matriz extracelular. No se manifestó la síntesis de colágena tipo X, que es un marcador hipertrófico del cartílago, ni tampoco se detectó colágena tipo I, el cual es un marcador de dediferenciación del condrocito (Häuselmann et al., 1994).

Esto puede ser indicativo que en el gel de alginato el condrocito produce un ambiente semejante al del cartilago lo que pudiera ser muy interesante desde el punto de vista del estudio de la síntesis de la matriz extracelular (Benya y Shaffer, 1982; Aydelotte et al., 1991; Aydelotte et al., 1992; Buschmann et al., 1992; Rêdini et al., 1997), y los factores que puedan alterar dicho proceso en las enfermedades degenerativas, como la osteoartritis.

Ante estos resultados y empleando cartilago articular hialino de animales adultos se puede decir que esto es sólo una forma de mantenimiento fenotípico de los condrocitos y que es un buen medio para conservar su morfología típica y favorecer la producción de matriz ya que les provee un ambiente semejante a la de la matriz extracelular del cartilago debido a que el alginato está cargado negativamente al igual que ella (Häuselmann et al., 1994; Petit et al., 1996).

Si se deseara cultivar condrocitos sería conveniente extraer cartilago de animales más jóvenes ya que se observó, en experimentos posteriores, que al extraer cartilago de ratas más jóvenes se alcanzó un rendimiento en peso húmedo mayor al que se obtuvo de ratas adultas, esto podría ser favorable ya que reduciría el número de animales sacrificados.

En este sistema de mantenimiento de condrocitos es más fácil la recuperación de las moléculas específicas de cartilago para su análisis o cuantificación así como para estudiar a los condrocitos aislados, por medio de la adición de un agente quelante de calcio que hace reversible la gelificación del alginato (Kupchik et al., 1983; Guo et al., 1989).

10. CONCLUSIONES

La metodología planteada para la obtención de cartílago, aislamiento y mantenimiento de condrocitos de rata en geles de alginato produjo los resultados esperados.

Los condrocitos de rata adulta, mantenidos en geles de alginato, pueden emplearse en un período de tiempo que va de los 8 a los 15 días después de la encapsulación debido a que en este tiempo se conserva un porcentaje de células viables, además de que la morfología y el fenotipo es característico de los condrocitos.

El poder estudiar el ensamble y degeneración de la matriz extracelular de los condrocitos *in vitro*, brinda la posibilidad de conocer los mecanismos que originan las enfermedades degenerativas y de esta forma poder plantear una estrategia terapéutica que nos ayude a controlar este problema que ha venido en aumento al prolongar el tiempo de vida de las personas.

11. REFERENCIAS

1. Abyad A., and Boyer JT. (1992). Arthritis and aging. *Curr. Opin. Rheumatol.* 4:153-159.
2. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson JD. *Molecular biology of the cell.* 2nd ed. 1989. Garland Publishing Inc. USA.
3. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., and Watson JD. *Molecular biology of the cell.* 3er ed. 1994. Garland Publishing Inc. USA.
4. Althouse AL., Beck M., and Griffey E. (1989). Expression of the human chondrocyte phenotype *in vitro*. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 25:659-668.
5. Aydelotte MB., and Kuettner KE. (1988a). Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes.I. Morphology and cartilage matrix production. *Connect. Tissue Res.* 18: 205-222.
6. Aydelotte MB., Greenhill RR., and Kuettner KE. (1988b). Differences between subpopulations of cultured bovine articular chondrocytes.II. Proteoglycan metabolism. *Connect. Tissue Res.* 18:223-234.
7. Aydelotte MB., Schmid TM., Greenhill RR., Luchene L., Schumacher BL., and Kuettner KE. (1991). Synthesis of collagen by cultured bovine chondrocytes derived from different depths of articular cartilage. *Orthoped. Res. Soc. Trans.* 16: 26.
8. Aydelotte MB., Schumacher BL., and Kuettner KE. (1992). Heterogeneity of articular chondrocytes. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis* (ed. KE. Kuettner, R. Schleyerbach, JG Peyron y VC Hascall), pp 237-249, New York: Raven Press.
9. Bayliss MT., Venn M., Marouclas A., and Ali SY. (1983). Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage. *Biochem. J.* 209:387-400.
10. Beekman B., Verzijl N., Bank AR., von der Mark K., and TeKoppele MJ. (1997).

- Synthesis of collagen by bovine chondrocytes cultured in alginate; posttranslational modifications and cell-matrix interaction. *Exp. Cell Res.* 237:135-141.
11. Benya PD., Padilla SR., and Nimmi ME. (1977). The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III and type I trimer, but not type II. Verification by cyanogen bromide peptide analysis. *Biochemistry.* 16:865-872.
 12. Benya PD., and Shaffer JD. (1982). Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 30: 215-224.
 13. Binette F., Mc Quaid DP., Haudenschild DR., Yaeger PC., Mc Pherson JM., and Turbo R. (1998). Expression of a stable articular phenotype without evidence of hypertrophy by adult human articular chondrocyte *in vitro*. *J. Orthop. Res.* 16(2):207-216.
 14. Buckwalter AJ., Mankin JH., Myers RE and Sledge BC. (1998). Instructional course lectures handout cover. American Academy of Orthopaedic Surgeons 65th Annual Meeting. pp 1-20.
 15. Buschmann MD., Gluzband YA., Grodzinsky AJ., Kimura JH., and Hunziker EB. (1992). Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functionally extracellular matrix. *J. Orthoped. Res.* 10: 745-748.
 16. Cormack DH. *Histología de Ham.* 1988. 9^a. Edición. Harla. México. 400-417.
 17. Chacko S., Abbott SJ., Holtzer S., and Holtzer H. (1969). The loss of phenotype traits by differentiated cells. VI Behavior of the progeny of a single chondrocyte. *J. Exp. Med.* 130:417-442.
 18. Cheung HS., Harvey W., Benya PD., and Nimmi H. (1976). New collagen markers of depression synthesized by rabbit articular chondrocytes in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 68:1371-1378.
 19. Darnell J., Lodish H. and Baltimore. *Molecular cell biology.* 1986. Scientific American Books. USA. 852-853.

20. Deshmukh K., and Kline WG. (1976). Characterization of collagen and its precursors synthesized by rabbit articular cartilage cells in various culture systems. *Eur. J. Biochem.* 69:117-123.
21. Ershova OB., Bobylev V., and Novikova E. (1992). The prevalence of and risk factors for osteoporosis. *Ter. Arch.* 64:108-111.
22. Gibson G., Lin LD., and Roque M (1997) Apoptosis of terminally differentiated chondrocyte in culture. *Exp. Cell Res.* 233:372-382.
23. Grant GT., Morris ER., and Rees DA. (1973). Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. *FEBS Lett.* 32:195-198.
24. Guo J., Jourdian GW., and McCallum DK. (1989). Culture and grown characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. *Conn. Tiss. Res.* 19: 277-297.
25. Ham WA., and Cormack HD. *Tratado de Histología.* 8a. edición. Interamericana. 1984. México. 413-420, 517-532.
26. Häuselmann HJ., Aydelotte MB., Schumacher BL., Kuettner KE., Gitelis SH., and Thonar EJ-MA. (1992). Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultures in alginate beads. *Matrix.* 12: 116-129.
27. Häuselmann HJ., Fernandes RJ., Mok SS., Schmid TM., Block JA., Aydelotte MB., Kuettner KE and Thonar JMA. (1994). Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J. Cell Sci.* 107: 17-27.
28. Häuselmann HJ., Masuda K., Hunziker BE., Neidhart M., Mok SS., Michel AB., and Thonar AJM. (1996). Adult human chondrocyte cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am. J. Physiol.* 271:C742-C752.
29. Heinegard D., and Oldberg A. (1989). Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J.* 3:2042-2051.

30. Hirsch MS., Cook SC., Killiany R., and Svoboda KKH. (1996). Increased cell diameter precedes chondrocyte terminal differentiation, whereas cell-matrix attachment complex proteins appear constant. *The Anatomical Record*. 244:284-296.
31. Holtzer H., (1978). Cell lineages, stem cells and the quantal cell cycle concept. In stem cells. C. Lord, G. Potten and G. Cole eds. Cambridge, England. Cambridge University Press.
32. Horwitz AL., and Dorfman A. (1970). The growth of cartilage cells in soft agar and liquid suspension. *J. Cell Biol.* 45:434-438.
33. INEGI. <http://www.inegi.gob.mx/>
34. Karp G. *Cell biology*. 2nd ed. 1984. McGraw-Hill. USA. 232.
35. Kimura T., Hasui N., and Ohsawa S. (1984). Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long term cultures. *Clin. Orthop. Related*. 186:231-239.
36. Kourí JB., Jiménez SA., Quintero M., and Chico A. (1996a). Ultrastructural study of chondrocytes from fibrillated and non-fibrillated human osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage*. 4:111-125.
37. Kourí JB., Argüello C., Quintero M., Chico A., and Ramos ME. (1996b). Variability in the cell phenotype of aggregates or "clones" of human osteoarthritic cartilage. A case report. 20(3):191-200.
38. Kourí JB., Rosales-Encina JL., Chaudhuri PP., Luna J., and Mena R. (1997). Apoptosis in human osteoarthritic cartilage: a microscopy report. *Med. Sci. Res.* 25:245-248.
39. Kourí JB., Argüello C., Luna J., and Mena R. (1998). Use of microscopy techniques in the study of human chondrocytes from osteoarthritic cartilage: an overview. *Micros. Res. Tech.* 40:22-36.
40. Kuettner KE., Pauw UB., Gall G., Memoli VA and Schenk RK. (1982). Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro*. 1. Isolation, culture characteristics, and morphology. *J. Cell. Biol.* 93: 743-749.

41. Kupchick HZ., Langer RS., Haberman C., El Deriny S., and O'Brien M. (1983). A new method for the three-dimensional *in vitro* grown of human cancer cells. *Exp. Cell Res.* 147: 454-460.
42. Lemare F., Steimberg N., Le Griel C., Demington S., and Adolphe M. (1998). Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1 β . *J. Cellular Phys.* 176:303-313.
43. Levy E., Forme A., Perocheau D., and Bono Y. (1993). Socioeconomic cost of osteoarthritis in France. *Rev. Rheum. ed. Fr.* 60:63s-67s.
44. Manning WK., and Bonner WM Jr. (1967). Isolation of cultures of chondrocytes from human adult articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 10:235-239.
45. Mc Ateer T. and Davis S. *Basic Cell Culture. A Practical Approach.* 1994. Edited by JM. Davis. Part 3 "Culture media". Oxford University Press. pp 62.
46. Murray KR., Granner KD., Mayes AP., y Rodwell WV. *Bioquímica de Harper.* 13ª edición. 1994. El Manual Moderno. México. 757-772.
47. Nerby DP., Malemud CG., and Sokoloff L. (1977). Differences in the collagen types synthesized by lapine articular chondrocytes in spinner and monolayer culture. *Arthritis Rheum.* 20:709-716.
48. Nevo Z., Horwitz AL., and Dorfman A. (1972). Synthesis of chondromucoprotein by chondrocytes in suspension culture. *Dev. Biol.* 28:219-228.
49. Perka C., Spitzer RS., Lindenhayn K., Sittinger M., and Shultz O. (2000). Matrix-mixed culture: new methodology for chondrocyte culture and preparation of cartilage transplants. *J. Biomed. Mater. Res.* 49(3):305-311.
50. Petit B., Masuda K., D'Souza AL., Otten L., Pietryla D., Hartmann DJ., Morris NP., Uebelhart D., Schmid TM., and Thonar AJM. (1996). Characterization of crosslinked collagens synthesized by mature articular chondrocytes cultures in alginate beads: comparison of two distinct matrix compartments. *Experimental Cell Research.* 225:151-161.

51. Ramdi H., Legay C., and Lièvreumont M. (1993) Influence of matricial molecules on growth and differentiation of entrapped chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 207:449-454.
52. Raynal P., and Pollard BH. (1994). Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium-and phospholipid-binding proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 1197: 63-93.
53. Rêdini F., Min W., Demoor-Fossard M., Boittin M., and Pujol JP. (1997). Differential expression of membrane-anchored proteoglycans in rabbit articular chondrocytes cultured in monolayers and in alginate beads. Effect of transforming growth factor- β 1. *Biochem. Biophys. Acta* 1355: 20-32.
54. Sah RLY., Grodzinsky AJ., Plaas AHK and Sandy JD. (1992). Effects of static and dynamic compression on matrix metabolism in cartilage explants. In *Articular Cartilage and Osteoarthritis* (ed. KE. Kuettner, R. Schleyerbach, JG Peyron y VC Hascall), pp 373-392, New York: Raven Press.
55. Shakibaei M., and De Souza P. (1997). Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol. Int.* 2(2):75-86.
56. Shoichet SM., Li HR., White LR., and Winn RS. (1996). Stability hydrogels used in cell encapsulation: an *in vitro* comparison of alginate and agarose. *Biotechnol. Bioeng.* 50:374-381.
57. Srivastava VML., Malemud JC., Hough JA., Bland HJ and Sokoloff L. (1974). Preliminary Experience with cell culture of human articular chondrocytes. *Arthritis and Rheumatism.* 17(2): 165-169.
58. Thomas JT., and Grant ME. (1988). Cartilage proteoglycan aggregate and fibronectin can modulate the expression of type X collagen by embryonic chick chondrocytes cultured in collagen gels. *Biosci. Rep.* 8:163-171.
59. van Susante JLC., Buma P., van Osch GJVM., Versleyen D., van der Kraan PM., van der Berg WB and Homminga GN. (1995). Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop. Scand.* 66(6): 549-556.

12. APÉNDICE

PREPARACIÓN DE REACTIVOS

12.1.1. Solución salina fisiológica estéril (SSFE)

NaCl (J.T. Baker) 9 g
Agua bidestilada y desionizada cpb 1000 mL

Esterilización: calor húmedo 121°C, 115 lb de presión, 15 minutos.

Almacenarse a 4°C.

12.1.2. Mezcla alcohol 70%-benzal 1:1000

Alcohol (Holguín Industrial) 700 mL
Benzal (Farmacéuticos Altamirano) 100 mL
Agua bidestilada y desionizada cpb 1000 mL

12.1.3. Solución A

Glucosa (Merck) 1.8 g
KCl (J.T. Baker) 0.22 g
NaCl (J.T. Baker) 7.59 g
Na₂HPO₄ (J.T. Baker) 0.745 g
Rojo fenol 1% (In Vitro) 0.12 mL
Agua bidestilada y desionizada cpb 1000 mL

pH = 7.2-7.4

Esterilización: Filtración, membrana Millipore poro 0.22 µm

Almacenarse a 4°C.

12.1.4. Medio DMEM/F12 suplementado

Suero fetal bovino (Gibco BRL)	100 mL
Gentamicina 50 mg/mL (In Vitro)	5 mL
Anfotericina B 500 µg/mL (In Vitro)	2 mL
Ácido ascórbico (Sigma Chemical Co.)	25 mg
HEPES (Research Organics)	5.96 g
Medio DMEM/F12 (Gibco BRL)	cpb 1000 mL

pH = 7.2-7.4

Esterilización: Filtración, membrana Millipore poro 0.22 µm

Almacenarse a 4°C.

12.1.5. Solución de Tripsina 0.2%

Tripsina tipo I de pancreas de bovino (Sigma Chemical Co.)	0.02 g
Solución A estéril	10 mL

Prepararse en el momento de ser empleada.

12.1.6. Solución de colagenasa tipo II 0.2%

Colagenasa tipo II (Worthington)	0.02 g
Solución A estéril	10 mL

Prepararse en el momento de ser empleada.

12.1.7. Azul tripano 0.4%

Azul tripano (Sigma Chemical Co.).....	0.4 g
PBS	100 mL

Almacenarse a 4°C.

12.1.8. Solución de alginato de sodio 1.2%

Ácido algínico (Sigma Chemical Co.)	1.2 g
HEPES (Research Organics)	0.476 g
SSFE	cpb 100 mL

pH = 7.2-7.4

Esterilización: Filtración, membrana Millipore poro 0.22 μ m

Almacenarse a 4°C.

12.1.9. Solución de CaCl₂ 102 mM

CaCl ₂ (J.T. Baker)	14.997 g
HEPES (Research Organics)	4.76 g
SSFE	cpb 1000 mL

pH = 7.2-7.4

Esterilización: Filtración, membrana Millipore poro 0.22 μ m

Almacenarse a 4°C.

12.1.10. Citrato de sodio 55 mM

Citrato de sodio (J.T. Baker)	16.18 g
HEPES (Research Organics)	4.76 g
SSFE	cpb 1000 mL

pH = 7.2-7.4

Almacenarse a 4°C.

12.1.11. Búfer de cacodilatos 0.2 M- CaCl₂ 10 M

Ácido cacodílico (Sigma Chemical Co.)	13.8 g
CaCl ₂ (J.T. Baker)	0.735 g

Agua bidestilada y desionizada cpb 500 mL
pH = 7.2-7.4
Almacenarse a -20°C.

12.1.12. Búfer de cacodilatos 0.1 M- CaCl₂ 5 mM

Búfer de cacodilatos 0.2 M- CaCl₂ 10 M 250 mL
Agua bidestilada y desionizada cpb 500 mL
pH = 7.2-7.4
Almacenarse a 4°C.

12.1.13. Glutaraldehído 2.5%- CaCl₂ 5 mM

Glutaraldehído 25% (Merck) 10 mL
Búfer de cacodilatos 0.1 M- CaCl₂ 5 mM cpb 100 mL
Almacenarse a 4°C.

12.1.14. OsO₄ 1%-RHT 0.7%

OsO₄ 2% (Electron Microscopy Sciences) 5 mL
RHT (Aesar Johnson Matthey Inc.) 0.07 g
Búfer de cacodilatos 0.2 M- CaCl₂ 10 M cpb 10 mL
Prepararse en el momento de ser empleado.

12.1.15. Resina Spurr (Electron Microscopy Sciences)

- a) ERL 4206 (resina epóxica) 20 g
- b) DER 736 (flexibilizador) 12 g
- c) NSA (endurecedor) 52 g
- d) DMAE.1 (catalizador) 0.8 g

Pesar cada componente en el orden indicado por los incisos. Mezclar después de agregar cada componente. Alicuotar en jeringas de 20 mL. Almacenar a -20°C.

El etanol empleado para la mezcla con resina Spurr así como para las deshidrataciones fue adquirido en Merck.

12.1.16. Azul de toluidina 0.5%

Azul de toluidina (Polysciences Inc.)	0.5 g
Borax (Electron Microscopy Science)	1 g
Agua bidestilada y desionizada	cpb 100 mL

Calentar el agua, disolver el borax y el colorante sin dejar de mover hasta disolver los grumos, filtrar y almacenar en frasco ambar a temperatura ambiente.

12.1.17. Solución saturada de acetato de uranilo.

Acetato de uranilo (J.T. Baker).....	5 g
Agua bidestilada y desionizada	cpb 100 mL

En un vaso de precipitados con agitador magnético se colocan los reactivos. Se agita hasta que se disuelva la mayor parte del reactivo. Guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.

12.1.18. Citrato de plomo Reynolds

Nitrato de plomo (J.T. Baker).....	1.33 g
Citrato de sodio (J.T. Baker)	1.76 g
Hidróxido de sodio 1 N	8 mL
Agua bidestilada y desionizada	cpb 50 mL

En un vaso de precipitado colocar el nitrato de plomo, el citrato de sodio y 30 mL de agua. Agitar constantemente durante un minuto. Agregar gota a gota los 8 mL de NaOH 1 N (la solución se tomará clara). Continuar con la agitación. Aforar a 50

mL. Guardar en frasco ambar a temperatura ambiente.

12.1.19. Paraformaldehído 4%- CaCl₂ 5 mM

Paraformaldehído (J.T. Baker)	4 g
CaCl ₂ (J.T. Baker)	0.735 g
Hidróxido de sodio 1 N	8 mL
Agua bidestilada y desionizada	cpb 100 mL

El agua se pone a calentar a un temperatura menor a 60°C. agregar el paraformaldehído. Agitar constantemente y mantener la temperatura. Agregar gota a gota el NaOH 1 N hasta que la solución sea clara. Filtrar con papel filtro Whatman # 50.

12.1.20. Búfer de Tris-HCl

Tris-HCl 10 mM (USBiochemical)	1.576 g
NaCl 0.14 M (J.T. Baker)	8.182 g
CaCl ₂ (J.T. Baker)	0.735 g
Agua bidestilada y desionizada	cpb 1000 mL

pH = 7.2-7.4

Almacenarse a 4°C

12.1.21. Solución de sacarosa 20%

Sacarosa (Merck)	20 g
PBS 10X	10 mL
Agua bidestilada y desionizada	cpb 100 mL

pH = 8.0

Almacenarse a 4°C

12.1.22. Portaobjetos cubiertos con gelatina tipo A

Gelatina tipo A (Ted Pella) 0.5 g
Sulfato de cromo-potasio (Merck) 0.05 g
Agua bidestilada y desionizada cpb 100 mL

Calentar agua a 60°C o menos. Añadir la gelatina, mezclar hasta que se disuelva. Agregar el sulfato de cromo-potasio. Continuar mezclando. Introducir los portaobjetos en la solución, sacarlos y dejarlos secar 5 minutos en microondas, a 60°C durante una hora o bien a temperatura ambiente toda la noche.

12.1.23. Solución de hialuronidasa 0.05%

Hialuronidasa testicular bovina (Sigma Chemical Co.) 0.001 g
Búfer de Tris-HCl 1 mL

Para obtener la concentración deseada hacer una dilución 1:2 con el búfer de Tris-HCl.

Prepararse en el momento de ser empleada.

12.1.24. Albúmina sérica bovina 0.2%-Tritón X-100 0.02% (Búfer de bloqueo)

Albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co.)..... 0.02 g
(libre de IgG y baja en endotoxinas)
Tritón X-100 (Sigma Chemical Co.) 2 µL
Búfer de Tris-HCl cbp 10 mL

Almacenarse a 4°C

12.1.25. Anticuerpo primario dil. 1:25

IgG de conejo anticolágena tipo II
(RaB Biochemical)..... 10 µL

Búfer de bloqueo 240 μ L

Prepararse en el momento de ser empleado.

12.1.26. Anticuerpo secundario dil. 1:60

IgG de cabra anti IgG de conejo marcado con FITC 4.2 μ L
(Vector)

Búfer de bloqueo 245.8 μ L

Prepararse en el momento de ser empleado.

12.1.27. Solución de yoduro de propidio 10 μ g/mL

Yoduro de propidio (Sigma Chemical Co.) 10 mg

PBS 10 mL

Para obtener la concentración deseada, realizar una dilución 1:1000 con PBS.

Guardar a 4°C a resguardo de la luz.

12.1.28. Búfer de fosfatos salina (PBS) 10X

NaCl (J.T. Baker) 82 g

NaH₂PO₄ (J.T. Baker) 4.3 g

Na₂HPO₄ (J.T. Baker) 17.4 g

Agua bidestilada y desionizada cpb 1000 mL

pH = 7.2-7.4

Para obtener PBS 1X realizar una dilución 1:10 de ésta solución.

Almacenarse a 4°C.