



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA
REPARACIÓN EXPERIMENTAL DE LESIONES DE CARTÍLAGO
ARTICULAR EMPLEANDO TÉCNICAS DE INGENIERÍA DE
TEJIDOS Y DE TERAPIA GÉNICA

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARÍA MASRI DABA

TUTOR:

DR. LEOPOLDO HENRI PAASCH MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORAL:

DRA. HILDA VILLEGAS CASTREJÓN

DR. FRANCISCO TRIGO TAVERA

DR. CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN

MÉXICO, D.F.

2006

DECLARACIÓN



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.

El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que la presente tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

MARÍA MASRI DABA

DEDICATORIAS

A mi hija Renée, Saby y el Chicha-rrin....Con todo mi amor
A mi mamá....Por todo su amor y esfuerzo
A mi papá....Con cariño, descanse en paz
A mí amado Lalo.... Por su apoyo, amor e incondicionalidad
A Clemente Ibarra....Entusiasta incansable
Al Dr. Paasch..... Gracias

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM
A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia FMVZ
Al Instituto Nacional de Rehabilitación INR, Sector Salud

Y a los que a continuación menciono:

Dr. Leopoldo Paasch – Tutor y Responsable del proyecto PAPIIT-UNAM

Dra. Hilda Villegas Castrejón - Comité Tutorial INR

Dr.C. Francisco Trigo Tavera – Comité Tutorial FMVZ

Dr. José Clemente Ibarra Ponce de León – Comité Tutorial INR

Dr. Germán Lombardero – Colega y motor del proyecto

Dr. Pedro G. Ive - Cirujano

Dr.C. Luís Guillermo Ibarra – Director del INR

Dr. Antonio Verdugo, Dr.C. Francisco Basurto y su personal del Laboratorio

de Microbiología Molecular

Biol. Rocío Gaytán - Laboratorio Ingeniería de Tejidos, INR

Dr.C. Francisco Martínez Flores - Departamento de Morfología INR

Biol. Valentín Martínez - Laboratorio de Ingeniería de Tejidos INR

Ing. MSc. Ivette Quiñones - Ingeniería Biomédica INR

MVZ Hugo Lecona y su personal de Servicio Social - Bioterio INR

Dra. Eréndira Estrada, Dr. Ricardo Delgado y Técnicos: Enrique y Nayeli - Departamento de

Patología INR

Investigadores Rosario, Lily y Alma - Departamento de Morfología INR

Drs.: Pérez Jiménez, Almazán, Encalada, Cruz y Vero - Servicio de Artroscopía INR

Dr. Alejandro Sigler y Dr. Omar Ortiz, Anestesiólogos y amigos

Clínicos, Residentes y demás personal - Departamento Equinos, FMVZ

Estudiantes: Honorarios, PPS, Estancias, Especialidad, Servicio Social - Depto. Equinos FMVZ

Dra. Aline Schuneman, Dr. Horacio Chavira y Dr. Mariano Hernández y su personal de DS-ILPH

Rosalba y Mi negro

A mis Profesores, a mis compañeros Oscar, Jorge y Ricardo

A mis Hermanos y a mis Amigos...

Este trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Clemente Ibarra Ponce de León,
M. en C. Cristina Velasquillo
Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del
Instituto Nacional de Rehabilitación.

**Financiamiento parcial del proyecto Salud 2003-C01-98 auspiciado por el
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y con el apoyo de los fondos para
investigación otorgados por el Instituto Nacional de Rehabilitación.**

**Financiamiento parcial del proyecto IN207101 de la Dirección General de
Asuntos del Personal Académico
Programa de Apoyo a proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica
(PAPITT).**

TABLA DE CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA	1
II. HIPÓTESIS	10
III. OBJETIVO GENERAL	11
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
V. JUSTIFICACIÓN	13
VI. MATERIAL Y MÉTODO	14
6.1 Estandarización del cultivo de condrocitos autólogos	14
6.2 Evaluación morfológica del cultivo celular	16
6.3 Evaluación de viabilidad del cultivo	16
6.4 Evaluación molecular del cultivo	18
6.4.1 RT-PCR	19
6.5 Cultivo tridimensional	21
6.5.1 PGA	21
6.5.2 PGLA	22
6.5.3 Colágena	23
6.5.4 Encapsulamiento de polímeros	24
6.5.5 Microscopia electrónica de barrido	25
ambiental (ESEM)	
6.6 Transplante del constructo de PGA y condrocitos de caballo	

en ratones atímicos	26
6.7 Estandarización de las técnicas histológicas e histoquímicas	26
6.7.1 Tinción de hematoxilina – eosina (Figura 8)	27
6.7.2 Tinción con safranina-O (Figura 9)	27
6.7.3 Tinción tricrómica de Masson	28
6.7.4 Tinción con azul alciano, pH 1.0	29
6.7.5 Sistema de calificación, para la evaluación histológica del tejido de reparación (Mainil-Varlet, 2003)	30
6.8 Desarrollo de la técnica artroscópica	30
6.9 Animales experimentales	32
6.9.1 Manejo individual	33
6.9.2 Protocolo de anestesia	34
6.9.3 Procedimiento quirúrgico artroscópico para obtener cartílago	34
6.9.4 Implantación artroscópica del constructo	37
6.9.5 Cuidados y manejo posoperatorio	40
6.10 Evaluación artroscópica	40
6.11 Obtención del tejido de neoformación	43
6.12 Procesamiento de las muestras de tejido de reparación.	43
6.13 Análisis estadístico	43
VII. RESULTADOS	44
7.1 Evaluación del cultivo de condrocitos autólogos	44
7.2 Evaluación molecular del cultivo de condrocitos autólogos	45

7.3	Determinación de la adhesión celular a los polímeros	45
7.4	Trasplante del constructo de PGA y condrocitos de caballo en ratones atímicos.	46
7.5	Evolución clínica de los animales experimentales	47
7.6	Evaluaciones artroscópicas	48
7.7	Evaluación histológica del tejido de reparación	57
7.8	Transplante <i>in vivo</i> células infectadas con AdGFP	63
VIII.	DISCUSIÓN	66
IX.	CONCLUSIONES	70
X.	REFERENCIAS	71
	ANEXO I	84
	ANEXO II	86
	ANEXO III	90
	Situación actual de la reparación condral en el equino	106
	Matrix-encapsulation Cell-seeding Technique to Prevent Cell Detachment During Arthroscopic Implatation of Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implatation (MACI)	111

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1** (a) Constructo en microscopia de contraste de fases (4X) y (b) Viabilidad celular del constructo detectada mediante fluorescencia verde mediante calceína-AM y hemodímero de etidio, bajo el microscopio óptico de fluorescencia invertida (4X) (Carl Zeiss Microimaging, 17 Thornwood, New York).
- Figura 2** Células en cultivo de monocapa de primer pase tratadas con LIVE/DEAD ® Kit para determinar 18 viabilidad del cultivo (20x).
- Figura 3** Disco de PGA de 8 x 0.5 mm las fibras son de 15 µm de diámetro con una distancia interfibrilar de 100 a 200 µm (Albany International, Albany, NY). 21
- Figura 4** Segmento de PGA y células evaluadas bajo ESEM (1100x) Spot 4.4, GSE. WD 9.5. 22
- Figura 5** PGLA después de 3 inmersiones en PLA. 23
- Figura 6** Tres discos de colágeno tipo I (SIS) de 8 mm de diámetro. El disco central está cubierto de células de 24 segundo pase.

Figura 7	(a) PGLA y 2×10^7 células. Procedimiento para separar las células y la matriz extracelular del fondo de la caja de cultivo con pinzas quirúrgicas (b) Constructo de PGLA de 7 días previo a su implantación.	45
Figura 8	Tinción H&E de placa de crecimiento del carpo de potrillos (10x)	27
Figura 9	Tinción de safranina O de placa de crecimiento del carpo de potrillos (10x)	28
Figura 10	Tinción tricrómica de Masson de placa de crecimiento del carpo de potrillos (10x)	28
Figura 11	Tinción de azul alciano en placa de crecimiento del carpo de potrillos (10x)	29
Figura 12	Sistema de fijación para prácticas artroscópicas utilizado en este estudio.	31
Figura 13	Dibujo de accesos quirúrgicos para la obtención de muestras osteocondrales de la articulación fémoro patelar (Adaptación de McIlwraith, 1996 y Lombardero, 2004).	36
Figura 14	Se utilizó una broca de acero inoxidable de 2.4 mm de diámetro (Mitek. MA, EUA), la cual sirvió para realizar un orificio de 15 mm de profundidad en el hueso subcondral	

	mm de profundidad en el hueso subcondral.	38
Figura 15.	Cánula y camisa roma diseñada en el INR por el Departamento de Ingeniería Biomédica para la inserción y fijación del constructo.	39
Figura 16	(a) Constructo perforado con dos agujas para dejar pasar la sutura absorbible para anclarlo al defecto condral creado experimentalmente. (b) Paso del constructo a través de la cánula.	39
Figura 17	Viabilidad celular del constructo de PGLA encapsulado con 15×10^6 células tratadas con Live and Dead® Kit bajo el microscopio óptico de fluorescencia invertida (10x) (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, New York).	44
Figura 18	RT-PCR de cultivo de condrocitos en monocapa de segundo pase con iniciadores de colágena tipo II y agregano	45
Figura 19	(a) Adhesión entre las fibras del constructo y las células autólogas cultivadas. ESEM (Spot 5.0, magnificación 355x, GSE 7.0, 3.9 Torr). (b) Degradación prematura del polímero al día 7 (Spot 5.0, magnificación 1200x, GSE 7.0, 3.9 Torr).	46
Figura	Tejido de neoformación subcutáneo en ratón atímico a	

20 partir la implantación de condrocitos de caballo sembrados en PGA. (a) Safranina O(10x) tejido morfológicamente compatible con cartílago, (b) tricrómica de Masson (10x) tejido morfológicamente compatible con cartílago, (c) safranina O (100x) condroblastos activos, (d) tricrómica de Masson (100) condroblastos activos (e) MET (2550x) condroblastos activos rodeados de fibrillas de colágena, y (f) MET (3700x) condroblasto activo, nótese la abundancia de **47** retículo endoplásmico rugoso.

Figura Figura que muestra la imagen artroscópica de un **21** implante de PGLA calificado como (0 = sumido) respecto al nivel de reparación a la superficie articular **49** en el Sistema de Oswestry.

Figura La integración del implante de PGLA encapsulado al **22** tejido adyacente es Incompleta pero mayor al 25%, lo que la califica como 1 en el sistema de Oswestry. **50**

Figura Apariencia de la superficie del control condral el cual **23** es moderadamente irregular equivalente a 1 en el sistema de Oswestry. **50**

- Figura 24** Implante de colágena encapsulada con tonalidad amarilla correspondiente a 0 en el sistema de Oswestry. Nótese la sutura reabsorbible aun presente a las 4 semanas de implantado. **51**
- Figura 25** Defecto osteocondral sometido a evaluación de rigidez en el sistema de Oswestry por medio de un gancho palpador. **51**
- Figura 26** Control condral que muestra tejido de reparación conjuntivo fibroso equivalente a 0 para valoración morfológica de acuerdo con el Sistema de Mainil-Varlet (H&E 20x). **58**
- Figura 27** Implante de PGLA encapsulado con poca afinidad a la tinción de Safranina-O que corresponde a 0 en la evaluación en el Sistema de Mainil-Varlet (Safranina-O 20x). **58**
- Figura 28** (a) Control condral con extrema irregularidad de la superficie equivalente a 0 en el Sistema de Mainil-Varlet (H&E 40x). (b) PGLA encapsulado que presenta una superficie cercana a la normal equivalente a 2 en el Sistema de Mainil-Varlet (H&E 40x). **59**
- Figura** (a) control condral sin tejido de reparación integrado al

- 29** tejido subyacente que corresponde a 0 en el Sistema de Mainil-Varlet (Tricrómica de Masson, 40x). (b) PGLA encapsulado adherido al tejido subyacente que corresponde a 1 en el Sistema de Mainil-Varlet **60** (Tricrómica de Masson, 40x).
- Figura** Microscopía de fluorescencia confocal. La imagen **30** demuestra la fluorescencia verde de las células obtenidas del tejido marcado con AdGFP *in vivo* a las 4 semanas después de la implantación a (160x). **64**
- Figura** Se observan simultáneamente las señales **31** fluorescentes del AdGFP (verde) y del pigmento del MitoTracker (rojo) observados en microscopía confocal de laser (Plan Neofluar 40X/1.30 aceite. Excitación de luz azul [488 nm, 40%]. División del rayo **65** MBS: HFT UV/488/543/633).
- Figura** a) Implantación quirúrgica subcutánea de condrocitos **32** de caballo en ratones atímicos. b) implante subcutáneo antes de ser evaluado a las 4 semanas. **85**
- Figura** Histograma del porcentaje de células de caballo en **33** cultivo infectadas con Ad-GFP. Se presentan con color

gris las células no infectadas o control, en rosa las células infectadas con 25 moi y en verde las 87 infectadas con 50 moi.

Figura a) Evidencia de Ad-GFP en las células previamente a
34 ser colocadas en el polímero. (CLSM 40x), b) células adheridas al PGLA observadas en me microscopio de fluorescencia de contraste de fases (40x). 88

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Iniciadores utilizados en RT-PCR (Oligonucleotidos).	20
Tabla 2	Todas las observaciones histológicas fueron calificadas cuantitativamente.	30
Tabla 3	Todas las observaciones artroscópicas fueron calificadas cuantitativamente de acuerdo con la tabla de Oswestry.	41
Tabla 4	Todas las observaciones artroscópicas fueron calificadas cuantitativamente de acuerdo con la tabla de ICRS.	42
Tabla 5	Promedios y errores estándar para el nivel del tejido de reparación con respecto a la superficie articular (Oswestry).	52
Tabla 6	Promedios y errores estándar para la integración del tejido de reparación con el cartílago adyacente (Oswestry).	52
Tabla 7	Promedios y errores estándar para evaluar la apariencia macroscópica del tejido de reparación	53

(Oswestry).

Tabla 8	Promedios y errores estándar para evaluar el color del implante (Oswestry).	53
Tabla 9	Promedios y errores estándar para evaluar la rigidez del implante al tacto (Oswestry).	54
Tabla 10	Promedios y errores estándar para calificar la suma de evaluaciones del tejido de reparación (Oswestry).	54
Tabla 11	Promedios y errores estándar para valorar el grado de reparación del defecto (ICRS).	55
Tabla 12	Promedios y errores estándar para valorar la integración al cartílago adyacente (ICRS).	55
Tabla 13	Promedios y errores estándar para valorar la apariencia macroscópica del tejido de reparación (ICRS).	56
Tabla 14	Promedios y errores estándar para calificar la suma de los parámetros evaluados (ICRS).	56
Tabla 15	Promedios y errores estándar para valorar el grado de reparación del tejido de nueva formación (ICRS).	57

Tabla 16	Promedios y errores estándar de la valoración de la morfología del tejido de reparación.	60
Tabla 17	Promedios y errores estándar de la valoración de la afinidad por la tinción por medio de la evaluación histológica del tejido de reparación.	61
Tabla 18	Promedios y errores estándar de la valoración de la arquitectura del tejido de reparación.	61
Tabla 19	Promedios y errores estándar de la valoración de la integración del tejido de reparación.	62
Tabla 20	Promedios y errores estándar de la suma de los parámetros histológicos evaluados del tejido de reparación.	62

RESUMEN

Objetivo: El propósito del estudio fue la reparación de lesiones experimentales de cartílago articular creados quirúrgicamente en la articulación fémoropatelar de caballos jóvenes, mediante artroscopía con condrocitos autólogos, cultivados *in vitro* y sembrados en polímeros de ácido poliglicólico, ácido poliláctico (PGLA) y colágena.

Métodos: Se utilizaron 20 caballos formando 3 grupos experimentales. a) Grupo 1: 6 caballos implantados con constructo de células y PGLA. b) Grupo 2: 6 caballos implantados con un constructo de PGLA encapsulado con células y matriz extracelular. c) Grupo 3: 6 caballos implantados con un constructo de colágena encapsulada con células y matriz extracelular. Así mismo, se evaluaron caballos control (lesión condral y perforación en hueso subcondral al centro del defecto) y defectos osteocondrales (sitios donadores de cartílago y hueso para el cultivo). Dos caballos fueron implantados con un constructo de condrocitos autólogos transfectados con Ad-GFP, para verificar la presencia de las células implantadas en el tejido de reparación. Los discos de polímero con células fueron implantados artroscópicamente y fijados al hueso subcondral con anclas biodegradables con sutura. Después de 8 semanas (6 caballos) y 6 meses (12 caballos) el tejido de reparación fue evaluado artroscópicamente usando los criterios de la ICRS y de Oswestry. Dos biopsias osteocondrales por caballo fueron estudiadas histológicamente usando las tinciones de hematoxilina y eosina, safranina-O y tinción tricrómica de Masson, para evaluar la morfología, la presencia de proteoglicanos y de colágena en el tejido de reparación, así como la integración al cartílago de la periferia.

Resultados: Todos los especímenes obtenidos demostraron la presencia de tejido de reparación en la zona de la lesión experimental. En los grupos experimentales se encontró tejido de significativamente mejor calidad que en los controles considerando todos los parámetros evaluados. Los discos de PGLA encapsulados con células y matriz extracelular dieron lugar a la formación de tejido de mejor calidad dentro de los grupos experimentales.

Conclusiones: Las lesiones experimentales de cartílago articular en caballo pudieron ser reparadas con tejido parecido a cartílago mediante el implante artroscópico de condrocitos autólogos sembrados en polímeros biodegradables.

PALABRAS CLAVE: CABALLO, REPARACIÓN DE CARTÍLAGO, ARTROSCOPIA, CONDROCITOS AUTÓLOGOS, INGENIERÍA DE TEJIDOS.

ABSTRACT

Objective: The purpose of this study was to repair experimental articular cartilage lesions in young horses by arthroscopic implantation of autologous chondrocytes expanded in vitro and seeded onto polyglycolic / polylactic acid (PGLA) and collagen scaffolds.

Methods: Twenty horses were used, divided into three groups. a) Group 1: 6 horses implanted with a chondrocytes seeded onto PGLA discs. b) Group 2: 6 horses implanted with a PGLA disc encapsulated with a chondrocyte monolayer. c) Group 3: 6 horses implanted with a collagen disc encapsulated with a chondrocyte monolayer. Controls (cartilage lesions with a drill hole in the subchondral bone) and osteochondral defects (donor sites) were also evaluated. Two additional horses were implanted with a construct of autologous chondrocytes transfected with AdGFP vector to verify the presence of autologous chondrocytes in the repair tissue. The cell-polymer constructs were implanted arthroscopically and fixed to the subchondral bone with biodegradable suture anchors. After 8 weeks (6 horses) and 6 months (12 horses) repair tissue was evaluated by arthroscopy using the ICRS and Oswestry's criteria. Two punch biopsy specimens per horse were evaluated histologically using H&E, safranin-O and trichrome stains. To assess morphology, and to determine the presence of proteoglycans, collagen, and to evaluate integration to the surrounding cartilage.

Results: All specimens retrieved showed the presence of repair tissue within the experimental lesions. Experimental groups showed significantly better tissue quality under all parameters evaluated than controls. Encapsulated PGLA constructs showed the best tissue characteristics between experimental groups.

Conclusions: Experimental cartilage lesions in horses were repaired with cartilage-like tissue by arthroscopic implantation of autologous chondrocytes seeded onto biodegradable scaffolds.

KEY WORDS: HORSE, CARTILAGE RESURFACING, ARTHROSCOPY, AUTOLOGOUS CHONDROCYTE, TISSUE ENGINEERING.

I. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

Las lesiones traumáticas del cartílago articular predisponen al desarrollo de osteoartritis (OA), conocida también como artrosis o enfermedad articular degenerativa (1-5). La enfermedad articular es la causa más importante de desecho del caballo de uso deportivo y una de las pérdidas económicas de más impacto en la industria equina (6, 7). Se ha calculado que el 60% de las claudicaciones de los caballos de uso deportivo están relacionadas con osteoartritis (8, 9), de donde se deriva la importancia del desarrollo de alternativas de tratamiento, tanto médico como quirúrgico. Actualmente la osteoartritis constituye un problema significativo no sólo en caballos, sino también en la medicina humana por lo que la investigación de mejores técnicas para la reparación del cartílago articular es prioritaria. (10, 11).

El cartílago articular tiene una limitada capacidad natural de reparación intrínseca, por lo que los defectos se reparan con tejido extrínseco de neoformación (12, 13). El tejido de reparación consiste en tejido fibroso o fibrocartílago, el cual es biomecánicamente inferior al cartílago hialino y se deteriora rápidamente cuando se somete a un ejercicio continuo (14). En México no existen datos epidemiológicos sobre la incidencia, prevalencia e impacto económico de las lesiones articulares y la osteoartritis; sin embargo es posible considerar que todos los caballos que están participando en las diferentes funciones deportivas como salto de obstáculos, adiestramiento, carreras o charrería, están predispuestos a padecer una enfermedad articular degenerativa.

Existen numerosos tratamientos con resultados variables, tanto médicos como quirúrgicos, para la enfermedad articular (15). El avance que se ha logrado en la investigación de los problemas inflamatorios articulares se debe a las investigaciones básicas de enfermedad articular en animales de laboratorio. Sin embargo, los estudios realizados en articulaciones de caballo *in vitro*, han contribuido con aportaciones de vanguardia para el tratamiento de estos problemas (16-22).

Las lesiones traumáticas en las articulaciones pueden ser de diferentes tipos y grados, pero todas afectan primordialmente al cartílago articular (23-25). Se han postulado diferentes hipótesis sobre las causas por las cuales las lesiones de espesor parcial del cartílago articular no sanan. Al respecto, Hunziker y sus colaboradores (26) puntualizaron que la naturaleza no vascular del cartílago lo aísla de los vasos sanguíneos, los cuales juegan un papel fundamental en el proceso de cicatrización. Consecuentemente, la superficie de cartílago lesionada se encuentra aislada de los elementos provenientes del tejido conectivo que participa en el proceso de reparación en otras localizaciones anatómicas (macrófagos, células endoteliales, células mesenquimatosas, etc.) (26).

Los proteoglicanos, como el dermatán sulfato presentes en el cartílago articular, actúan como agentes que evitan la adhesividad tisular, disminuyendo la capacidad de reparación del cartílago en la superficie de la lesión (22, 27-30). También se estableció que el

líquido sinovial tiene propiedades que inhiben la proliferación de los condrocitos *in vitro* (22, 31-33). Sin embargo, aún no se ha determinado el papel que desempeña la presencia del líquido sinovial y algunos de los componentes de la matriz extracelular en la zona de la lesión *in vivo* ni en la capacidad de reparación del cartílago.

Las lesiones articulares son comunes en los caballos de uso deportivo, se tratan convencionalmente y en los casos severos, los tratamientos son prolongados y de alto costo. Evidentemente, se requieren nuevos procedimientos para abordar el problema en forma mas adecuada (34).

En la práctica clínica es indispensable desarrollar la capacidad para definir el curso de la enfermedad, su localización y distribución, si hay presencia de osteoartritis, o si el cartílago se encuentra en fase degenerativa para poder determinar la terapia adecuada. El presente trabajo está orientado específicamente a lesiones focales osteocondrales o de cartílago, localizadas en zonas de fricción en el fémur distal. La terapia para todo este tipo de lesiones se fundamenta en: a) la estimulación de la proliferación celular de la médula ósea como en el caso de la artroplastía por abrasión, perforación subcondral y las técnicas de micro fractura; b) los injertos osteocondrales (mosaicoplastía) y c) la implantación de condrocitos autólogos o células pluripotenciales con tendencia a la diferenciación hacia condrocitos.

Es necesario realizar un análisis objetivo de los tratamientos disponibles para la reparación de cartílago, a fin de determinar las expectativas de curación mediante el uso de estas terapias. En la práctica veterinaria, la lesión de cartílago, la fase degenerativa y la osteoartritis son problemas comunes que afectan a la mayoría de caballos deportivos. Todavía no hay cura para la osteoartritis y no se ha demostrado que exista un tratamiento para detener el incremento progresivo de los signos de esta enfermedad (35).

El examen artroscópico del cartílago y de las estructuras articulares sigue siendo el método de elección para evaluar las lesiones que no se pueden detectar mediante el uso de otras modalidades de imagen y además provee información valiosa en cuanto al pronóstico de las lesiones. Aún cuando hay una gran variedad de técnicas avanzadas de imagen utilizadas para el diagnóstico en medicina humana, que ya han sido implementadas en el caballo, todavía existen limitaciones importantes como la escasa resolución y la fuerza limitada del magneto que no hacen posible el uso de resonancia magnética en el caballo por arriba de la región del menudillo. En muchos casos, las lesiones de cartílago articular son mas extensas que lo que se puede predecir por medio del examen clínico y los métodos diagnósticos de rutina. En los últimos 10 años, la artroscopia diagnóstica ha ganado aceptación en Medicina Veterinaria, por lo que ahora, muchas condiciones se pueden diagnosticar, especialmente las que ocurren en la región de la babilla. Por ejemplo; en erosiones condrales donde el hueso subcondral está intacto, se ha tenido éxito con técnicas de micro fractura que permiten abarcar hasta

el cartílago calcificado sin afectar el hueso subcondral, dejando intacta la capacidad para inducir reparación (36). Esta técnica es especialmente conveniente, porque no requiere capacidades quirúrgicas especiales ni instrumental especializado. Entre las técnicas que se han empleado tanto en el caballo como en el humano, se utilizan incisiones abiertas en vez de plataformas artroscópicas que son menos invasivas.

Los procedimientos de estimulación de médula ósea se han diseñado para permitir que las células mesenquimatosas tengan acceso a la zona lesionada. Se cree que estas células, tienen potencial condrogénico y por eso son capaces de reparar. Estos procedimientos son simples y poco invasivos si se llevan a cabo por medio de artroscopia. El común denominador de estas técnicas es que el fibrocartílago recubra el defecto óseo lo más rápido posible al establecer un puente de continuidad entre el tejido vascular y la lesión. Sin embargo, el tejido de reparación es histológicamente diferente al cartílago articular (37, 38), por lo que la reparación es defectuosa (37-40). Se ha descrito en diferentes estudios que el fibrocartílago tiene propiedades biomecánicas inferiores a las del cartílago articular (24, 37, 39-41). Mas aún, es frecuente que el nuevo tejido de reparación no se integre a la zona adyacente de cartílago normal, debido a las propiedades anti-adhesivas de la matriz extracelular del cartílago. Estas limitaciones han inducido el desarrollo de otros procedimientos para mejorar los resultados (27, 30, 31, 42-46).

En la década de los años 50, Haggart y sus colaboradores abordaron el tratamiento de la osteoartritis sintomática de la rodilla en humanos mediante la resección quirúrgica del cartílago fragmentado y los osteofitos. Los pacientes tuvieron una evidente mejoría clínica (47-49). En 1959, Pridie describió la técnica para realizar perforaciones en el hueso subcondral esclerótico en rodillas osteoarthriticas y así estimular la formación de fibrocartílago sobre el área desnuda (23, 36). Mas tarde, Insall (46) y De Palma (47) obtuvieron resultados clínicos satisfactorios con el uso de perforaciones subcondrales. Este mismo procedimiento se llevó a cabo en caballos con resultados variables dependiendo de la localización de las lesiones pero en todos los casos se consiguió la formación de fibrocartílago que se adhirió al hueso subcondral. (50-57).

Con el advenimiento de la artroscopia en 1986, Lanny Johnson (58) describió el uso de una fresa motorizada para realizar la "artroplastía por abrasión", que consistía en remover la capa más superficial y esclerótica del hueso subcondral para estimular el sangrado hacia el defecto experimental y, de esta forma, conseguir la formación de fibrocartílago en la zona de la lesión (59-61). Más recientemente, Menche *et al* (58) publicaron un estudio comparativo entre la artroplastía por abrasión y el uso de perforaciones, en un trabajo experimental en conejos. Aun cuando el uso de perforaciones dio resultados iniciales aparentemente superiores, en ambas técnicas no se obtuvieron resultados adecuados después de 24 semanas de acuerdo con las evaluaciones morfológicas e histológicas (62-64).

Hay una gran cantidad de publicaciones relacionadas con el tratamiento quirúrgico de la enfermedad articular en la última década, que en realidad no aportan nuevas técnicas y que abordan el problema bajo los mismos criterios. Las técnicas para modular la reparación en el caballo incluyen: curetaje (65), condrectomía parcial, perforaciones subcondrales (66), artroplastía por abrasión (52), injertos de periostio (67, 68) o de cartílago esternal (69), aloinjertos y autoinjertos osteocondrales (70, 71), microfracturas (36, 72-75), mosaicoplastía (76, 77) y recientemente, autoinjertos de condrocitos (18, 22, 78).

El uso de aloinjertos osteocondrales para la reparación de grandes lesiones cartilaginosas, ha tenido aparentemente resultados clínicos satisfactorios a corto y mediano plazo. Sin embargo, existen riesgos de falla mecánica del tejido implantado, transmisión de enfermedades infecciosas y reacción inmunológica de rechazo (79-82).

Recientemente se ha experimentado con el uso de autoinjertos osteocondrales obtenidos de zonas de aparente carga mínima de la misma articulación (83, 84). Sin embargo, se ha demostrado que las zonas donadoras están sujetas a fuerzas mayores a las previstas por lo que quedan vulnerables a las presiones y fuerzas de tensión (41, 85). Además, el cartílago de los injertos y el de la periferia del defecto, sufren cambios degenerativos y generalmente no se integran. Cabe mencionar que también se alteran las propiedades biomecánicas del cartílago de dichos injertos y, en muchos de los casos, la superficie

articular de la meseta tibial opuesta se lesiona por la incongruencia de la superficie de los injertos y la de la periferia de la lesión (86). Los implantes de injertos osteocondrales en caballos se consideran como opción quirúrgica en quistes subcondrales en el cóndilo medial del fémur, cuando los tratamientos convencionales han fallado. Este procedimiento se lleva a cabo a través de una pequeña artrotomía y los injertos osteocondrales se obtienen a partir de la tróclea lateral del fémur (87).

En 1994, Britberg *et al.* (77) describieron el uso de condrocitos autólogos cultivados *in vitro*, inyectados en defectos profundos del cartílago de la rodilla bajo un parche de periostio, obtenido de la tibia proximal durante el mismo procedimiento (88-90). Aún cuando algunos de los informes sobre el resultado clínico a corto y mediano plazo parecen ser satisfactorios, existen discrepancias con los resultados obtenidos previamente por investigadores del mismo grupo (91), así como con otros resultados recientes (92) y las evaluaciones clínicas de algunas series de casos con lesiones no experimentales (93).

El empleo de células mesenquimatosas o condrocitos suspendidos en fibrina ha recibido atención especial, ya que esta variante permite el uso de factores de crecimiento para estimular el proceso de reparación (94). El empleo de estas técnicas tiene diversas limitaciones. La primera es la dificultad para mantener las células cultivadas del huésped en el sitio de la lesión, porque tienden a dispersarse, ya que se encuentran disueltas en un medio líquido. También se cuestiona el hecho de que el cartílago que se forma no

sea producido por los condrocitos, sino por células provenientes del periostio utilizado para sellar el lecho de implantación (32, 48). Finalmente, existe el riesgo de que se pierdan las células empleadas, aun cuando hayan sido implantadas en algún tipo de sistema de soporte como el de las esponjas de colágena, debido a que se trata de un sistema imperfecto de fijación (59-61, 95).

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario de investigación, que combina los conocimientos de diferentes áreas de la ingeniería y de la biología celular y molecular. Una de las técnicas empleadas, y originalmente descrita por Langer (96) Cao, Vacanti y colaboradores (97, 98), combinan la utilización de materiales sintéticos biocompatibles y biodegradables como estructuras de sostén, o como transportadores de células aisladas de tejidos específicos, con la finalidad de regenerar tejidos que puedan ser empleados para reparar, reconstituir, o reemplazar la estructura o función de tejidos y órganos lesionados o ausentes. Vacanti *et al* (88) describieron la formación de cartílago mediante el empleo de condrocitos bovinos inmaduros, sembrados en suturas de ácido poliglicólico deshebradas, e implantadas en el espacio subcutáneo de ratones atímicos. Más tarde, describieron la reparación de defectos articulares creados experimentalmente en la rodilla de conejos, utilizando condrocitos autólogos y estructuras de ácido poliglicólico (88). Se han utilizado técnicas similares para la regeneración experimental de diferentes tejidos, tales como cartílago, hueso y estructuras compuestas de cartílago (99), ligamento (100), tendones (99) y menisco (101).

También se han obtenido resultados alentadores con el uso de bioreactores para intentar formar por completo el tejido *in vitro* antes de implantarlo (25, 28, 29, 32, 47, 59, 60, 62, 102). El potencial para la aplicación de diferentes técnicas de ingeniería de tejidos en el campo de la ortopedia es incalculable. En el área de tejidos blandos se han realizado avances impresionantes; en el campo clínico se inició la utilización de células en cultivo para la reparación de lesiones condrales profundas en la rodilla, a partir del estudio publicado en 1994 por Britberg *et al.* (90). Actualmente, se realizan múltiples estudios clínicos para evaluar la utilidad de diferentes estructuras de polímeros, empleados para sustitución parcial de meniscos, cartílago, ligamentos, tendones, etc. (103-105). Además, los factores de crecimiento para mejorar la consolidación ósea, estudiados tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que son capaces de inducir la diferenciación de células mesenquimatosas a condrocitos (106, 107).

La cirugía ortopédica es líder en la aplicación clínica de la ingeniería de tejidos, En las dos últimas décadas, los cirujanos ortopédicos han implementado nuevas técnicas como alternativas para las superficies de carga articular, como los implantes recubiertos de cadera y la artroplastía de rodilla (108). Las técnicas artroscópicas han sido perfeccionadas hasta el punto de minimizar el trauma y acelerar la rehabilitación.

Cabe destacar que diversos autores han experimentado con técnicas que se basan en la modificación genética de los condrocitos, empleando diferentes vectores y genes que codifican la síntesis de

diversos factores de crecimiento, con lo que se pretende mejorar u optimizar las distintas técnicas de reparación condral (23, 27, 39, 47, 79, 85, 86, 91, 97). Para determinar si los condrocitos implantados son efectivamente los que forman el tejido de reparación, se ha propuesto la infección experimental de los implantes con un adenovirus que es vector del gen que codifica para la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP), la cual es cuantificable por medio de la citometría de flujo que permite diferenciar las células marcadas.

Las diferentes técnicas de reparación condral en materiales biodegradables están dando resultados prometedores por medio de implantes de andamiajes para células mesenquimatosas o condrocitos en caballos. Los estudios de los diferentes grupos de investigación (8, 22, 94) aunque son de vanguardia, no han llevado a cabo la evaluación a largo plazo para determinar si efectivamente se forma un tejido de reparación semejante al cartílago articular normal.

En este estudio, se propone desarrollar una técnica para reparar lesiones de cartílago articular mediante el uso de artroscopía e ingeniería de tejidos. En la actualidad, el transplante de condrocitos autólogos se ha utilizado como alternativa en medicina humana y modelos animales. Sin embargo, los resultados experimentales muestran que el tejido de reparación no es cartílago articular normal. Por otro lado, las técnicas quirúrgicas convencionales o abiertas tienen más probabilidad de complicaciones debido a las infecciones. Por lo tanto, es necesario desarrollar un método artroscópico para fijar el implante de condrocitos autólogos u otros precursores celulares y

polímeros al hueso subcondral. Se ha demostrado que el cartílago articular se puede “construir” *in vitro* con técnicas de ingeniería de tejidos.

El presente estudio tiene por objeto implementar y evaluar la técnica de implantación de condrocitos autólogos cultivados *in vitro* e incluidos en un andamiaje de polímeros sintéticos y naturales mediante artroscopia con objeto de desarrollar un procedimiento confiable para la reparación de lesiones de la articulación de la rodilla en caballos.

I. HIPÓTESIS

La reparación tisular inducida por el uso de implantes de condrocitos autólogos, sembrados sobre polímeros e implantados artroscópicamente en un defecto condral, tendrá características morfológicas – artroscópicas e histológicas similares a las del cartílago articular normal.

I. OBJETIVO GENERAL

Evaluar comparativamente la reparación de defectos del cartílago articular creados quirúrgicamente en la articulación fémoro-patelar de caballos jóvenes controles e implantados mediante artroscopía con condrocitos autólogos, cultivados *in vitro* y sembrados en polímeros

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Crear artroscópicamente un control que permita evaluar la evolución espontánea de un defecto articular en la tróclea medial del fémur de la articulación fémoro-tibial izquierda de caballos.
- b. Aislar condrocitos a partir del cartílago obtenido para cultivarlos y expandirlos *in vitro* con el fin de sembrarlos en estructuras de polímeros sintéticos y naturales, biocompatibles y biodegradables.
- c. Adaptar un vector adenoviral para el gene que codifica la síntesis de proteína verde fluorescente como marcador con objeto de contar con un sistema de detección de condrocitos autólogos infectados en el tejido implantado.
- d. Evaluar la evolución del tejido de reparación resultante de las diversas implantaciones a través de artroscopia diagnóstica e histología.

I. JUSTIFICACIÓN

Las lesiones articulares son comunes en los caballos de uso deportivo y actualmente se siguen tratando convencionalmente con tratamientos prolongados y de alto costo. Evidentemente, se requieren nuevos procedimientos para abordar el problema en forma mas adecuada.

Los informes sobre el resultado clínico de la implantación de condrocitos autólogos a través de distintas técnicas parecen ser satisfactorios experimentalmente, sin embargo, existen discrepancias con las evaluaciones clínicas, por lo tanto, implementar y evaluar la técnica de implantación de condrocitos autólogos es indispensable para desarrollar un procedimiento confiable para la reparación de lesiones de la articulación de la rodilla en caballos.

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario de investigación, que combina los conocimientos de diferentes áreas de la ingeniería y de la biología celular y molecular, por lo tanto, el desarrollo de modelos animales que combinan la utilización de materiales sintéticos biocompatibles y biodegradables como estructuras de sostén de células aisladas de tejidos específicos, resulta del mayor interés para la ortopedia comparada.

I. MATERIALES Y MÉTODO

6.1 Estandarización del cultivo de condrocitos autólogos

Se obtuvieron 12 muestras de cartílago articular de la articulación fémoro-tibio patelar de caballos de rastro las cuales fueron procesadas entre dos y cuatro horas después de la eutanasia en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR). Las articulaciones de las que fueron obtenidas las muestras no presentaron lesiones del cartílago articular. Se eligió la misma articulación en la que se realizaron los implantes quirúrgicos que fue la tróclea medial del fémur, tomando en cuenta que existe evidencia que los condrocitos tienen diferentes patrones de proliferación dependiendo no solo de la especie sino también de la articulación (109).

La región de la babilla se desinfectó y se incidió la articulación para exponer el cartílago articular. Se obtuvieron muestras de ambos cóndilos y trócleas, separándolas del cartílago calcificado mediante disección con bisturí del número 20 y se colocaron en una caja de cultivo para poder ser manipuladas en una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA). Se hicieron 2 lavados de la muestra con solución salina amortiguada de fosfato (PBS) [Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA], adicionada con antibióticos/antimicóticos al 10%, penicilina 10,000 UI, estreptomina 10,000 µg y anfotericina B 25 µg en 0.85% de solución salina (Invitrogen Co. Gibco NY, EUA).

El cartílago se fragmentó en pedazos de 1 mm³ y se pesó. Entre 100 y 200g de muestra se colocaron en un tubo de cultivo de 15ml con

una solución de colagenasa tipo II al 0.3% (Worthington. NJ, EUA) en medio para cultivo celular M199 (Bio-Whittaker. Maryland, EUA). La solución con los fragmentos de cartílago, se incubó (Shel Lab. Oregón, EUA) para su digestión enzimática con la colagenasa a 37°C en agitación constante durante 4 horas, después de las cuales se centrifugó a 126 x *g* durante 12 min a 21°C. El botón celular se resuspendió con 15 mL de solución de M199 más antibióticos/antimicóticos al 1% y se centrifugó nuevamente para realizar una segunda resuspensión del botón celular en 10 mL de solución M199 más suero fetal bovino (SFB) al 10 % (Gibco. NY, EUA).

Para cuantificar las células obtenidas, se tomaron 10 µL de la solución resuspendida de condrocitos y se mezclaron con 10 µL de azul- tripano al 4% (Gibco BRL, Life Technologies. NY, EUA). Las cuantificaciones se realizaron en una cámara de Neubauer, en la que se contaron las células del cuadrante central bajo el microscopio óptico de luz invertida (40x) [Carl Zeiss, Axiovert 25, Alemania]. Las células vivas se observaron de color blanco y las muertas de color azul. El porcentaje de viabilidad celular se calculó mediante la siguiente fórmula: Número de células vivas x 2 (factor de dilución- 20µL) x 10,000 (constante) x el volumen de suspensión. Cuando se obtuvieron en promedio 5×10^5 células, se sembraron en una caja para cultivo primario T25 y cuando se obtuvieron cerca de 1×10^6 de células se sembraron en T75 con 5 mL o 10 mL de una solución compuesta por medio de cultivo M199 y antibióticos con antimicóticos al 1% y SFB al 10%. Se incubó la caja de cultivo durante 3-4 semanas

en un incubador de CO₂ al 5%, 37°C y 85% de humedad relativa (NUAIRE, US Autoflow, EUA). Se cambió el medio de cultivo de la caja cada tercer día, monitoreando las células al microscopio y se esperó hasta que éstas llegaran a confluencia.

Para separar las células en monocapa, se lavó la caja de cultivo primario con 8 mL de PBS y 2 mL de ácido-etilen-diamino-tetracético (EDTA) 1 mM y se agregaron 5 mL de tripsina al 0.25% (Invitrogen, Gibco NY, EUA) para desprender las células del fondo de la caja. Posteriormente, esta se incubó con CO₂ a 37°C durante menos de 5 min. A los 3 min se evaluó la separación de las células al microscopio óptico de luz y se le agregaron 5 mL de SFB para bloquear la actividad de la tripsina. Se centrifugó a 126 x g por 12 min y el botón celular se resuspendió con 5 mL de PBS y se volvió a centrifugar. Se resuspendió en 2 mL de medio M199 con SFB al 10%. Se observó al microscopio para calcular número, morfología y viabilidad celular y posteriormente se recultivó durante 4 semanas para el primer pase y otras 4 semanas más para el segundo pase.

Una vez que las células llegaron a confluencia en las cajas de cultivo del segundo pase, se separaron nuevamente con tripsina y se obtuvo un botón celular de aproximadamente 20×10^6 condrocitos. Las células se evaluaron morfológicamente en el microscopio óptico de luz. Su conteo y viabilidad fueron determinados por medio de azul de tripano al 4% y calceína y hemodímero de etidio LIVE/DEAD® (Viability/Cytotoxicity Kit [L-3224], Invitrogen, Gibco NY, USA).

6.2 Evaluación morfológica del cultivo celular

Se efectuó la evaluación histoquímica de la monocapa de cultivo celular. Para evaluar la producción *in vitro* de los componentes de la matriz extracelular, se fijaron muestras de los cultivos para preparar frotis teñidos con hematoxilina eosina para evaluar la morfología celular, con safranina-O para la determinación de glicosaminoglicanos sulfatados, azul alciano para glicosaminoglicanos y tricrómica de Masson para determinar colágena.

6.3 Evaluación de viabilidad del cultivo

Además del uso de azul de tripano al 4% que se utilizó para evaluar la viabilidad celular, se aplicó asimismo el método consistente en el uso de calceína y hemodímero de etidio (EthD-1) kit preestablecido LIVE/DEAD® que emite fluorescencia de dos tipos que permite la evaluación simultánea de células vivas y muertas con marcadores que miden la actividad de estearasa intracelular y la integridad de la membrana plasmática.

Esta metodología se utiliza para evaluar cultivos tridimensionales para observaciones tanto en microscopio de contraste de fases o invertido (Carl Zeiss MicroImaging, Thornwood, New York), como en el microscopio confocal (Confocal Laser Scanning Microscopy, LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Alemania). En el presente estudio se utilizaron filtros ópticos para cada una de las absorbencias. La calceína se activa utilizando filtros de 485 ± 10 nm y el hemodímero de etidio es compatible con el filtro de la rodamina a 530 ± 12.5 nm. Las células adheridas a la caja de cultivo fueron evaluadas y también las células

tratadas con tripsina y sembradas en los polímeros. La vitalidad del cultivo tridimensional se evaluó los días 0, 3, 5, 7 y 9 (Figura 1).

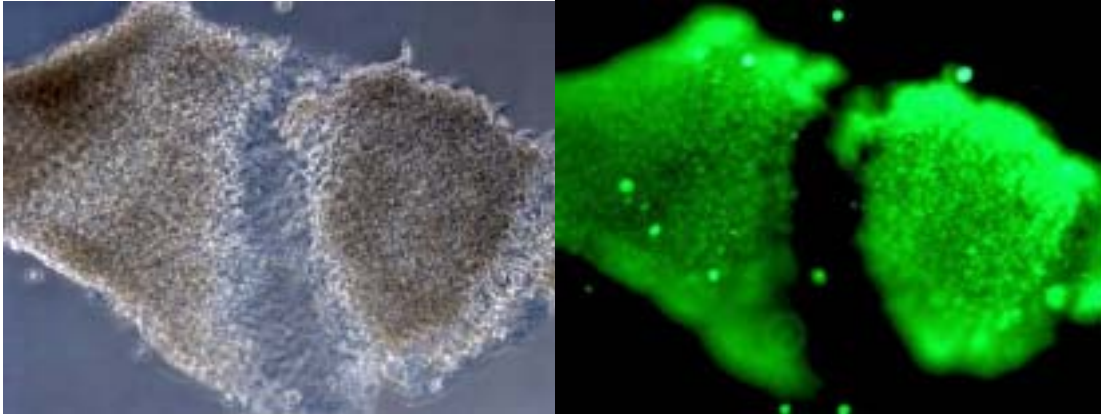


Figura 1. (a) Constructo en microscopia de contraste de fases (4X) y (b) Viabilidad celular del constructo detectada mediante fluorescencia verde mediante calceina-AM y hemodímero de etidio, bajo el microscopio óptico de fluorescencia invertida (4X) (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, New York).

Cada cultivo fue lavado con PBS teniendo cuidado de no eliminar las células muertas. El kit de LIVE/DEAD® se descongeló a temperatura ambiente y se seleccionaron los filtros apropiados para la lectura en el microscopio. Se preparó la solución madre de EthD-1 con 10 mL de PBS de grado de cultivo o solución Ham's F-12 (Gibco, NY, USA) y se adicionaron 20 μ L de EthD-1 se agitó con el vortex para asegurar una mezcla homogénea obteniendo así una solución de EthD-1 4 μ M. Se transfirieron 5 μ L de calceina de la concentración madre de 4mM a la solución de 10 mL con 4 μ M de EthD-1. Se homogenizó por medio del vortex y se obtuvo una solución con 2 μ M de calceina y 4 μ M de EthD-1 para teñir el cultivo. La concentración

final de DMSO, diluyente de la concentración madre, fue de $\geq 0.1\%$ misma que no produce daño a la mayoría de las células (110).

El cultivo en monocapa se tiñó con la solución de EthD-1 y calceína a temperatura ambiente y se incubó por 30 min. Las células vivas se observaron verdes con fluorescencia de 530nm y las células muertas se observaron rojas con fluorescencia intensa a >600 nm y débil a 530nm (Figura 2).

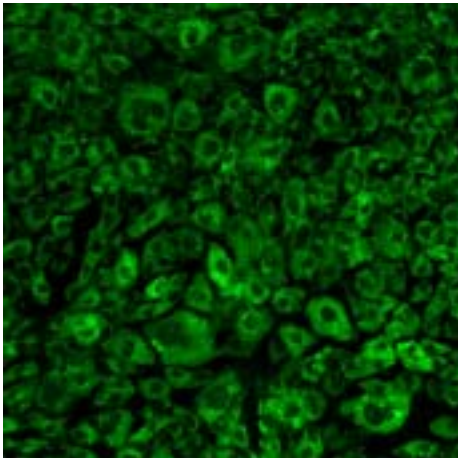


Figura 2. Células en cultivo de monocapa de primer pase tratadas con LIVE/DEAD [®] Kit para determinar viabilidad del cultivo (20x).

6.4 Evaluación molecular del cultivo

El cultivo celular fue cosechado por medio de tratamiento con tripsina sometido a extracción de RNA por medio del reactivo TRI-ZOL[®] (Invitrogen, Life Technologies. NY, USA) a razón de 1 mL de TRIZOL[®] para $5-10 \times 10^6$ células. Previamente a la extracción de RNA, se eliminó el medio de cultivo por aspiración y se agregaron 3 mL de PBS frío. Posteriormente se aspiró el PBS y se agregó de nueva cuenta 1 mL de PBS frío y se trató mecánicamente la suspensión

celular antes de colocarla en un tubo Ependorff estéril para someterla a centrifugación a 503 x g por 5 min. Se aspiró el sobrenadante, se agregó un volumen de TRIZOL® y se resuspendió mecánicamente con micropipeta para su incubación a temperatura ambiente por 5 min. A una quinta parte del volumen inicial de la mezcla se le añadió cloroformo-isoamílico en una proporción de 49:1, se homogenizó por inversión y se centrifugó a 3578 x g por 5min a temperatura ambiente. La fase acuosa recuperada se pasó a otro tubo estéril al que se agregó un volumen igual al recuperado de isopropanol frío para posteriormente incubarse durante 3 horas en hielo. Se realizó una nueva centrifugación a 8050 x g a 4°C durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante de isopropanol, se agregó 1 mL de etanol al 75-80% frío y se resuspendió el botón celular. Una vez más se centrifugó a 8050 x g por 10 minutos y se repitió el lavado con etanol. Después de otra centrifugación a 8050 x g por 10 minutos, se eliminó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Se resuspendió con agua con dietil pirocarbonato (DEPC, 70 µL). En algunos casos la resuspensión requirió de un calentamiento de la solución a 65°C por 5 minutos y de la adición de inhibidor de RNAsas a temperatura ambiente. Las muestras se almacenaron a -20°C y se evaluaron directamente mediante electroforesis para determinar la cantidad obtenida de RNA (111).

6.4.1 RT-PCR

Para determinar la expresión genética de proteoglicanos (agrecano) así como la colágena (Tipo II) en las células cultivadas *in vitro*, se procedió a realizar un ensayo de RT-PCR, para el cual se

empleó 2µg de RNA empleando el kit RT-PCR (SuperScript® First Strand Synthesis System for RT-PCR, Life Technologies, Gibco BRL), así como los iniciadores específicos como se muestran en la Tabla 1 (Bio-Synthesis Lote No 2857-1 y 2 Colágena tipo II y 2857-3 y 4 agregano). La cantidad de cDNA en cada muestra se confirmó y equalizó con una PCR preliminar en una fase logarítmica de deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfato (GADPH). El GAPDH se utilizó como control interno. Las secuencias de cada oligonucleotido están detalladas en la Tabla 1. Los productos de la reacción de la PCR se separaron por electroforesis con 20µl de cada mezcla en un gel de agarosa al 2% en solución amortiguada de Tris-acetato-EDTA a 90 V/cm y la visualización con tinción de bromuro de etidio y fotografiados. Para asegurar el tamaño de los productos de la PCR se comparó con un estándar de ADN de 1kb (Life Technologies). La densidad relativa de la banda se cuantificó por densitometría de los negativos (MasterScan Densitometer, Billerica, MA, EUA). Los datos se expresaron como proporciones normalizadas de los valores de la densidad integrada para cada gene en cuestión, estos valores se compararon con los de GAPDH para evaluar semicuantitativamente la expresión genética.

La amplificación se realizó mediante PCR en un un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystem, EUA), empleando Taq y amortiguadores para PCR (Amersham Pharmacia, EUA). Los iniciadores utilizados fueron específicos para la amplificación de agregano (Bayne, *et al.*). La secuencia se comparó con los patrones del GeneBank para colágena tipo II (Metsaranta & Vuorio) (111).

Este mismo procedimiento fue llevado a cabo con los cultivos tridimensionales utilizados en los implantes de los caballos experimentales.

Tabla 1. Iniciadores utilizados en RT-PCR (Oligonucleotidos)

Tipo rata colágena tipo II (COL2A1) gen, completo cds (Fuente, Fehr, JE, 2000)

5'→ctgctgacgctgctcgctcgccgctgtcctt→3' Fragmento esperado
5'→gcctcctcatcaaatcctccagccatctgggc→3' 326 pb
36 ciclos, alineamiento a 63.6°C

E caballus mRNA para agrecano (Gene Bank accession AFO40637) (Fuente, Fehr, JE, 2000)

5' - actttgggcggaagaagg- 3' Fragmento esperado
5' - ctagaggacagaaagcgac - 3" 325 pb
42 ciclos, alineamiento a 63.1°C

GAPDH (Gene Bank accession L23961)

5' →aaagttgtcatggatgaccttggcc→3' Fragmento esperado
5' →gtcaacggatttggccgtattgg→3' 480 pb
35 ciclos, alineamiento a 63.7°C

6.5 Cultivo tridimensional

Para el presente estudio los andamiajes seleccionados fueron el ácido poliglicólico (PGA) (112), en combinación con ácido poliláctico (PGLA) (113) y Colágena tipo I SIS (Intestino delgado de porcino)(114).

6.5.1 PGA

Para poder comprobar la adhesión celular, migración y crecimiento en el polímero, se sembraron las células de la monocapa de primer y segundo pase en PGA. Se cortaron discos de 8x0.5mm de malla de polímero 95% poroso y biodegradable de 15 μ m de diámetro con una distancia interfibrilar de 100 a 200 μ m (Albany International, Albany, NY), los cuales se esterilizaron con óxido de etileno (Biolene SRL, Buenos Aires, ARG) (Figura 3).



Figura 3. Disco de PGA de 8 x 0.5 mm las fibras son de 15 μ m de diámetro con una distancia interfibrilar de 100 a 200 μ m (Albany International, Albany, NY).

Cada disco estéril de polímero se colocó en medio de cultivo M199 por dos días. Los condrocitos cosechados se sembraron en el polímero humedecido y se adicionó medio de cultivo M199 enriquecido y suplementado con ácido ascórbico. Los polímeros sembrados se

mantuvieron por 7 días en constante movimiento en un incubador de 5% de CO₂ a 37°C, con 85% de humedad relativa, cambiando el medio de cultivo cada tercer día. La evaluación de la consistencia del constructo se llevó a cabo cada tercer día y asimismo se determinó la adhesión de las células al polímero bajo el microscopio invertido de contraste de fases. Finalmente, el séptimo día, se evaluó un segmento del polímero con células bajo el microscopio de transmisión de barrido ambiental (ESEM) Philips XL30 (FEI Philips Electro Scan, Alemania) con objeto de observar con mayor detalle la adhesión celular (115) (Figura 4).

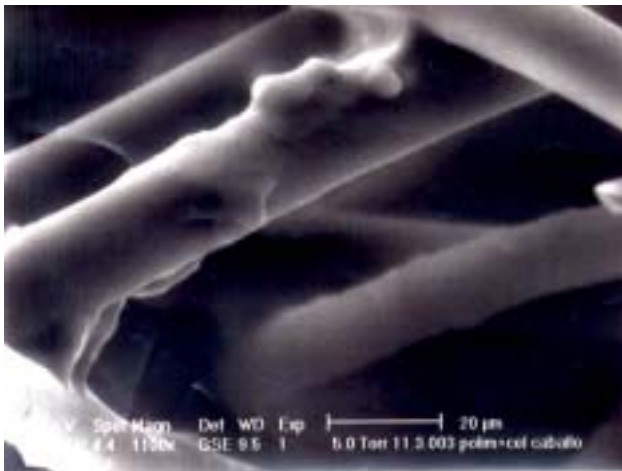


Figura 4. Segmento de PGA y células evaluadas bajo ESEM (1100x) Spot 4.4, GSE. WD 9.5.

6.5.2 PGLA

Los discos de malla de PGA (8x0.5mm) se pesaron y se sumergieron en una solución de Ac poliláctico (PLA) al 1% (ICN Biomedicals, Inc. Ohio, EUA), el solvente utilizado fue cloruro de metileno al 99.6% (Sigma-Aldrich Inc. MO, EUA). El polímero PLA confiere estabilidad y mayor rigidez al PGA (113). Se deben

realizar tres inmersiones consecutivas de PGA en PLA. El solvente debe ser evaporado en una campana de extracción de gases (LAB CONCO Corp. Kansas City, EUA) a temperatura ambiente (21°C) por 48 h y entonces los discos se vuelven a pesar para determinar la cantidad de PLA que se depositó en el PGA, que debe fluctuar entre 150mg y 190mg que corresponden aproximadamente entre el 55% y el 65% del peso total. El co-polímero PGLA se esterilizó en óxido de etileno y se almacenó en una cámara de transferencia semiseca (BIO RAD, Transblot SDC, USA) durante 7 días antes de su utilización. Dos días antes de sembrar las células sobre el polímero, éste debe lavarse con PBS, hidratarse con medio de cultivo M199 y mantenerse en el incubador de CO₂ a 37°C (Figura 5).

Las propiedades mecánicas de este polímero han sido evaluadas por Moran (113) en cultivos de condrocitos hasta por 4 semanas.



Figura 5. PGLA después de 3 inmersiones en PLA.

6.5.3 Colágena

La estructura primaria de la colágena tiene prácticamente la misma secuencia en todas las especies de cordados y por ello no ocasiona rechazo en implantes aún entre individuos de especie diferente (116). El material del constructo fue de 10 capas de submucosa de intestino delgado de porcino (SIS) de hatos libres de patógenos específicos (SPF). La composición tisular de este material es de colágena en un 90% y se comercializa como un disco estéril de 63mm de diámetro, certificado para su uso en humanos por la “Food and Drug Administration” (FDA), (Restore orthobiologic soft tissue implant, Johnson & Johnson, USA). La colágena se reabsorbe lentamente y el implante dura hasta 3 meses *in vivo* (117).

De los discos originales se cortaron otros más pequeños de 8mm de diámetro que se sembraron con células de primero y segundo pase. Se utilizaron 3 discos para sostener las células en las cajas de cultivo (Figura 6).

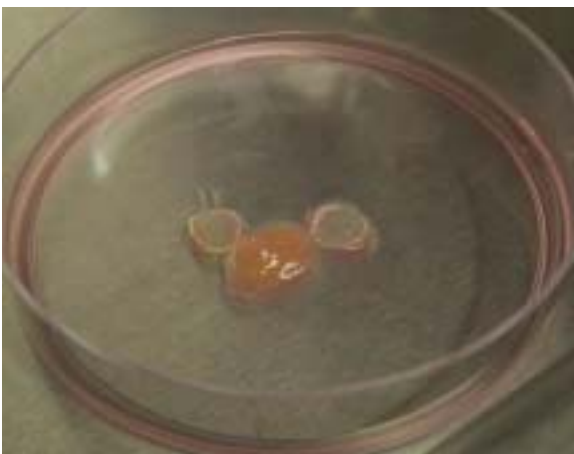


Figura 6. Tres discos de colágena tipo I (SIS) de 8 mm de diámetro. El disco central está cubierto de células de segundo pase.

6.5.4 Encapsulamiento de polímeros

Las células mantenidas en medio de cultivo M-199 con 10% de SFB de primer pase, se someten a la acción de la tripsina para posteriormente lograr suspensiones con concentración de 5×10^6 células. Mismo que se siembra en una caja de cultivo. Se cultivaron durante 4 semanas, suplementando con ácido ascórbico el medio M-199, el cual fue cambiado cada tercer día. Una vez que se estableció la formación de matriz extracelular en el fondo de la caja, comprobable mediante la opacidad de la misma (118), se colocó en el fondo un disco de PGLA, previamente humedecido en M199 y se sembraron en él, 2×10^7 células del segundo pase. Su encapsulamiento se logró levantando las células y la matriz extracelular del fondo de la caja de cultivo por medio de pinzas quirúrgicas (Figura 7). El constructo se mantuvo en el incubador de 5% de CO_2 a 37°C , con 85% de humedad relativa, cambiando el medio de cultivo adicionado con ácido ascórbico cada tercer día. Se evaluó la viabilidad del constructo antes de su implantación por medio de calceína y hemodímero de etidio.



Figura 7. (a) PGLA y 2×10^7 células. Procedimiento para separar las células y la matriz extracelular del fondo de la caja de cultivo con

pinzas quirúrgicas (b) Constructo de PGLA de 7 días previo a su implantación.

6.5.5 Microscopia electrónica de barrido ambiental (ESEM).

Antes o directamente después de sembradas las células, se evaluaron muestras de constructo por ESEM. Se seccionó una parte del polímero con células y se fijó en glutaraldehído al 2.5% [v/v] (Merck, México) en una solución amortiguadora de cacodilato ácido de sodio (0.2 M) a un pH de 7.2 (Merck, México) y se mantuvieron en el fijador durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron cuatro lavados de 5 minutos cada uno con la solución lavadora amortiguada de cacodilatos. Después se efectuó por cuatro veces un lavado de 5 minutos con agua desionizada, y finalmente, se colocó la muestra en plastilina conductiva previo secado con papel filtro. Las condiciones de observación fueron entre 16 a 18KV, el spot de 4.5-4.8, la amplificación de 250x a 1000x y a presión atmosférica de 5.8 a 6.5 torr.

6.6 Transplante del constructo de PGA y condrocitos de caballo en ratones atímicos

Se implantaron subcutáneamente 3 ratones atímicos con condrocitos que se obtuvieron de cartílago articular de caballos de rastro. Una vez cosechados los condrocitos del segundo pase, se sembraron en discos de 8x0.5mm de PGA y se mantuvieron en el incubador de 5% de CO₂ a 37°C en 85% de humedad relativa, en constante movimiento por 7 días. El constructo fue implantado subcutáneamente en el dorso de ratones atímicos bajo un procedimiento quirúrgico previamente descrito por Cui *et al* (119). La descripción del procedimiento se muestra en el **Anexo I**.

6.7 Estandarización de las técnicas histológicas e histoquímicas.

Se colectaron biopsias osteocondrales de especímenes de caballos de rastro con la metodología previamente descrita y se fijaron en formol amortiguado al 10% por 48 h y se descalcificaron durante 28 a 31 días mediante inmersión en solución de "Krajan" (CTR Scientific. Monterrey, MEX). Una vez descalcificadas, las muestras se cortaron en fragmentos de 8mm de largo, 5mm de ancho y 1mm de espesor y se lavaron con jabón neutro y agua corriente. Se colocaron en cápsulas de inclusión y se fijaron nuevamente en formol amortiguado al 10% durante 24 h. Se procesaron en el histoquinete y se incluyeron en parafina para realizar cortes de 3 μ de espesor.

Una vez montados en laminillas, desparafinados e hidratados, los cortes se tiñeron con las diferentes tinciones. Los cortes teñidos con hematoxilina - eosina (H y E), se montaron en un medio de resina sintética.

Para estandarizar las tinciones de safranina-O, tricrómica de Masson y azul alciano, se utilizaron muestras de placa de crecimiento del carpo de potrillos menores de un mes de edad.

6.7.1 Tinción de hematoxilina – eosina (Figura 8).

Las laminillas se sumergieron en una canastilla de metal en una solución de hematoxilina de Harris (Merck, Alemania) durante 3 min y posteriormente se lavaron 30 veces en agua, después se sumergieron en una solución acuosa de hidróxido de amonio al 1% durante 15 segundos y se lavaron nuevamente 30 veces en agua. Se eliminó el exceso de hematoxilina se sumergieron 30 veces en alcohol al 96%. Finalmente, se tiñeron durante 3 min con eosina amarillenta (Merck, Alemania).

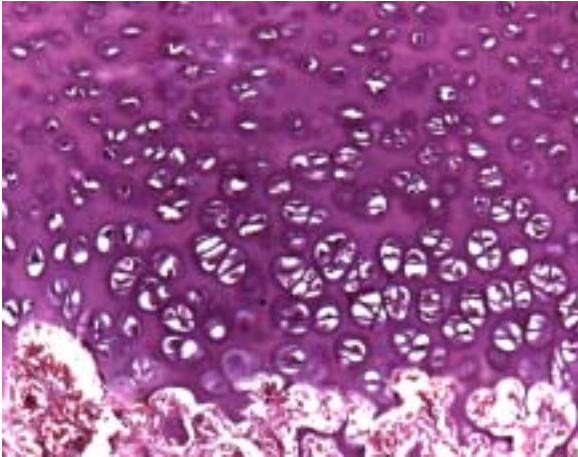


Figura 8. Tinción H&E de placa de crecimiento del carpo de potrillos (10x)

6.7.2 Tinción con safranina-O (Figura 9)

Después del proceso previamente descrito las laminillas fueron sumergidas en una solución de “Fast Green” (Merck, Alemania) al 0.001%, durante 5 min y posteriormente en una solución de ácido acético al 1%, durante 10 segundos.

Se tiñeron en una solución de Safranina-O (Merck, Alemania) al 0.1%, durante 90 minutos y se dejaron secar al aire, después se sumergieron durante 10 minutos en xilol y se cubrieron con medio resinoso.

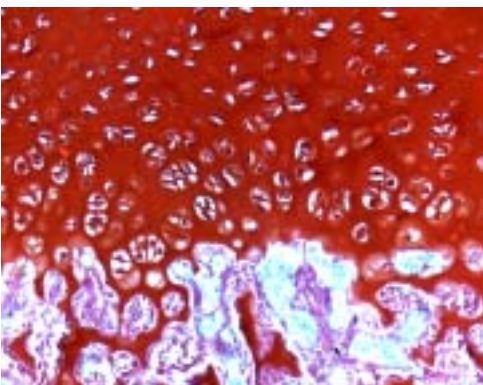


Figura 9. Tinción de safranina O de placa de crecimiento del carpo de potrillos (10x)

6.7.3 Tinción tricrómica de Masson (Figura 10)

Las laminillas se colocaron en una solución fijadora de “Bowins” durante 24 h a temperatura ambiente, se lavaron con agua corriente y después con agua destilada. Se tiñeron con una solución de fucsina ácida al 1%, escarlata de Biebrich (Merck, Alemania) durante 10 minutos y se enjuagaron con agua destilada. Se sumergieron en una solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (Merck, Alemania) durante 15 minutos y se contrastaron con una solución de azul de anilina (Merck, Alemania) por 10 minutos. Se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire. Después se sumergieron durante 10 minutos en xilol y se cubrieron con un medio resinoso.

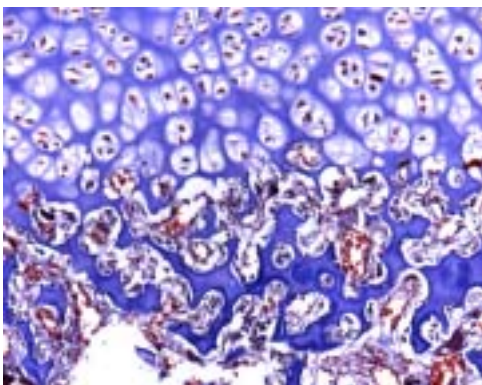


Figura 10. Tinción tricrómica de Masson de placa de crecimiento del carpo de potrillos (10x)

6.7.4 Tinción con azul alciano, pH 1.0 (Figura 11)

Las laminillas se sumergieron en una solución de azul alciano (Merck, Alemania) 8GX, (1 g en 100ml de ácido clorhídrico al 0.1 N), durante 24h y se secaron con papel filtro. Se sumergieron 2 veces durante 5 segundos en alcohol etílico al 96%, después en alcohol etílico absoluto y finalmente en alcohol-xilol. Se sumergieron durante 20 minutos en xilol y se cubrieron con un medio resinoso.

en

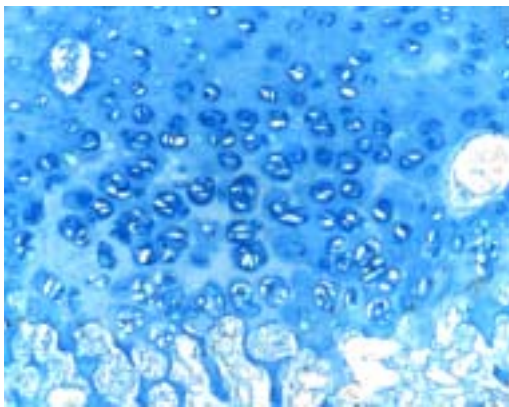


Figura 11. Tinción de azul alciano placa de crecimiento del carpo de potrillos (10x).

6.7.5 Sistema de calificación, para la evaluación histológica del tejido de reparación (Mainil-Varlet, 2003)(120)

Tabla 2. Todas las observaciones histológicas fueron calificadas cuantitativamente de acuerdo con la tabla siguiente :

CARACTERÍSTICAS DEL TEJIDO	CALIFICACIÓN	PUNTOS
Morfología	Hialino	3
	Hialino/fibrocartílago	2
	Fibrocartílago	1
	Tejido fibroso	0
Afinidad por la tinción	Cercana a la normal	1
	Anormal	0
Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal	2
	Irregular	1
	Muy irregular	0
Integración al tejido subyacente.	Buena	1
	Pobre	0

Total máximo de puntos = 7

6.8 Desarrollo de la técnica artroscópica

Se obtuvieron muestras de cartílago articular de la articulación fémoro-patelar de caballos de rastro para establecer la técnica artroscópica mas adecuada para este procedimiento. Se llegó a la conclusión de la conveniencia de obtener cartílago de la tróclea medial

del fémur por su fácil acceso, mejor visualización, mayor espesor del cartílago y mejor supervivencia funcional por no tratarse de una estructura sometida a carga excesiva.

Los procedimientos artroscópicos realizados en el presente trabajo siguieron la técnica descrita por McIlwraith (121), utilizando una lente artroscópica (Olympus Winter and Ibe GMBH, Hamburgo, Alemania) y una video cámara digital (Dyonics Inc. Smith & Nephew. OK, EUA). La lente artroscópica tiene 4mm de diámetro y 30 grados de angulación.

Se empleó un sistema de fijación construido por los ingenieros biomédicos del INR con base en un diseño realizado en la Universidad de Guelph por el Dr Mark Hurtig y Dr Antonio Cruz (Figura 12). Este aparato permite anclar la articulación y flexionarla lo suficiente para facilitar el acceso para la obtención de la muestra osteocondral por medio de artroscopía.



Figura 12. Sistema de fijación para prácticas artroscópicas utilizado en este estudio.

La técnica artroscópica para la obtención de muestras osteocondrales de la tróclea medial se perfeccionó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y se contó con el instrumental quirúrgico especializado para la obtención de cartílago para humanos (COR System. MA, EUA). A través de la incisión primaria se introdujo un

instrumento palpador de plástico estéril de punta roma en dirección perpendicular a la tróclea medial del fémur. Se retiró el instrumento de palpación y se insertó un sacabocado de acero inoxidable, de doble componente en forma de “T” para obtener una biopsia osteocondral circular de 8 mm de diámetro (COR System. MA, EUA). Una vez colocado el sacabocado sobre el sitio donador, se colocó en su extremo externo un yunque (COR System. MA, EUA) para hundir al sacabocado 8 mm de profundidad con un martillo ortopédico (FIEM, México), en el cartílago articular y hueso subcondral de la tróclea medial del fémur. Con movimientos rotatorios se extrajo la muestra osteocondral cilíndrica. Se requirió de dos biopsias para obtener suficiente cartílago para el cultivo *in vitro*. Una vez estandarizada esta técnica en cadáver, se llevó a cabo en los caballos experimentales bajo anestesia general.

6.9 Animales experimentales

Se utilizaron 20 caballos jóvenes clínicamente sanos (19 yeguas y un macho entero), entre 1 y 4 años de edad, de raza criolla y con un peso de 218 a 350 kilos. Los animales no presentaron claudicación ni lesiones articulares con base en la inspección clínica y radiográfica.

Los caballos se mantuvieron en un corral circular y en caballerizas convencionales del Departamento de Medicina Cirugía y Zootecnia para Équidos (MCZE) FMVZ de la UNAM.

A cada animal se le proporcionó tres veces al día heno de avena y alfalfa achicalada, así como agua a libre acceso. Las cantidades para cada caballo se calcularon con base a su peso y condición corporal.

Antes de iniciar el experimento los caballos estuvieron bajo evaluación clínica durante una semana y al finalizar ese periodo, fueron bañados, desparasitados y vacunados contra tétanos.

Las cirugías artroscópicas de todos los caballos del experimento, se realizaron en el quirófano del Hospital del departamento de MZE de la FMVZ de la UNAM, La articulación experimental fue la fémoro-patelar derecha, mientras que la articulación homóloga del miembro opuesto, sirvió como donador de cartílago o control.

Se formaron 3 grupos experimentales y 2 grupos control: a) el grupo 1 con 6 babillas que fueron implantadas con un constructo de PGLA, creando para ello previamente un defecto condral. Este grupo fue evaluado a las 8 semanas. b) El grupo 2 con 6 babillas que fueron implantadas en la tróclea medial con un constructo de condrocitos autólogos y PGLA encapsulado en condrocitos con matriz extracelular, creando para ello previamente un defecto condral. Este grupo fue evaluado a las 8 semanas. c) el grupo 3 con 6 babillas que fueron implantadas en la tróclea medial con un constructo de condrocitos autólogos y colágena encapsulado en condrocitos con matriz extracelular, creándose para ello previamente un defecto condral. Este grupo fue evaluado a los 6 meses. d) El grupo control osteocondral con 10 babillas en las que fue creado un defecto osteocondral de 8 mm de diámetro y 8 mm de profundidad para la obtención de cartílago como fuente de los condrocitos autólogos para la implantación en constructos del grupo 1, 2 y 3. Este grupo fue evaluado a los 6 meses. f) El grupo control condral con 6 babillas en los cuales se obtuvo una muestra condral y se hizo una perforación central para alojar el ancla de fijación para el polímero. Estos fueron evaluados a las 8 semanas. Finalmente, g) Dos caballos fueron implantados en la tróclea medial de la babilla con un constructo de condrocitos autólogos infectados con Ad-GFP (**Anexo II**) y colágena encapsulada en condrocitos con matriz extracelular, creando para ello previamente un defecto

condral. Estos caballos fueron evaluados a las 4 semanas y los hallazgos se analizaron descriptivamente.

6.9.1 Manejo individual

Los caballos se evaluaron clínicamente y 12 horas antes de la cirugía les fue retirado el alimento pero recibieron agua a libre acceso. Se colocó un catéter intravenoso en la yugular izquierda de calibre 14 y 2 pulgadas de longitud (Equipos Médicos Vizcarra, México) con extensión (PISA, México) y tapón (BRAUN, Alemania). Se tomaron radiografías y rasuraron ambas articulaciones.

6.9.2 Protocolo de anestesia

La cirugía se realizó bajo anestesia general previa sedación con hidrocloreuro de xilacina (Fort Dodge, EUA) *i.v.* a una dosis de 1.1 mg/kg de peso. Como relajante muscular se administró por vía intravenosa a efecto una solución de gliceril guayacol éter al 5%. Para la inducción preanestésica se administró hidrocloreuro de ketamina (Fort Dodge, EUA) *i.v.* a una dosis de 2.2 mg/kg de peso. El caballo en decúbito por la inmovilización química fue trasladado con grúa a la mesa de cirugía donde se colocó en decúbito dorsal y se procedió a su intubación traqueal para mantenerlo en plano anestésico quirúrgico mediante la combinación de halotano (Halanest RIMSA, México) y oxígeno (INFRA, México). Durante la anestesia se monitorearon frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, pulso, llenado capilar, color de mucosas y presión arterial. Se proporcionó apoyo cardiovascular al paciente con la administración de solución de

Hartmann (PISA, México) *i.v.* a una velocidad de 10-15 mL/kg de peso/h.

6.9.3 Procedimiento quirúrgico artroscópico para obtener cartílago

De cada uno de los caballos se obtuvieron biopsias de cartílago, sin hueso subcondral en el grupo control condral y con hueso subcondral en los controles osteocondrales de la babilla izquierda, con base en las técnicas artroscópicas estandarizadas en cadáver como describimos previamente y referidas por McIlwraith (121).

Una vez anestesiado el caballo en posición de decúbito dorsal y con el miembro pelviano izquierdo extendido, se desinfectó la babilla con yodo povidona espuma y alcohol isopropílico al 70%, se cubrió con campos estériles y se mantuvo en extensión para facilitar el abordaje a la articulación fémoro-patelar.

Se palparon los tres ligamentos patelares y la cresta tibial. Se identificó el espacio entre los ligamentos lateral y medio, en medio del cual se ubicó el portal artroscópico entre la cresta tibial y el borde distal de la rótula. Se insertó un catéter calibre 14 x 2 pulgadas de longitud (Equipos Médicos Vizcarra, México), que se conectó a una bomba de infusión (Masterflex, Coleparmer Instrument Co. Chicago, EUA) con solución de Hartmann (90 a 120 ml). Una vez distendida la cápsula, se retiró el catéter y sobre el punto de inserción se realizó una incisión vertical de 5 mm en la piel y tejido subcutáneo para exponer la cápsula articular a la que se le practicó una incisión de 1 cm con un bisturí del número 11 nuevo. Se introdujo el trocar artroscópico de punta roma con camisa y de esta manera se creó el portal que sirvió para introducir el artroscopio. Al retirar el trocar de la camisa, ésta quedó dentro de la cavidad articular y sirvió de guía para introducir el artroscopio

al que se le conectó una cámara artroscópica (Dyonics Inc., Smith & Nephew. OK, EUA) y la fuente de luz (Stryker Endoscopy, Quantum 250. Sunnyvale, CA EUA). Las imágenes intra-articulares se observaron en un monitor a color (Sony Trinitron, Sony Corporation, Japón). Para mantener distendida la cápsula, también se conectó al sistema la línea de ingreso de irrigación con solución de Hartmann. Con el artroscopio se localizó el tercio proximal de la tróclea medial del fémur y se obtuvieron dos biopsias de cartílago con 5mm de separación entre ambas, con base en las técnicas artroscópicas estandarizadas en cadáver como describimos previamente y referidas por McIlwraith (121) (Figura 13). En el caso de las biopsias de cartílago sin hueso subcondral, el sacabocado se insertó exclusivamente 4mm en vez de 8mm de profundidad.

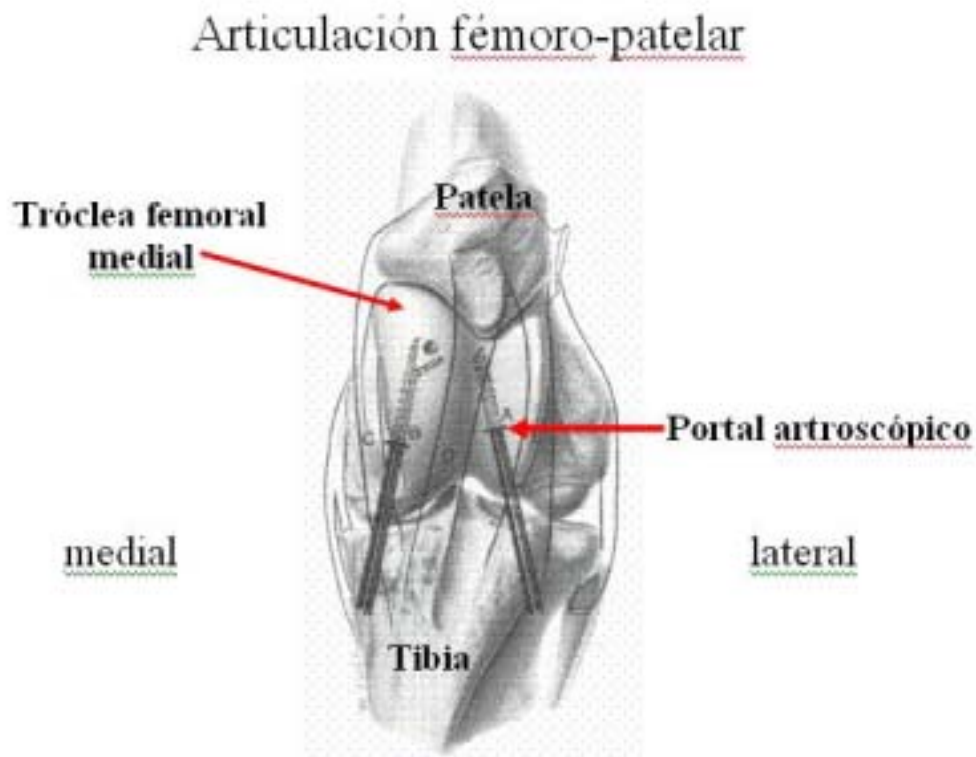


Figura 13. Dibujo de accesos quirúrgicos para la obtención de muestras osteocondrales de la articulación fémoro patelar (Adaptación de McIlwrigth, 1996 y Lombardero, 2004).

Concluido el procedimiento, la articulación se lavó con el sistema de irrigación, se retiraron los instrumentos y se suturaron las incisiones en piel y cápsula articular en un mismo plano, mediante puntos simples con sutura no absorbible de poliamida calibre 1 (Braunamid, BRAUN Aesculap, Alemania).

Las dos muestras osteocondrales obtenidas se colocaron en un tubo cónico de plástico estéril de 50ml, que contenía 5ml de medio para cultivo celular M-199, adicionado con antimicrobianos/antimicóticos al 10%. El tubo se colocó en una hielera a 4°C y se trasladó de inmediato al Laboratorio de Ingeniería de Tejidos y Terapia Celular del INR de la Secretaría de Salud, donde se realizaron los cultivos celulares.

Los defectos osteocondrales que se crearon al extraer las muestras, se dejaron intactos para que evolucionaran en forma natural.

6.9.4 Implantación artroscópica del constructo.

En cada una de las babillas se implantó un constructo de polímero/células en el tercio proximal de la tróclea medial del fémur derecho. Se realizó el portal para el artroscopio siguiendo la técnica descrita previamente. El segundo portal fue creado entre los ligamentos patelares medio y medial. Se localizó el sitio de implantación con el instrumento palpador de plástico de punta roma y se creó en ese sitio, un defecto condral espesor total de 8 mm de diámetro y 4 mm de profundidad con la ayuda del sacabocado en forma de "T", una cureta y una pinza

“Rongeur” (Olympus, Alemania). Se intentó no lesionar el cartílago calcificado y el hueso subcondral. Únicamente se retiró el cartílago articular y se dejó el hueso subcondral expuesto sin provocar sangrado. Una vez creado el defecto, se introdujo a través del segundo portal una broca de acero inoxidable de 2.4 mm de diámetro (Mitek. MA, EUA), la cual sirvió para realizar un orificio de 15 mm de profundidad en el hueso subcondral en el centro del defecto con la ayuda de un taladro eléctrico convencional (Black & Decker, EUA) y un clavo de Steimann 5/64 (Figura 14).



Figura 14. Se utilizó una broca de acero inoxidable de 2.4 mm de diámetro (Mitek. MA, EUA), la cual sirvió para realizar un orificio de 15 mm de profundidad en el hueso subcondral

Posteriormente se introdujo una cánula artroscópica de acero inoxidable y de doble componente (camisa y obturador romo), la cual fue diseñada

especialmente en el INR por el Departamento de Ingeniería Biomédica (Figura 15) para servir como guía y transporte del constructo. Utilizando la cánula como guía, se introdujo un ancla absorbible de ácido poli-L-láctico de 3.5 mm con dos cabos de sutura absorbible de polidioxanona (PDS) calibre 2 (Panalok, Mitek. MA, EUA). El ancla fue enterrada con ayuda del martillo ortopédico al orificio previamente hecho. La cánula se dejó dentro de la cavidad articular con los cabos de las suturas hacia el exterior.



Figura 15. Cánula y camisa roma diseñada en el INR por el Departamento de Ingeniería Biomédica para la inserción y fijación del constructo.

El constructo fue perforado a manera de un botón con las agujas de sutura en forma estéril, fue deslizado por las suturas hacia la entrada de la cánula y los cabos de las suturas fueron introducidos con el obturador roma de la cánula (Figura 16). Finalmente el autoinjerto se deslizó dentro de la camisa con ayuda del obturador hasta llegar al defecto condral y se fijó mediante amarre de las suturas con 3 nudos, utilizando un “empuja-nudos” artroscópico de acero inoxidable (Mitek. MA, EUA).



Figura 16. (a) Constructo perforado con dos agujas para dejar pasar la sutura absorbible para anclarlo al defecto condral creado experimentalmente. (b) Paso del constructo a través de la cánula.

Después de evaluar con el artroscopio y el gancho palpador la estabilidad del implante se cortaron los cabos de sutura. Los instrumentos quirúrgicos fueron retirados y los portales se suturaron de manera convencional. Al finalizar el procedimiento quirúrgico, los caballos recibieron oxígeno previa remoción del aparato de anestesia. Los animales experimentales se mantuvieron en confinamiento durante 21 días posteriores a la cirugía.

6.9.5 Cuidados y manejo posoperatorio.

Se administró fenilbutazona *i.v.* (Brovel, México) a una dosis de 4.4 mg/kg de peso al momento en que los caballos salieron del quirófano y se continuó con el mismo tratamiento durante 5 días a la mitad de la dosis inicial cada 12 horas. Además se administró a cada caballo penicilina G procaínica (Loeffler, México) *i.m.* a una dosis de 22,000 UI/kg de peso cada 12 horas y gentamicina (Shering Plough, México) *i.v.* a una dosis de 6.6 mg/kg de peso cada 24 horas durante 5

días. Los animales fueron revisados 3 veces al día. Cada caballo tuvo un expediente clínico completo. Las suturas de piel fueron retiradas a los 14 días.

6.10 Evaluación artroscópica

Se realizó una evaluación artroscópica del tejido de reparación en cada articulación previa a la obtención de la muestra de tejido. Las evaluaciones se realizaron a las 8 semanas para los grupos 1 y 2, a los 6 meses el grupo 3 y a las cuatro semanas los animales implantados con AdGFP. Se les atribuyó un puntaje a los parámetros de evaluación de acuerdo con las siguientes tablas diseñadas y publicadas por Oswestry) (122) y la Sociedad Internacional de Reparación de Cartílago (ICRS)

Tabla 3. Todas las observaciones artroscópicas fueron calificadas cuantitativamente de acuerdo con la tabla de Oswestry.

Características del Tejido	Calificación	Puntos
Nivel del tejido de reparación respecto a la superficie articular	Nivelado	2
	Elevado	1
	Sumido	0
Integración del implante con el cartílago adyacente	Completa	2
	Incompleta <25%	1

	Incompleta >25%	0
Apariencia Macroscópica del tejido de Reparación	Suave	2
	Irregular (ligeramente)	1
	Irregular (fibrilación)	0
Color del implante	Perlado	2
	Blanco	1
	Amarillo	0
Rigidez del implante al tacto (gancho palpador)	Normal (como cartílago)	2
	Suave	1
	Muy suave	0

Total máximo de puntos = 10

Tabla 4. Todas las observaciones artroscópicas fueron calificadas cuantitativamente de acuerdo con la tabla de ICRS :

Criterio Protocolo A	Calificación	Puntos
Grado de reparación del defecto	Nivelado al cartílago adyacente	4
	75% reparado	3
	50% reparado	2
	25% reparado	1
	0% reparado	0
Integración al cartílago adyacente	Completa	4
	Demarcando un borde < 1 mm	3
	$\frac{3}{4}$ del implante integrado, $\frac{1}{4}$ > 1mm	2
	1mm	1
	$\frac{1}{2}$ del implante integrado, $\frac{1}{2}$ > 1mm	0
	$\frac{1}{4}$ del implante integrado a sin contacto	
Apariencia macroscópica	Superficie intacta y suave	4
	Superficie fibrilada	3
	Pequeñas fisuras, grietas esporádicas	2
	1	1
	Varias fisuras o grietas profundas	0
	Degeneración total del implante	

Evaluación general del grado de reparación	Grado I	normal	12
	Grado II	cercano a lo normal	11-8
	Grado III	anormal	7-4
	Grado IV	severamente anormal	3-1

6.11 Obtención del tejido de neoformación

Después de la evaluación artroscópica, a través del segundo portal, se tomó una muestra del tejido de reparación incluyendo una porción del tejido original adyacente. Para ese propósito se utilizó un sacabocado para biopsias de 8mm de diámetro y 4 mm de profundidad (sistema de transplante condral COR, Mitek, Ma, EUA). Una vez obtenidas las muestras, se lavó el sitio manipulado con solución Hartmann a través de una cánula y finalmente, se suturó la cápsula y la piel.

6.12 Procesamiento de las muestras de tejido de reparación.

Todas las muestras se fijaron en formaldehído amortiguado al 10% para la realización de cortes histológicos y su tinción con hematoxilina-eosina, Safranina-O, tricrómica de Masson y azul alciano. Para la evaluación de los dos caballos implantados con condrocitos infectados con Ad-GFP las muestras obtenidas a las 4 semanas fueron divididas en 3 partes, la primera fue sumergida en medio de cultivo, para ser evaluada en microscopia confocal, la

segunda fue fijada en glutaraldehído al 2.5% también para su evaluación por microscopía confocal y la tercera fue fijada en formalina amortiguada al 10% para evaluación histológica.

6.13 Análisis estadístico

Los resultados del presente estudio se analizaron mediante análisis descriptivo, Chi cuadrada, prueba exacta de Fisher, pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney y el coeficiente de correlación rho de Spearman. Las diferencias entre experimental y control se consideraron significativas cuando la probabilidad de error alfa fue menor a 0.05. Los datos se analizaron en el programa de cómputo SPSS versión 12.

En el caso del grupo 1, 2 y 3 de las articulaciones implantadas se compararon con las lesiones control condral y defectos osteocondrales de la articulación izquierda

VII. RESULTADOS

7.1 Evaluación del cultivo de condrocitos autólogos

En la cuantificación con azul tripano al 4% en la cámara de Neubauer bajo el microscopio óptico de luz invertida, las células vivas se observaron de color blanco y las muertas de color azul.

Con la técnica de fluorescencia utilizando calceína-AM y hemodímero de etidio, las células vivas se observaron verdes con fluorescencia de 530nm y las células muertas se observaron rojas con fluorescencia intensa a >600 nm y débil a 530nm (Figura 17).

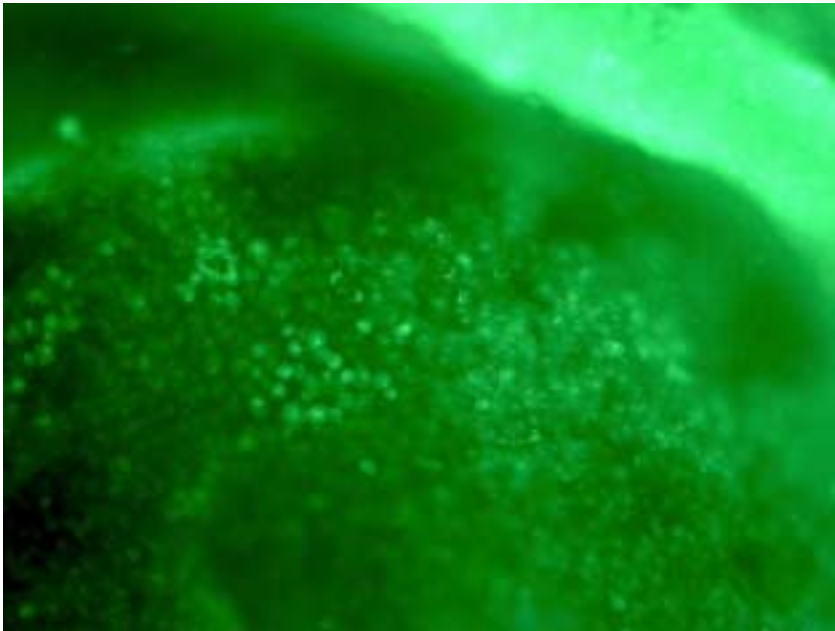


Figura 17. Viabilidad celular del constructo de PGLA encapsulado con 15×10^6 células tratadas con Live and Dead® Kit bajo el microscopio óptico de fluorescencia invertida (10x) las células vivas emiten

fluorescencia verde a los 7 días de sembrados demostrando 90% de vitalidad.

Se comprobó que con 100 a 150 gramos de cartílago donador se obtiene un crecimiento *in vitro* de condrocitos autólogos suficiente para una concentración promedio de 15 a 20×10^6 células por constructo entre 8 y 10 semanas de cultivo.

7.2 Evaluación molecular del cultivo de condrocitos autólogos

Los condrocitos sobrevivientes en monocapa expresaron ARNm de colágena tipo II y proteína central de agrecano en los cultivos de primero y segundo pase (Figura 18).



Figura 18. RT-PCR de cultivo de condrocitos en monocapa de segundo pase con iniciadores de colágena tipo II y agrecano.

7.3 Determinación de la adhesión celular a los polímeros

El encapsulamiento de los polímeros (PGLA y Colágena) se llevó a cabo en la caja de cultivo sembrada con 5×10^6 células y tardó entre 4 y 5 semanas en formar una membrana opaca de células lo suficientemente gruesa para poder ser manipulada por las pinzas quirúrgicas. La adhesión entre las fibras y el constructo se evaluó por medio de ESEM mostrando en el caso de PGLA encapsulado, adhesión de las células al polímero y degradación parcial de PGLA después de 7 días de incubación en movimiento (Figura 19).

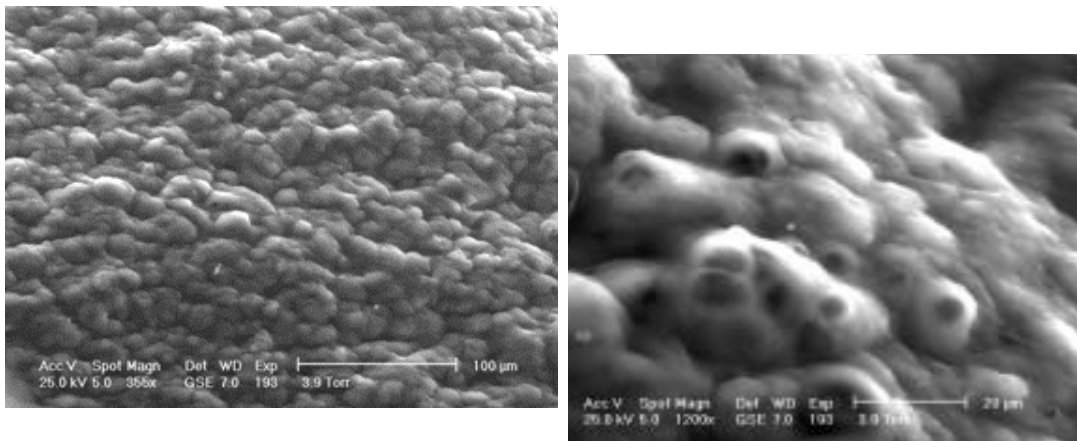


Figura 19. (a) Adhesión entre las fibras del constructo y las células autólogas cultivadas. ESEM (Spot 5.0, magnificación 355x, GSE 7.0, 3.9 Torr). (b) Degradación prematura del polímero al día 7 (Spot 5.0, magnificación 1200x, GSE 7.0, 3.9 Torr).

7.4 Trasplante del constructo de PGA y condrocitos de caballo en ratones atímicos.

Las células sembradas en polímeros e implantadas en ratones atímicos formaron un tejido que semeja cartilago hialino en 8 semanas como se muestra por medio de la histoquímica y microscopía de transmisión (Figura 20).

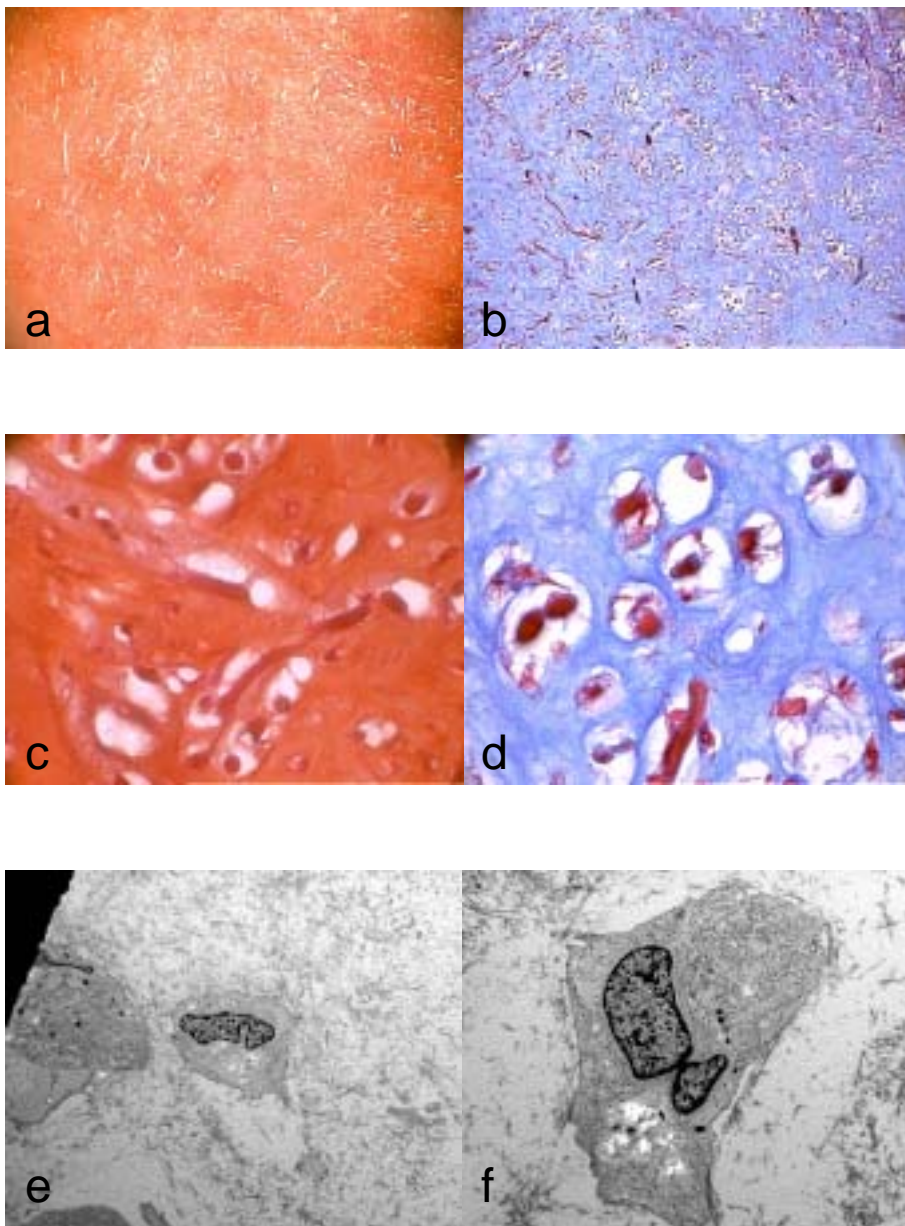


Figura 20. Tejido de neoformación subcutáneo en ratón atímico a partir la implantación de condrocitos de caballo sembrados en PGA.

(a) Safranina O(10x) tejido morfológicamente compatible con cartílago, (b) tricrómica de Masson (10x) tejido morfológicamente compatible con cartílago, (c) safranina O (100x) condroblastos activos, (d) tricrómica de Masson (100) condroblastos activos (e) MET (2550x) condroblastos activos rodeados de fibrillas de colágena, y (f) MET (3700x) condroblasto activo, nótese la abundancia de retículo endoplásmico rugoso.

7.5 Evolución clínica de los animales experimentales

Todos los caballos se recuperaron de cirugía sin problemas de claudicación ni signos de infección a excepción de uno que tuvo claudicación intermitente por 8 días pero que se recuperó sin problemas subsecuentes. Los caballos control y experimentales a las 8 semanas no mostraban claudicación evidente al paso ni al trote. No hubo diferencia tanto en movimientos articulares como en las flexiones forzadas en los caballos tratados. Los hallazgos radiográficos de todos los caballos fueron normales sin signos de osteoartritis o formación de osteofitos. No hubo separación de ninguna de las anclas implantadas.

A la mitad de la fase experimental, una yegua del grupo PGLA sufrió síndrome abdominal agudo que no respondió a la terapia médica, por lo que se decidió practicar la eutanasia. Dos caballos, uno del grupo PGLA encapsulado y un caballo con defecto osteocondral desarrollaron fibrosis en los portales artroscópicos imposibilitando la visión y fueron desechados. Otro caballo fue eliminado del experimento porque el implante de PGLA se destruyó durante la

manipulación para su fijación y dos caballos implantados con colágena encapsulada no fue posible determinar la presencia del implante 6 meses después.

Las evaluaciones artroscópicas e histológicas completas fueron las siguientes: a) Grupo 1, PGLA: 5 articulaciones b) grupo 2, PGLA encapsulado: 5 articulaciones; c) grupo 3, colágena encapsulada: 3 articulaciones; d) grupo defecto osteocondral: 10 articulaciones; e) grupo control condral: 5 articulaciones; y f) dos articulaciones implantadas de células autólogas infectadas con Ad-GFP las cuales no formaron parte del análisis estadístico pero se describen los hallazgos.

7.6 Evaluaciones Artroscópicas

La correlación analítica entre los dos sistemas de evaluación artroscópica empleados (Oswestry y ICRS) resultó en un coeficiente de Spearman $\rho = 0.85$ ($p < 0.01$) indicativo de alta correlación.

Tanto la evaluación de Oswestry como ICRS muestran una mejor calificación de la suma de parámetros de reparación evaluados para los animales implantados con polímeros.

Los implantes con PGLA y PGLA encapsulado tienen una tendencia a presentar mejores evaluaciones en parámetros específicos.

A continuación se muestran los resultados obtenidos de cada uno de los parámetros observados en las diferentes evaluaciones

artroscópicas en las tablas 5 a 15. Las gráficas correspondientes se encuentran en el Anexo III. Sus diferencias o semejanzas fueron analizadas estadísticamente y están marcadas por los superíndices los cuales son significativos cuando indican diferencias entre los grupos ($p < 0.05$).

Como ejemplo artroscópico del nivel de reparación respecto a la superficie articular en la Figura 21 se muestra un implante de PGLA calificado como (0).

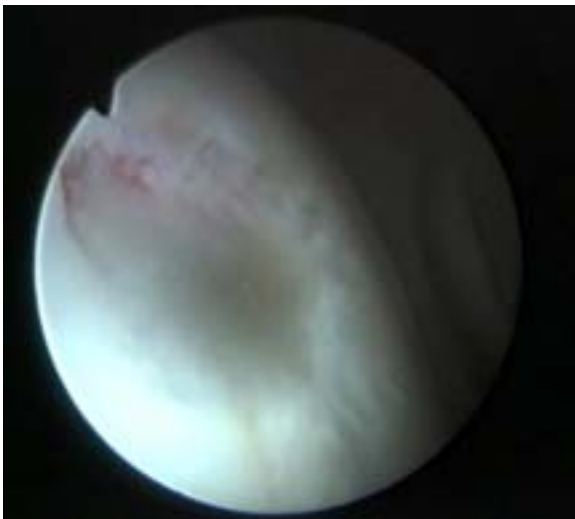


Figura 21. Figura que muestra la imagen artroscópica de un implante de PGLA calificado como (0 = sumido) respecto al nivel de reparación a la superficie articular en el Sistema de Oswestry.

Ejemplo artroscópico de la integración del implante al tejido adyacente se observa en la figura 22.



Figura 22. La integración del implante de PGLA encapsulado al tejido adyacente es Incompleta pero mayor al 25%, lo que la califica como 1 en el sistema de Oswestry.

Ejemplo artroscópico de la apariencia de la superficie del implante se observa en la figura 23.



Figura 23. Apariencia de la superficie del control condral el cual es moderadamente irregular equivalente a 1 en el sistema de Oswestry.

Ejemplo del color del implante se muestra en la figura 24.



Figura 24. Implante de colágena encapsulada con tonalidad amarilla correspondiente a 0 en el sistema de Oswestry. Nótese la sutura reabsorbible aun presente a las 4 semanas de implantado.

Ejemplo artroscópico de la evaluación de la rigidez del implante por medio de un gancho palpador que se observa en la figura 25.

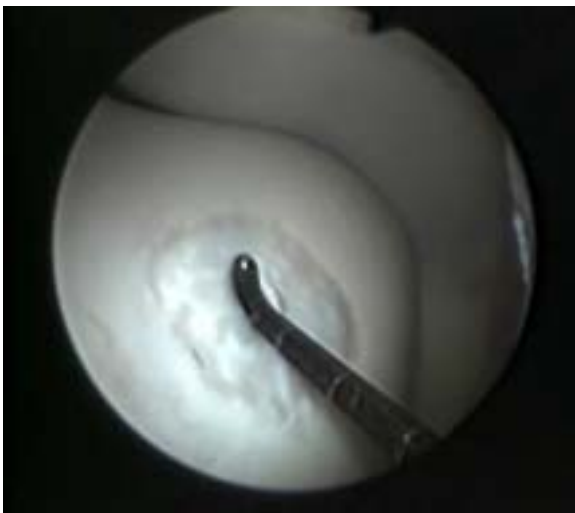


Figura 25. Defecto osteocondral sometido a evaluación de rigidez en el sistema de Oswestry por medio de un gancho palpador.

Tabla 5. Promedios y errores estándar para el nivel del tejido de reparación con respecto a la superficie articular (Oswestry).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Nivel del Tejido de Reparación	PGLA	5	1.6 ^a	0.2
	PGLA Encapsulado	5	1.8 ^a	0.2
	Colágena Encapsulada	7	1.4 ^{a,c}	0.3
	Defecto Osteocondral	9	0.6 ^b	0.2
	Control Condral	5	0.6 ^{b,c}	0.2

^{a, b, c} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Los Promedios cercanos a 0 indican el mínimo nivel de reparación.

Tabla 6. Promedios y errores estándar para la integración del tejido de reparación con el cartílago adyacente (Oswestry).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Integración del Tejido de Reparación	PGLA	5	1.6 ^a	0.2
	PGLA Encapsulado	5	1.6 ^a	0.2
	Colágena Encapsulada	7	1.6 ^a	0.2
	Defecto Osteocondral	10	0.9 ^b	0.1
	Control Condral	5	0.8 ^b	0.2

^{a, b} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican el menor nivel de integración.

Tabla 7. Promedios y errores estándar para evaluar la apariencia macroscópica del tejido de reparación (Oswestry).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Apariencia Macroscópica del Tejido de Reparación	PGLA	5	1.4 ^a	0.2
	PGLA Encapsulado	5	1.4 ^a	0.2
	Colágena Encapsulada	7	1.6 ^a	0.2
	Defecto Osteocondral	10	0.2 ^b	0.1
	Control Condral	5	0.2 ^b	0.2

^{a, b} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican la apariencia macroscópica más irregular.

Tabla 8. Promedios y errores estándar para evaluar el color del implante (Oswestry).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Color del Implante	PGLA	5	1.8 ^a	0.2
	PGLA Encapsulado	5	1.6 ^{a,b}	0.2
	Colágena Encapsulada	7	1.3 ^b	0.2
	Defecto Osteocondral	10	0.7 ^c	0.2
	Control Condral	5	1 ^{b,c}	0

^{a, b, c} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican que el implante es mas amarillo.

Tabla 9. Promedios y errores estándar para evaluar la rigidez del implante al tacto (Oswestry).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Rigidez del Tejido de Reparación	PGLA	5	1 ^a	0
	PGLA Encapsulado	5	1 ^a	0
	Colágena Encapsulada	7	1 ^a	0
	Defecto Osteocondral	10	0.6 ^a	0.2
	Control Condral	5	0.6 ^a	0.2

^a No se observó diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican un tejido de reparación mas blando.

Tabla 10. Promedios y errores estándar para calificar la suma de evaluaciones del tejido de reparación (Oswestry).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Suma de Evaluaciones	PGLA	5	7.4 ^a	0.8
	PGLA Encapsulado	5	7.4 ^a	0.8
	Colágena Encapsulada	7	6.9 ^a	0.5
	Defecto Osteocondral	10	3 ^b	0.5
	Control Condral	5	3.2 ^b	0.5

^{a, b} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican menor grado de reparación.

Tabla 11. Promedios y errores estándar para valorar el grado de reparación del defecto (ICRS)

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Grado de Reparación del Defecto	PGLA	5	3.2 ^a	0.2
	PGLA Encapsulado	5	3.2 ^a	0.2
	Colágena Encapsulada	7	3.3 ^a	0.2
	Defecto Osteocondral	10	1.9 ^b	0.2
	Control Condral	5	2.8 ^a	0.2

^{a, b} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican el menor porcentaje de tejido reparado.

Tabla 12. Promedios y errores estándar para valorar la integración al cartílago adyacente (ICRS).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Integración al cartílago adyacente	PGLA	5	3.6 ^a	0.2
	PGLA Encapsulado	5	3.8 ^a	0.2
	Colágena Encapsulada	7	3.7 ^a	0.3
	Defecto Osteocondral	10	1.6 ^b	0.3

Control Condral	5	1.8 ^b	0.4
-----------------	---	------------------	-----

^{a, b} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican menor integración.

Tabla 13. Promedios y errores estándar para valorar la apariencia macroscópica del tejido de reparación (ICRS).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Apariencia				
Macroscópica	PGLA	5	3 ^a	0.3
	PGLA Encapsulado	5	3.2 ^a	0.2
	Colágena			
	Encapsulada	7	3.4 ^a	0.3
Defecto Osteocondral		10	1.3 ^b	0.2
	Control Condral	5	1.8 ^b	0.4

^{a, b} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican mayor degeneración del implante.

Tabla 14. Promedios y errores estándar para calificar la suma de los parámetros evaluados (ICRS).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Calificación				
Total	PGLA	5	9.8 ^a	0.5
	PGLA Encapsulado	5	10.2 ^a	0.4
	Colágena			
	Encapsulada	7	10.4 ^a	0.5

Defecto Osteocondral	10	4.8 ^b	0.7
Control Condral	5	6.4 ^b	0.7

^{a, b} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican un menor grado de reparación general.

Tabla 15. Promedios y errores estándar para valorar el grado de reparación del tejido de nueva formación (ICRS).

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Grado de Reparación	PGLA	5	2 ^a	0
	PGLA Encapsulado	5	2 ^a	0
	Colágena			
	Encapsulada	7	1.9 ^a	0.1
	Defecto Osteocondral	10	3.1 ^b	0.2
	Control Condral	5	2.8 ^b	0.2

^{a, b} Superíndices distintos indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican un grado de reparación anormal.

7.7 Evaluación histológica del tejido de reparación

El tejido de reparación fue calificado con base a los parámetros de la tabla para la evaluación histológica (Mainil-Varlet, 2003).

Los promedios y errores estándar de los parámetros de la evaluación histológica se consignan en las tablas 16 a 20.

Las observaciones de diferencias significativas correspondieron a PGLA encapsulado y colágena encapsulada respecto del control condral y del defecto osteocondral.

Los implantes que satisfacen mejor los parámetros de evaluación histológicos totales de la reparación fueron PGLA encapsulado y colágena encapsulada.

Ejemplo de la morfología del tejido de reparación se observa en la figura 26.

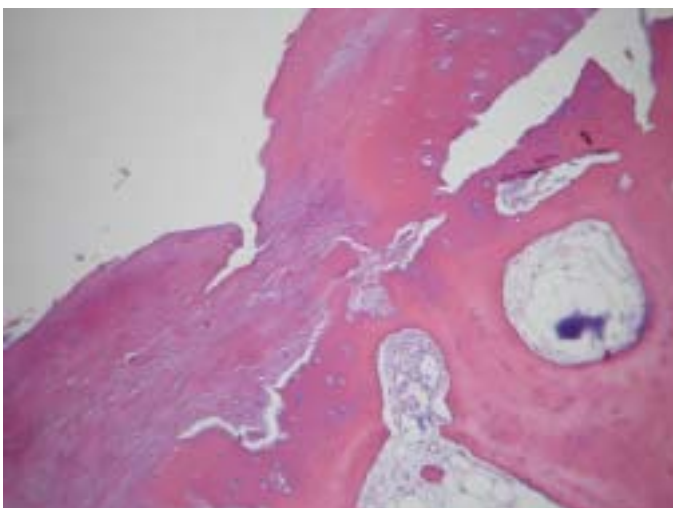


Figura 26 Control condral que muestra tejido de reparación conjuntivo fibroso equivalente a 0 para valoración morfológica de acuerdo con el Sistema de Mainil-Varlet (H&E 20x).

Ejemplo de poca afinidad por la tinción se muestra en la figura 27.



Figura 27. Implante de PGLA encapsulado con poca afinidad a

la tinción de Safranina-O que corresponde a 0 en la evaluación en el Sistema de Mainil-Varlet (Safranina-O 20x).

Ejemplo de la arquitectura de la superficie del tejido de reparación en la figura 28. (a) control condral con extrema irregularidad de la superficie. (b) PGLA encapsulado que presenta una superficie cercana a la normal.

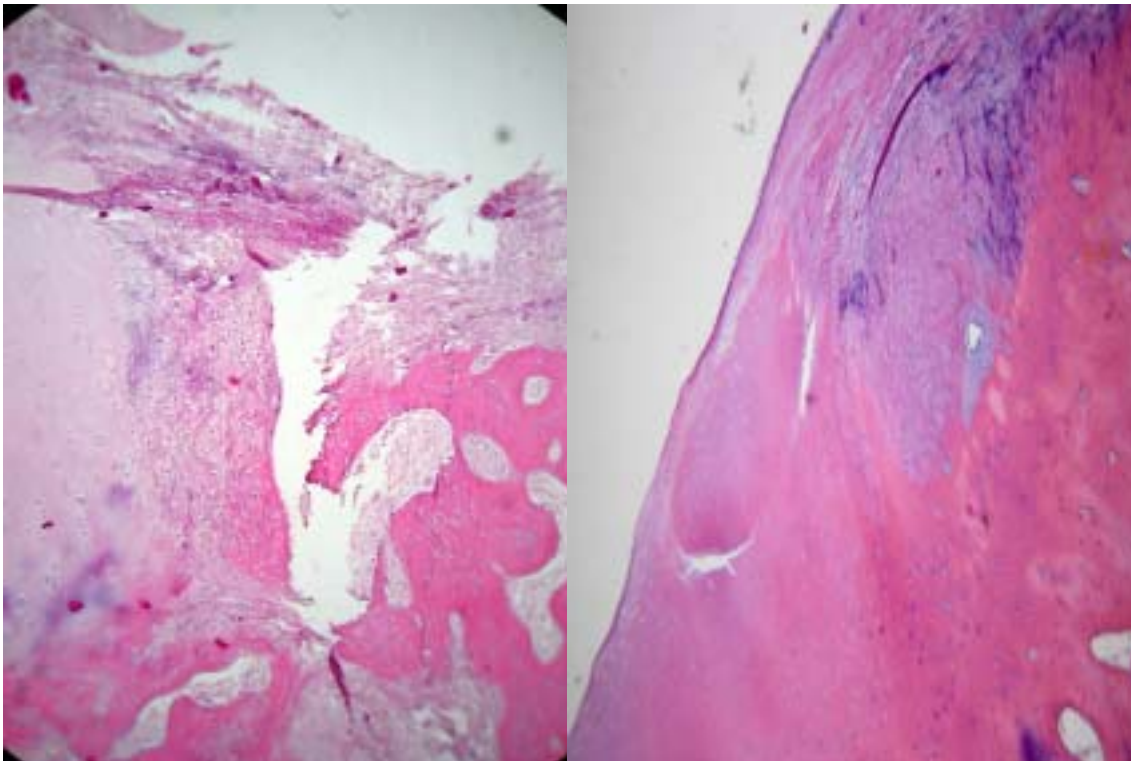


Figura 28 (a) Control condral con extrema irregularidad de la superficie equivalente a 0 en el Sistema de Mainil-Varlet (H&E 40x). (b) PGLA encapsulado que presenta una superficie cercana a la normal equivalente a 2 en el Sistema de Mainil-Varlet (H&E 40x).

Ejemplo de integración al tejido subyacente se muestra en la figura 29. (a) control condral sin tejido de reparación integrado al tejido subyacente. (b) PGLA encapsulado adherido al tejido subyacente.

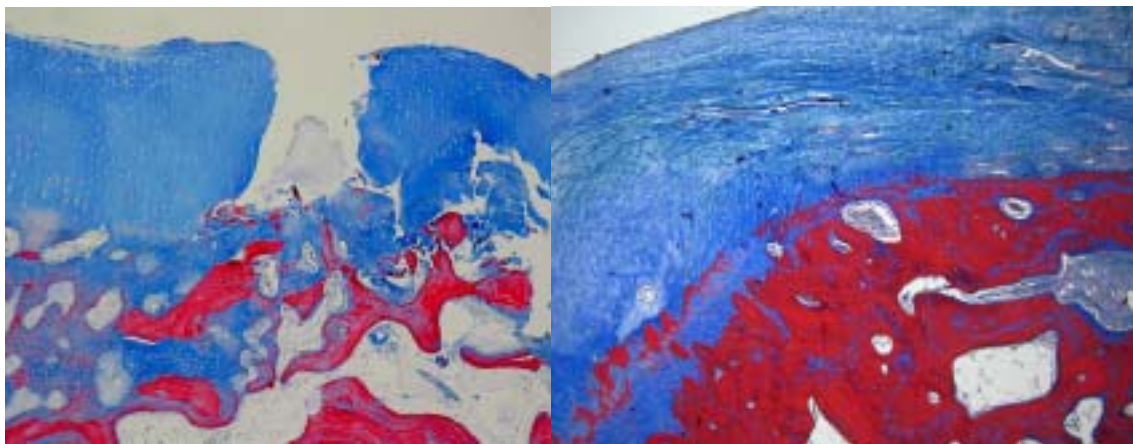


Figura 29. (a) control condral sin tejido de reparación integrado al tejido subyacente que corresponde a 0 en el Sistema de Mainil-Varlet (Tricrómica de Masson, 40x). (b) PGLA encapsulado adherido al tejido subyacente que corresponde a 1 en el Sistema de Mainil-Varlet (Tricrómica de Masson, 40x).

Tabla 16. Promedios y errores estándar de la valoración de la morfología del tejido de reparación.

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Morfología del	PGLA	5		

Tejido de Reparación				
			0.2 ^a	0.3
PGLA Encapsulado	5		1.9 ^b	0.2
Colágena Encapsulada	3		1.3 ^b	0.9
Defecto Osteocondral	10		0.5 ^b	0.1
Control Condral	5		0.5 ^b	0.1

^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos (p< 0.05)

Promedios cercanos a 0 indican tejido conjuntivo fibroso.

Tabla 17. Promedios y errores estándar de la valoración de la afinidad por la tinción por medio de la evaluación histológica del tejido de reparación.

Parámetro	Grupo	N*	Promedio	Error Estándar
Afinidad por la Tinción del Tejido de Reparación		20	0.8 ^a	0.1
	PGLA			
	PGLA Encapsulado	20	0.7 ^a	0.1
	Colágena Encapsulada	12	1 ^a	0
	Defecto Osteocondral	40	0.7 ^a	0.1
	Control Condral	20	0.6 ^a	0.1

^a Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos (p< 0.05)

N* Incluye las cuatro tinciones empleadas.

Promedios cercanos a 0 indica poca afinidad por la tinción.

Tabla 18. Promedios y errores estándar de la valoración de la arquitectura del tejido de reparación.

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Arquitectura del Tejido de Reparación			1.1 ^a	0.2
	PGLA	5		
	PGLA Encapsulado	5	1.6 ^a	0.1
	Colágena Encapsulada	3	1.7 ^a	0.3
	Defecto Osteocondral	10	0.9 ^a	0.1
	Control Condral	5	0.2 ^b	0.1

^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican una arquitectura muy irregular.

Tabla 19. Promedios y errores estándar de la valoración de la integración del tejido de reparación.

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Integración del Tejido de Reparación			0.8 ^a	0.1
	PGLA	5		
	PGLA Encapsulado	5	0.9 ^a	0.1
	Colágena Encapsulada	3	0.7 ^a	0.3
	Defecto Osteocondral	10	0.8 ^a	0.1
	Control Condral	5	0.2 ^a	0.1

^a Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican pobre integración al tejido subyacente.

Tabla 20. Promedios y errores estándar de la suma de los parámetros histológicos evaluados del tejido de reparación.

Parámetro	Grupo	N	Promedio	Error Estándar
Calificación				
Total de la				
Evaluación				
Histológica	PGLA	5	2.8 ^a	0.3
	PGLA Encapsulado	5	5.1 ^b	0.2
	Colágena		4.7 ^b	0.9
	Encapsulada	3		
	Defecto Osteocondral	10	2.8 ^a	0.1
	Control Condral	5	1.5 ^a	0.1

^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Promedios cercanos a 0 indican un tejido de reparación con baja calificación en la suma de los parámetros observados.

7.8 Transplante *in vivo* de células infectadas con AdGFP

Las células transgénicas con proteína verde fluorescente (GFP) fueron implantadas en un constructo de colágena encapsulada y observadas en el tejido de reparación obtenido a las 4 semanas después de ser implantadas. La transducción de GFP en condrocitos de caballo por medio del adenovirus se llevó a cabo a partir de las células expandidas en cultivo de monocapa, se infectaron con AdGFP y analizaron por citometría de flujo obteniendo una eficiencia del 85% a 10 moi. Las células infectadas fueron visibles en el microscopio de fluorescencia durante todo el cultivo sin cambios de intensidad de señal. El constructo formado por colágena, células de segundo pase infectadas con GFP y encapsuladas con matriz formada por

condrocitos autólogos fue implantado a los 7 días y recuperado del paciente a las 4 semanas.

No hubo cambios postoperatorios o infecciones en los dos caballos, al examinar las dos babillas clínicamente y por medio de artroscopia los defectos lucían opacos, grisáceos y gelatinosos. Ambos defectos llenaron el defecto condral experimental con tejido fibrocartilaginoso de reparación a nivel de la superficie del tejido cartilaginoso adyacente.

Las células que expresaron GFP en el tejido de reparación *in vivo* se observaron en microscopía de fluorescencia confocal la cual mostró una densidad de células marcadas fluorescentes en este tejido (Figura 30). Lo que significa que las células implantadas están presentes en el tejido de reparación.

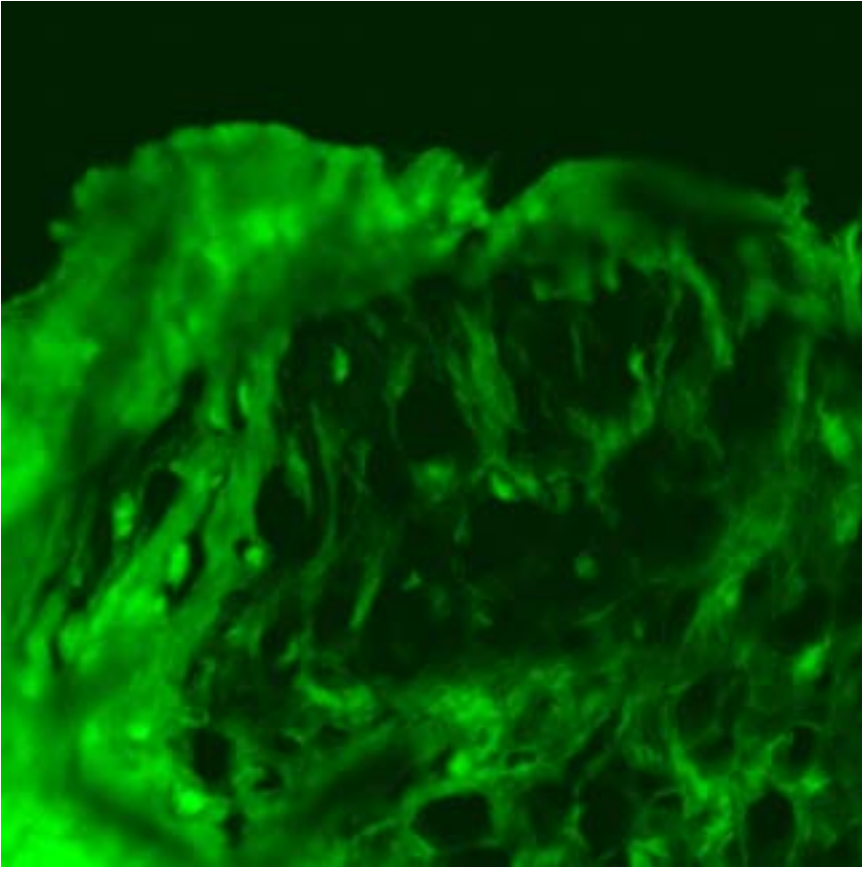


Figura 30. Microscopía de fluorescencia confocal. La imagen demuestra la fluorescencia verde de las células obtenidas del tejido marcado con AdGFP *in vivo* a las 4 semanas después de la implantación a (160x).

La tinción del tejido de reparación obtenido con el marcador MitoTracker® que se difundió pasivamente a través de la membrana plasmática de las células marcadas y se acumuló en las mitocondrias activas, demostró vitalidad y actividad de las células del tejido de reparación obtenido a las 4 semanas de implantado (Figura 31).

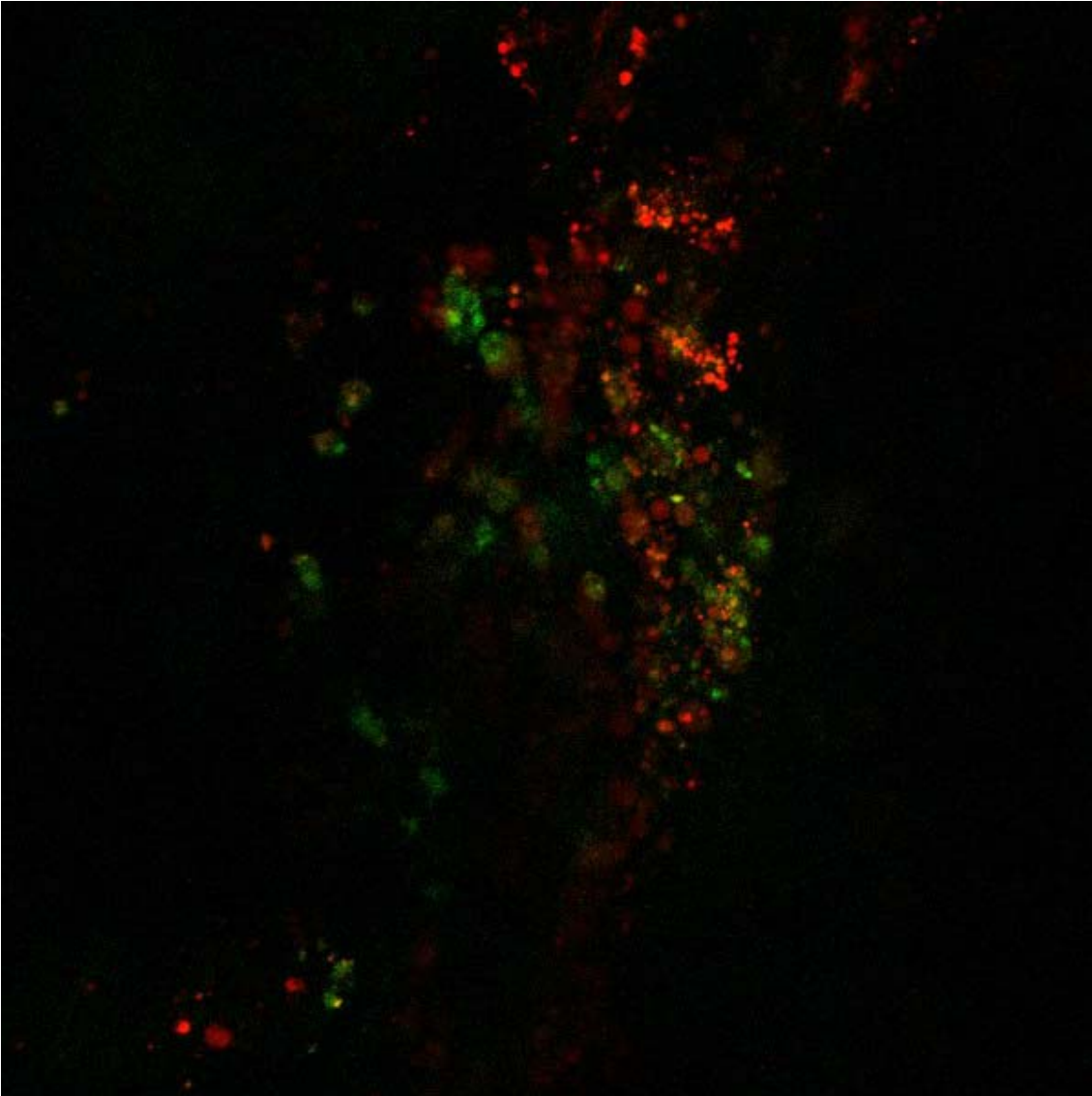


Figura 31. Se observan simultáneamente las señales fluorescentes del AdGFP (verde) y del pigmento del MitoTracker (rojo) observados en microscopía confocal de laser (Plan Neofluar 40X/1.30 aceite. Excitación de luz azul [488 nm, 40%]. División del rayo MBS: HFT UV/488/543/633).

VIII. DISCUSIÓN

Desde hace varios años, se han empleado diversas técnicas quirúrgicas (8, 11, 36, 84) encaminadas a restaurar la superficie articular dañada en caballos de uso deportivo. Sin embargo, los resultados clínicos no han sido del todo satisfactorios, principalmente a largo plazo. Dichas técnicas incluyen: artroplastía por abrasión, microfractura, mosaicoplastía, así como auto y aloinjertos osteocondrales entre otras. Algunos autores (22, 123), concluyen que aún no se cuenta con una técnica de restauración de la superficie articular, que induzca la formación de tejido de reparación con características bioquímicas y biomecánicas iguales a las del cartílago articular normal.

Sin embargo, en nuestra opinión, la implantación de condrocitos autólogos si constituye una opción viable para el tratamiento de defectos significativos del cartílago articular de la rodilla. La implantación a través de técnicas quirúrgicas abiertas transcurre con una morbilidad inaceptable. Es por ello que la técnica artroscópica de implantación de condrocitos autólogos elimina una cantidad substancial de los riesgos potenciales que se presentan en la cirugía abierta (124). Por otra parte, la artroscopía se considera el estado del arte para la evaluación clínica del cartílago articular. Esta técnica, a diferencia de la artrotomía es menos invasiva, produce menos dolor, menos riesgo de complicaciones y el periodo de recuperación es más corto (65).

En los implantes con células autólogas, resulta imprescindible la estandarización del método de obtención de tejido donador en el caballo. En el presente estudio se logró un importante avance mediante el empleo del sistema de fijación construido por los ingenieros biomédicos del INR para el establecimiento de un modelo artroscópico en cadáver a través del cual se llegó a la conclusión de que es conveniente obtener el cartílago donador de la tróclea medial del fémur por su fácil acceso, mejor visualización y mayor espesor del cartílago.

Durante el proceso de artroscopia para la implantación de cualquier constructo, un elemento de fundamental importancia resultó ser la cánula artroscópica de acero inoxidable con camisa y obturador romo, diseñada especialmente para este estudio en la medida de su gran utilidad como guía y transporte de dicho constructo.

La mayor parte de las técnicas actuales de implantación se basan fundamentalmente en la adhesividad superficial del polímero sembrado con células para su fijación al sitio de reparación. Sin embargo el riesgo de desprendimiento del constructo es alto y predispone a la pérdida de los beneficios de una técnica complicada y costosa. En nuestro estudio, aseguramos una estabilidad inmediata del constructo a través de la sutura de anclaje, esta técnica además presenta la ventaja de que se puede realizar mediante artroscopia a diferencia de la técnica de sutura de periostio (90).

Es evidente que una técnica de implantación de células de superficie articular autólogas confiable requiere de la certeza de contar con células viables a partir de los cultivos de las mismas. En este sentido la cuantificación con azul tripano al 4% bajo el microscopio de luz invertida y la técnica de fluorescencia utilizando calceína y hemodímero de etidio constituyeron opciones altamente recomendables para estos propósitos, aumentando significativamente la confiabilidad de los implantes. La persistencia de las células sembradas en los implantes también es demostrable a través de la formación de un tejido semejante al cartílago hialino a partir de polímeros sembrados e implantados en ratones atímicos, sin embargo, esta técnica resulta evidentemente mas complicada para constataciones en series quirúrgicas.

En nuestro estudio logramos establecer comparaciones confiables para la evaluación del desarrollo de los defectos condrales, osteocondrales y de las implantaciones de polímeros sembrados con células autólogas. Lo anterior fue posible gracias a la aplicación de la evaluación artroscópica de acuerdo con los sistemas diseñados en medicina humana por Oswestry y la Sociedad Internacional de Reparación de Cartílago (124). Estas calificaciones cuantitativas tuvieron coincidencias con las evaluaciones histológicas, en las cuales asimismo utilizamos un sistema basado en parámetros cuantificables de acuerdo con Mainil-Varlet (120). Para la evaluación confiable de la evolución de los implantes, resultaron de especial importancia los parámetros de arquitectura de la superficie y la integración al tejido subyacente y en este aspecto demostramos una ventaja

estadísticamente significativa mediante el uso de los polímeros implantados con células autólogas en comparación con la evolución espontánea de los defectos condrales y osteocondrales.

En nuestro estudio los parámetros correspondientes a la morfología y la afinidad por las tinciones no arrojaron resultados comparables con la arquitectura de la superficie y la integración al tejido subyacente. En otros estudios se han encontrado resultados semejantes, sin embargo, cuando la evaluación de la morfología y afinidad por la tinción se lleva a cabo a los 18 o 24 meses, los resultados dan respectivamente mayor caracterización histológica y mayor afinidad por la tinción. Esto sugiere que el tiempo en que se realiza la evaluación del tejido de reparación influye decisivamente en la misma, ya que aparentemente entre mas tiempo transcurre mas claras serán las características morfológicas e histoquímicas del tejido (125).

Durante la implantación artroscópica la distensión articular mediante fluido a presión, aunque indispensable, afecta la adhesividad de las células al polímero. Es por ello que se han ensayado otras alternativas que utilizan gas helio para distender la articulación (78). Sin embargo, se desconoce si dicho gas pueda tener algún efecto tóxico para las células. Nuestros intentos previos para implantar constructos con células autólogas resultaron negativos al buscar las células tiempo después de la implantación, justamente por la remoción celular durante el procedimiento quirúrgico previo. Los resultados que obtuvimos con los polímeros encapsulados son muy prometedores en

términos de la resistencia de las células en el constructo y por ello los polímeros sembrados y posteriormente encapsulados en una matriz extracelular densa de células autólogas, resulta altamente recomendable ya que estos fueron los implantes con mayor calificación de la suma del total de parámetros de reparación evaluados histológicamente.

La evidencia inequívoca de la presencia de células en el tejido de reparación que provienen de los cultivos autólogos originales, la obtuvimos mediante la infección del cultivo autólogo en monocapa con el adenovirus marcado con GFP, ya que dicho tejido infectado fue utilizado como implante en colágena encapsulada en las articulaciones de dos caballos. Cuatro semanas después logramos visualizar proteína verde fluorescente en el tejido implantado. Las células marcadas genéticamente prometen constituir una herramienta útil para el entendimiento de los procesos de reparación tisular, por lo que es necesario realizar futuras investigaciones que permitan la evaluación crítica de la reparación de la superficie articular basada en el trasplante de células autólogas.

El uso de las técnicas de reparación de cartílago articular basada en células autólogas y su seguimiento después de ser trasplantadas requiere de futuras investigaciones a mas largo plazo.

CONCLUSIONES

La implantación de condrocitos autólogos constituye una opción viable para el tratamiento de defectos significativos del cartílago articular de la rodilla del caballo.

1. La técnica artroscópica es adecuada para la implantación de células autólogas sembradas en polímeros para la reparación de la superficie articular.
2. La estabilidad del constructo implantado se logra por medio de sutura anclaje realizada artroscópicamente.
3. Las células autólogas sembradas en polímeros encapsulados en una matriz extracelular de las mismas células, son las que mejor resisten la turbulencia de fluidos durante el proceso de artroscopía.
4. Las células marcadas genéticamente son una herramienta útil para el seguimiento y evolución de los implantes de células autólogas en la reparación de defectos articulares.

REFERENCIAS

1. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. Clin Orthop 2002(402):21-37.
2. Hurtig MB, Fretz PB, Doige CE, Schnurr DL. Effects of lesion size and location on equine articular cartilage repair. Can J Vet Res 1988;52(1):137-46.
3. Hamerman D. Osteoarthritis. Orthop Rev 1988;17(4):353-60.
4. Dingle JT. Cartilage maintenance in osteoarthritis: interaction of cytokines, NSAID and prostaglandins in articular cartilage damage and repair. J Rheumatol Suppl 1991;28:30-7.
5. Aroen A, Loken S, Heir S, Alvik E, Ekeland A, Granlund OG, et al. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. Am J Sports Med 2004;32(1):211-5.
6. Stephen JO, White NA, 2nd, McCormick WH, Cowles RR, Corley KT. Risk factors and prevalence of injuries in horses during various types of steeplechase races. J Am Vet Med Assoc 2003;223(12):1788-90.
7. McIlwraith WC TG. Joint Disease in the Horse. Philadelphia: WB Saunders; 1996.
8. Frisbie DD. Current and future treatments of equine joint disease. In: AAEP, editor. Focus on Joints; 2004; Louisville, Ky: AAEP; 2004. p. 157-173.
9. Caron J. P. GRL. Principles and practices of joint disease treatment. In: Dyson MWRaSJS, editor. Diagnostic and management of lameness in the horse. 1st Edition ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2003. p. 746-763.

10. Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Ann Biomed Eng* 2004;32(1):148-59.
11. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* 2002;9(1):12-20.
12. Yang GY, Lu SB, Wang JF. [Long-term clinical observation on the repair of large articular cartilage defects of the hip and the knee with free autogeneous periosteum]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 2004;18(1):8-11.
13. WE R. Healing of articular cartilage in horses. *J Am Vet Med Assoc* 1970;157:1471-1479.
14. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 2004;37(1):97-110.
15. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, Rodkey WG, Steadman JR, et al. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop* 2003(407):215-27.
16. Morris EA, Treadwell BV. Effect of interleukin 1 on articular cartilage from young and aged horses and comparison with metabolism of osteoarthritic cartilage. *Am J Vet Res* 1994;55(1):138-46.
17. Mitchell C, Riley CB. Evaluation and treatment of an adult quarter horse with an unusual fracture of the humerus and septic arthritis. *Canadian Veterinary Journal* 2002;43(2):120-2.
18. Lee JW, Qi WN, Scully SP. The involvement of beta1 integrin in the modulation by collagen of chondrocyte-response to

- transforming growth factor-beta1. *Journal of Orthopaedic Research* 2002;20(1):66-75.
19. Gough MR, Munroe GA, Mayhew G. Diffusion of mepivacaine between adjacent synovial structures in the horse. Part 2: tarsus and stifle. *Equine Veterinary Journal* 2002;34(1):85-90.
 20. Fuller CJ, Ghosh P, Barr AR. Plasma and synovial fluid concentrations of calcium pentosan polysulphate achieved in the horse following intramuscular injection. *Equine Veterinary Journal* 2002;34(1):61-4.
 21. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Therapy* 2002;9(1):12-20.
 22. Litzke LE, Wagner E, Baumgaertner W, Hetzel U, Josimovic-Alasevic O, Libera J. Repair of extensive articular cartilage defects in horses by autologous chondrocyte transplantation. *Ann Biomed Eng* 2004;32(1):57-69.
 23. Farmer JM, et al. Chondral and osteochondral injuries. Diagnosis and management. *Clin Sports Med* 2001;20(2):299-319.
 24. Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol Supp* 2000;60:6-8.
 25. Maiotti M, et al. Correlation between osteoarthritic cartilage damage and levels of proteinases and proteinase inhibitors in synovial fluid from the knee joint. *Arthroscopy* 2000;16(5):522-6.
 26. Qiu YS, Shahgaldi BF, Revell WJ, Heatley FW. Observations of subchondral plate advancement during osteochondral repair: a

- histomorphometric and mechanical study in the rabbit femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(11):810-20.
27. Hunziker EB, EK.: p. Removal of proteoglycans from the surface of defects in articular cartilage transiently enhances coverage by repair cells. *J Bone Joint Surg Br* 1998;80(1):144-50.
 28. Hunziker EB. Biologic repair of articular cartilage. Defect models in experimental animals and matrix requirements. *Clin Orthop* 1999;367 Suppl:S135-46.
 29. Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable? *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7(1):15-28.
 30. Hunziker EB. Articular cartilage repair: problems and perspectives. *Biorheology* 2000;37(1-2):163-4.
 31. Hunziker EB. Growth-factor-induced healing of partial-thickness defects in adult articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9(1):22-32.
 32. Breinan HA, et al. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a canine model. *J Bone Joint Surg Am* 1997;79(10):1439-51.
 33. Hunziker EB, Quinn TM. Surgical removal of articular cartilage leads to loss of chondrocytes from cartilage bordering the wound edge. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl 2:85-92.
 34. Firth EC. Current State of Prevention of Equine Joint Injuries. In: AAEP, editor. *Focus on Joints*; 2004 July 22-24; Louisville, Ky: AAEP; 2004. p. 203-219.
 35. Johnstone B, Yoo J. Mesenchymal cell transfer for articular cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 2001;1(6):915-21.

36. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, et al. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Vet Surg* 1999;28(4):242-55.
37. Ibarra C, et al.: p. Tissue engineered meniscus: a potential new alternative to allogeneic meniscus transplantation. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):986-8.
38. Ibarra C, J.A. Koski, and R.F. Warren. Tissue engineering meniscus: cells and matrix. *Orthop Clin North Am* 2000;31(3):411-8.
39. Koski JA, et al. Meniscal injury and repair: clinical status. *Orthop Clin North Am* 2000;31(3):419-36.
40. Pollok JM, C. Ibarra, and J.P. Vacanti. Immunoisolation of xenogeneic islets using a living tissue engineered cartilage barrier. *Transplant Proc* 1997;29(4):2131-3.
41. Torzilli PA, Grigiene R, Borrelli J, Jr., Helfet DL. Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content. *J Biomech Eng* 1999;121(5):433-41.
42. Buckwalter JAaEBH. Orthopaedics. Healing of bones, cartilages, tendons, and ligaments: a new era. *Lancet* 1996; 348 Suppl(2):s1118.
43. Hauselmann HJaEBH. Lesions of articular cartilage and their treatment. *Schweiz Med Wochenschr* 1997;127(46):1911-24.
44. Hunziker EB, Driesang IM, Saager C. Structural barrier principle for growth factor-based articular cartilage repair. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2001(391 Suppl):S182-9.

45. Hunziker EBaLCR. Repair of partial-thickness defects in articular cartilage: cell recruitment from the synovial membrane. *J Bone Joint Surg Am* 1996;78(5):721-33.
46. Hung CT, Mauck RL, Wang CC, Lima EG, Ateshian GA. A paradigm for functional tissue engineering of articular cartilage via applied physiologic deformational loading. *Ann Biomed Eng* 2004;32(1):35-49.
47. Breinan HA, et al. Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes. *J Orthop Res* 2000;18(5):781-9.
48. Breinam H, et al. Autologous chondrocyte implantation in a canine model:change in composition of reparative tissue with time. *J Orthop Res* 2001;19(3):482-92.
49. Haggart GE, Hammond G. Treatment of degenerative arthritis of the hip joint in older patients. *Surg Clin North Am* 1954;99:829-37.
50. Goodrich LR, Nixon AJ, Fubini SL, Ducharme NG, Fortier LA, Warnick LD, et al. Epidural morphine and detomidine decreases postoperative hindlimb lameness in horses after bilateral stifle arthroscopy. *Vet Surg* 2002;31(3):232-9.
51. Howard RD, McIlwraith CW, Trotter GW. Arthroscopic surgery for subchondral cystic lesions of the medial femoral condyle in horses: 41 cases (1988-1991). *J Am Vet Med Assoc* 1995;206(6):842-50.
52. Roth JE, Nixon AJ, Gantz VA, Meyer D, Mohammed H. Pulsed carbon dioxide laser for cartilage vaporization and subchondral

- bone perforation in horses. Part I: Technique and clinical results. *Vet Surg* 1991;20(3):190-9.
53. Nixon AJ, Krook LP, Roth JE, King JM. Pulsed carbon dioxide laser for cartilage vaporization and subchondral bone perforation in horses. Part II: Morphologic and histochemical reactions. *Vet Surg* 1991;20(3):200-8.
 54. Vachon AM, McIlwraith CW, Trotter GW, Norrdin RW, Powers BE. Morphologic study of repair of induced osteochondral defects of the distal portion of the radial carpal bone in horses by use of glued periosteal autografts [corrected]. *Am J Vet Res* 1991;52(2):317-27.
 55. Shamis LD, Bramlage LR, Gabel AA, Weisbrode S. Effect of subchondral drilling on repair of partial-thickness cartilage defects of third carpal bones in horses. *Am J Vet Res* 1989;50(2):290-5.
 56. McIlwraith CW, Vachon A. Review of pathogenesis and treatment of degenerative joint disease. *Equine Vet J Suppl* 1988(6):3-11.
 57. Vachon A, Bramlage LR, Gabel AA, Weisbrode S. Evaluation of the repair process of cartilage defects of the equine third carpal bone with and without subchondral bone perforation. *Am J Vet Res* 1986;47(12):2637-45.
 58. Johnson LL. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res* 2001(391 Suppl):S306-17.
 59. Nehrer S, et al. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res* 1997;38(2):95-104.

60. Nehrer S, et al. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials* 1997;18(11):769-76.
61. Nehrer S, M. Spector, and T. Minas. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop* 1999(365):149-62.
62. Cao Y, et al. Comparative study of the use of poly(glycolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9(5):475-87.
63. Menche DS, Frenkel SR, Blair B, Watnik NF, Toolan BC, Yaghoubian RS, et al. A comparison of abrasion burr arthroplasty and subchondral drilling in the treatment of full-thickness cartilage lesions in the rabbit. *Arthroscopy* 1996;12(3):280-6.
64. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75(4):532-53.
65. McIlwraith ANC. Joint resurfacing: attempts at repairing articular cartilage defects. In: Trotter CMG, editor. *Joint Disease in the horse*. 1st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p. 317-334.
66. Kold SE, Hickman J, Melsen F. An experimental study of the healing process of equine chondral and osteochondral defects. *Equine Vet J* 1986;18(1):18-24.
67. Vachon A, McIlwraith CW, Trotter GW, Norrdin RW, Powers BE. Neochondrogenesis in free intra-articular, periosteal, and perichondrial autografts in horses. *Am J Vet Res* 1989;50(10):1787-94.

68. O'Driscoll SW, Fitzsimmons JS. The role of periosteum in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 2001(391 Suppl):S190-207.
69. Vachon AM, McIlwraith CW, Powers BE, McFadden PR, Amiel D. Morphologic and biochemical study of sternal cartilage autografts for resurfacing induced osteochondral defects in horses. *Am J Vet Res* 1992;53(6):1038-47.
70. Desjardins MR, Hurtig MB, Palmer NC. Incorporation of fresh and cryopreserved bone in osteochondral autografts in the horse. *Vet Surg* 1991;20(6):446-52.
71. Desjardins MR, Hurtig MB, Palmer NC. Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. *Vet Surg* 1991;20(6):434-45.
72. Scott GS, Crawford WH, Colahan PT. Arthroscopic findings in horses with subtle radiographic evidence of osteochondral lesions of the medial femoral condyle: 15 cases (1995-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2004;224(11):1821-6.
73. Frisbie DD, Oxford JT, Southwood L, Trotter GW, Rodkey WG, Steadman JR, et al. Early events in cartilage repair after subchondral bone microfracture. *Clin Orthop* 2003(407):215-27.
74. Norrdin RW, Kawcak CE, Capwell BA, McIlwraith CW. Subchondral bone failure in an equine model of overload arthrosis. *Bone* 1998;22(2):133-9.
75. Firth EC, Poulos PW. Retained cartilage in the distal radial physis of foals. *Vet Pathol* 1984;21(1):10-7.
76. Bodo G, Hangody L, Szabo Z, Peham C, Schinzel M, Girtler D, et al. Arthroscopic autologous osteochondral mosaicplasty for the

treatment of subchondral cystic lesion in the medial femoral condyle in a horse. *Acta Vet Hung* 2000;48(3):343-54.

77. Bodo G, Kaposi AD, Hangody L, Toth J, Bakos Z, Lukacs Z, et al. The surgical technique and the age of the horse both influence the outcome of mosaicplasty in a cadaver equine stifle model. *Acta Vet Hung* 2001;49(1):111-6.
78. Fortier LA, Mohammed HO, Lust G, Nixon AJ. Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *Journal of Bone & Joint Surgery - British Volume* 2002;84(2):276-88.
79. Pollok JM, C. Ibarra, and J.P. Vacanti. A new method of xenotransplantation using autologous cartilage as an immunoisolation barrier for the transplantation of xenogeneic islets of Langerhans. *Transplant Proc* 1997;29(1-2):909-11.
80. Pollok JM, et al. [Immuno-isolation of xenogenic islands of Langerhans in a tissue engineered autologous cartilage capsule]. *Zentralbl Chir* 1998;123(7):830-3.
81. Rodriguez A, et al. Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1999;103(4):1111-9.
82. Smith P, et al. Genetic enhancement of matrix synthesis by articular chondrocytes: comparison of different growth factor genes in the presence and absence of interleukin-1. *Arthritis Rheum* 2000;43(5):1156-64.
83. Shuler FD GH, Niyibizi C, Studer RK, Mi Z, Johnstone B, Robbins RD, Evans CH. Related Articles, Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth

- factor beta1 gene into articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2000;18(4):585-92.
84. Hurtig M, Pearce S, Warren S, Kalra M, Miniaci A. Arthroscopic mosaic arthroplasty in the equine third carpal bone. *Vet Surg* 2001;30(3):228-39.
 85. Goto H, et al. Transfer of lacZ marker gene to the meniscus. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81(7):918-25.
 86. Hutmacher. D. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000;21(24):2529-43.
 87. Bodo Gea. Management of subchondral cystic lesions with osteochondral grafts. In: AAEP, editor. Focus on joints; 2004; Louisville, Ky: AAEP; 2004. p. 200-201.
 88. Arevalo-Silva CA, et al. Influence of growth factors on tissue-engineered pediatric elastic cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126(10):1234-8.
 89. Brittberg M, Tallheden T, Sjogren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop* 2001(391 Suppl):S337-48.
 90. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889-95.
 91. Arevalo-Silva CA, et al. Internal support of tissue-engineered cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;126(12):1448-52.
 92. Arevalo-Silva CA, et al. The effect of fibroblast growth factor and transforming growth factor- beta on porcine chondrocytes and

tissue-engineered autologous elastic cartilage. *Tissue Engineering* 2001;7(1):81-8.

93. Cao Y, et al. Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997;100(2):297-302; discussion 303-4.
94. Fortier LA, Deak MM, Semevolos SA, Cerione RA. Insulin-like growth factor-I diminishes the activation status and expression of the small GTPase Cdc42 in articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2004;22(2):436-45.
95. Nehrer S, et al. Chondrocyte-seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. *Biomaterials* 1998;19(24):2313-28.
96. Langer R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: one laboratory's experience. *Acc Chem Res* 2000;33(2):94-101.
97. Cao YL, et al. Tissue-engineered nipple reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 1998;102(7):2293-8.
98. Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 2000;31(3):351-6.
99. Koski SRCIJ. Tissue/engineered ligament: cells, matrix, and growth factors. *Orthop Clin North Am* 2000;31(3):437-452.
100. Cao Y, Vacanti JP, Ma X, Paige KT, Upton J, Chowanski Z, et al. Generation of neo-tendon using synthetic polymers seeded with tenocytes. *Transplant Proc* 1994;26(6):3390-2.
101. Ibarra C KJWJ. Tissue engineering meniscus: cells and matrix. *Orthop Clin North Am* 2000;31(3):411-418.

102. Hunziker EB. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(6):432-63.
103. Elisseeff JJH, Lee A, Kleinman HK, Yamada Y. Biological response of chondrocytes to hydrogels. *Ann N Y Acad Sci* 2002;961:118-22.
104. Caterson EJ, Li WJ, Nesti LJ, Albert T, Danielson K, Tuan RS. Polymer/alginate amalgam for cartilage-tissue engineering. *Ann N Y Acad Sci* 2002;961:134-8.
105. Bryant SJ, Anseth KS. Hydrogel properties influence ECM production by chondrocytes photoencapsulated in poly(ethylene glycol) hydrogels. *J Biomed Mater Res* 2002;59(1):63-72.
106. Shuler FD, Georgescu HI, Niyibizi C, Studer RK, Mi Z, Johnstone B, et al. Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth factor beta1 gene into articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2000;18(4):585-92.
107. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46(3):704-13.
108. Maloney J. The clinician's prospective on tissue engineering. In: Sandell L.J. GAJ, editor. *Tissue Engineering in musculoskeletal clinical practice*. Santa Fe: American Academy of Orthopedic surgeons; 2004. p. 33-39.
109. Akens MK, Hurtig MB. Influence of species and anatomical location on chondrocyte expansion. *BMC Musculoskelet Disord* 2005;6(1):23.

110. Knight MM, Roberts SR, Lee DA, Bader DL. Live cell imaging using confocal microscopy induces intracellular calcium transients and cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284(4):C1083-9.
111. Fehr JE, Trotter GW, Oxford JT, Hart DA. Comparison of Northern blot hybridization and a reverse transcriptase-polymerase chain reaction technique for measurement of mRNA expression of metalloproteinases and matrix components in articular cartilage and synovial membrane from horses with osteoarthritis. *Am J Vet Res* 2000;61(8):900-5.
112. Vacanti CA, Kim W, Schloo B, Upton J, Vacanti JP. Joint resurfacing with cartilage grown in situ from cell-polymer structures. *Am J Sports Med* 1994;22(4):485-8.
113. Moran JM, Pazzano D, Bonassar LJ. Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9(1):63-70.
114. Beatty MW, Ojha AK, Cook JL, Alberts LR, Mahanna GK, Iwasaki LR, et al. Small intestinal submucosa versus salt-extracted polyglycolic acid-poly-L-lactic acid: a comparison of neocartilage formed in two scaffold materials. *Tissue Eng* 2002;8(6):955-68.
115. Hutcheon GA, Downes S, Davies MC. Interactions of chondrocytes with methacrylate copolymers. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9(12):815-8.
116. Anselme K, Bacques C, Charriere G, Hartmann DJ, Herbage D, Garrone R. Tissue reaction to subcutaneous implantation of a collagen sponge. A histological, ultrastructural, and immunological study. *J Biomed Mater Res* 1990;24(6):689-703.

117. Fox DB, Cook JL, Arnoczky SP, Tomlinson JL, Kuroki K, Kreeger JM, et al. Fibrochondrogenesis of free intraarticular small intestinal submucosa scaffolds. *Tissue Eng* 2004;10(1-2):129-37.
118. Pollok JM, Lorenzen M, Kolln PA, Torok E, Kaufmann PM, Kluth D, et al. In vitro function of islets of Langerhans encapsulated with a membrane of porcine chondrocytes for immunoisolation. *Dig Surg* 2001;18(3):204-10.
119. Cui P, Chen W, Luo J. [Fabrication of cartilage in predetermined shapes from human nasoseptal chondrocytes with tissue engineering method]. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi* 2001;36(1):22-4.
120. Mainil-Varlet P, Aigner T, Brittberg M, Bullough P, Hollander A, Hunziker E, et al. Histological assessment of cartilage repair: a report by the Histology Endpoint Committee of the International Cartilage Repair Society (ICRS). *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl 2:45-57.
121. McIlwraith CW. Experiences in diagnostic and surgical arthroscopy in the horse. *Equine Vet J* 1984;16(1):11-9.
122. Smith GD, Taylor J, Almqvist KF, Erggelet C, Knutsen G, Garcia Portabella M, et al. Arthroscopic assessment of cartilage repair: a validation study of 2 scoring systems. *Arthroscopy*. 2005 Dec;21(12):1462-7.
123. Ochi M, Adachi N, Nobuto H, Yanada S, Ito Y, Agung M. Articular cartilage repair using tissue engineering technique--novel approach with minimally invasive procedure. *Artif Organs*. 2004 Jan;28(1):28-32.

124. Smith GD, Knutsen G, Richardson JB. A clinical review of cartilage repair techniques. *J Bone Joint Surg Br.* 2005 Apr;87(4):445-9.
125. Barnewitz D, Endres M, Kruger I, Becker A, Zimmermann J, Wilke I, et al. Treatment of articular cartilage defects in horses with polymer-based cartilage tissue engineering grafts. *Biomaterials.* 2006 May;27(14):2882-9.
126. He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(5):2509-14.
127. Hirschmann F VE, Wirth D, Bauwens S, et al. Vital marking of articular chondrocytes by retroviral infection using green fluorescence protein. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002;10:109-118.
128. Mierisch CM, Wilson HA, Turner MA, Milbrandt TA, Berthoux L, Hammarskjold ML, et al. Chondrocyte transplantation into articular cartilage defects with use of calcium alginate: the fate of the cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2003 Sep;85-A(9):1757-67.

ANEXO I

Transplante del constructo de PGA y condrocitos de caballo en ratones atímicos

Se implantaron subcutáneamente 3 ratones atímicos con condrocitos que se obtuvieron de cartílago articular de caballos de rastro. Una vez cosechados los condrocitos del segundo pase, se sembraron en discos de 8x0.5mm de PGA y se mantuvieron en el incubador de 5% de CO₂ a 37°C en 85% de humedad relativa, en constante movimiento por 7 días. El constructo fue implantado subcutáneamente en el dorso de ratones atímicos bajo un procedimiento quirúrgico previamente descrito por Cui *et al* (119) (Figura 32). Se obtuvo el tejido de neoformación a las 4 semanas y se sometió a análisis macroscópico, histoquímico y de microscopía electrónica de transmisión. La mitad de la muestra se fijó en glutaraldehído al 2.5% para microscopía electrónica de transmisión y la otra mitad se fijó en formol amortiguado al 10% para realizar cortes histológicos que se tiñeron con hematoxilina eosina, safranina O y tricrómica de Masson.

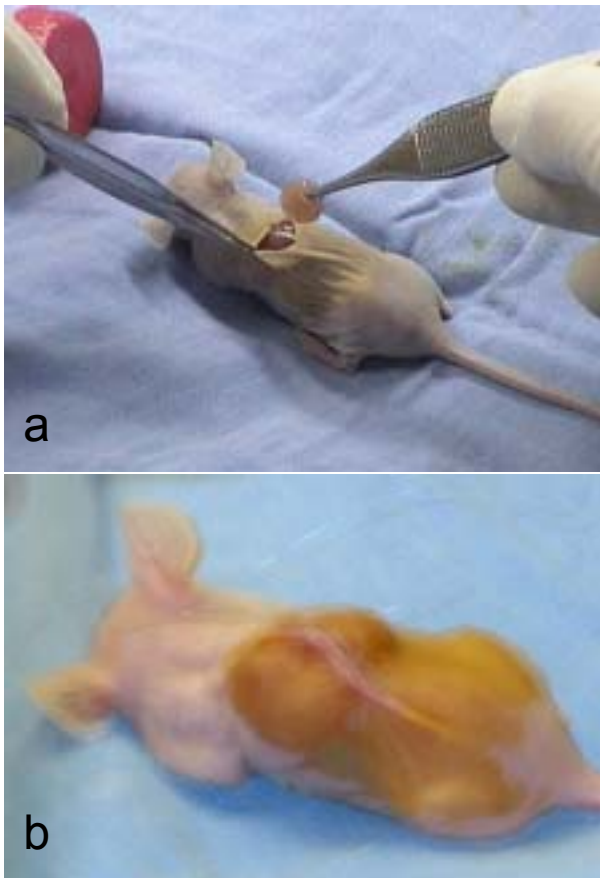


Figura 32. a) Implantación quirúrgica subcutánea de condrocitos de caballo en ratones atímicos. b) implante subcutáneo antes de ser evaluado a las 4 semanas.

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las muestras de tejido de neoformación obtenido se fijaron en glutaraldehído al 2.5%. El tejido fue posfijado con tetraóxido de osmio, deshidratado gradualmente en series de etanol y finalmente incluido en resina Epon 812. Se obtuvieron secciones semifinas que se tiñeron con azul de toluidina al 1% para ser examinadas bajo microscopía de luz óptica. Las áreas seleccionadas se cortaron con un ultramicrotomo

(Leica Ultracut, GER) y contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Los cortes se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión (Tecnai 10, Philips, NETH).

ANEXO II

Infección celular con adenovirus-GFP

Se obtuvieron siete muestras adicionales de cartílago articular de la rodilla de caballos de rastro. El cartílago fue procesado de la manera previamente descrita para su cultivo *in vitro*. Los cultivos celulares en monocapa se cosecharon a las 4 semanas. La viabilidad celular se determinó por la técnica de exclusión de azul de tripano al 0.4% en una cámara de Neubauer bajo el microscopio invertido (Axiovert 25, Zeiss, Alemania). La viabilidad determinada fue del 90% y la muestra fue dividida en dos partes, la primera fue sembrada en una caja de 6 pozos de poliestireno a una concentración de 2×10^5 células por pozo, considerándolas el cultivo primario, la segunda parte de la muestra 1×10^6 células, se sembraron en una caja de cultivo de poliestireno de 75 cm^2 . Ambas se cultivaron con M199 suplementado con SFB al 10% y antibiótico/antimicótico al 1% y se mantuvieron en el incubador de 5% de CO_2 a 37°C con 85% de humedad relativa, cambiando el medio cada tercer día.

El adenovirus-EGFP (Ad-GFP) con replicación deficiente producido mediante el AdEasy system, fue proporcionado por el Laboratorio de Terapia Celular del INR (1). Es un adenovirus del serotipo humano 5 (ΔE1a , ΔE1b parcialmente, ΔE3), armado con un

promotor de citomegalovirus (CMV) que controla la expresión del gen que es una variante de GFP silvestre denominado EGFP-C1 (126). Esta variante del gen silvestre fue manipulada para producir fluorescencia de mayor intensidad en células de mamíferos. El título original del lote utilizado de 5×10^9 pfu/mL, fue calculado por el método de placa, el cual se basa en la cuantificación de unidades infecciosas.

Para recibir la suspensión viral, los pozos con 2×10^5 células se lavaron con PBS y después se agregó la suspensión viral que fue preparada con 500 μ L de M199 suplementado con 1% SFB y antibiótico/antimicótico al 1% adicionado con Ad-GFP a 25 y 50 múltiplos de infección viral (moi). Las células infectadas se incubaron durante 2 horas a 5% de CO₂ a 37°C, con 85% de humedad relativa agitando suavemente cada 15 min. Se eliminó la suspensión viral y se lavó el paquete celular con PBS y se sumergió en M199 suplementado con 10% de SFB durante 48 horas bajo las mismas condiciones de incubación. El cultivo fue monitoreado constantemente para detectar la expresión de Ad-GFP bajo el microscopio invertido de fluorescencia con un filtro de 480 nm. Concluida la incubación, se obtuvo el paquete celular mediante tratamiento con tripsina al 0.25% con EDTA 0.1mM para ser lavado con M199 suplementado con antibiótico/antimicótico al 1%. Se centrifugó a 1,200 rpm por 12 minutos, se realizó un lavado con PBS y una segunda centrifugación a 1,200 rpm por 10 minutos. La muestra se dividió en dos partes, la primera se utilizó para cuantificar la expresión de GFP (1×10^5 células) agregándole 5 μ L de yoduro de propidio para determinar viabilidad y

fijándolas con 900 μ L de formaldehído al 4%. La segunda parte sirvió para evaluar el ciclo celular con el kit de DNA Cycle Test Plus (BD, México). La citometría de flujo se llevó a cabo en un FACS Calibur Flow Cytometer (BD, San Jose, CA, USA) y se analizó con el CellQuest Software (BD, Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA). Para el análisis de transducción se evaluó un mínimo de 10,000 células y 30,000 células para la evaluación del ciclo celular (Figura 32).

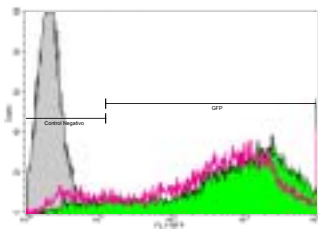


Figura 33. Histograma del porcentaje de células de caballo en cultivo infectadas con Ad-GFP. Se presentan con color gris las células no infectadas o control, en rosa las células infectadas con 25 moi y en verde las infectadas con 50 moi.

La eficiencia de transducción del Ad-GFP establecida mediante citometría de flujo fue entre 85% y 90%. El aumento de eficiencia con 50 moi no fue significativo y por ello se decidió llevar a cabo los experimentos con 25 moi en el cultivo de primer pase y con 10 moi en el cultivo de segundo pase.

Para el caso particular del polímero de colágena, se utilizó Ad-GFP a 10 moi. Los condrocitos genéticamente modificados con Ad-GFP fueron evaluados mediante microscopía de fluorescencia y CLSM. Más del 90% de células fueron positivas para fluorescencia a 10 moi (127). El vector de adenovirus se mantuvo diploide lo que

permitió su uso para la reparación articular de los caballos experimentales. Las células se evaluaron cada tercer día con el microscopio de fluorescencia hasta su implantación (Figura 33). El tejido de nueva formación obtenido de biopsias osteocondrales 4 semanas después de su implantación se evaluó histológicamente y por CLSM para determinar la presencia de Ad-GFP.

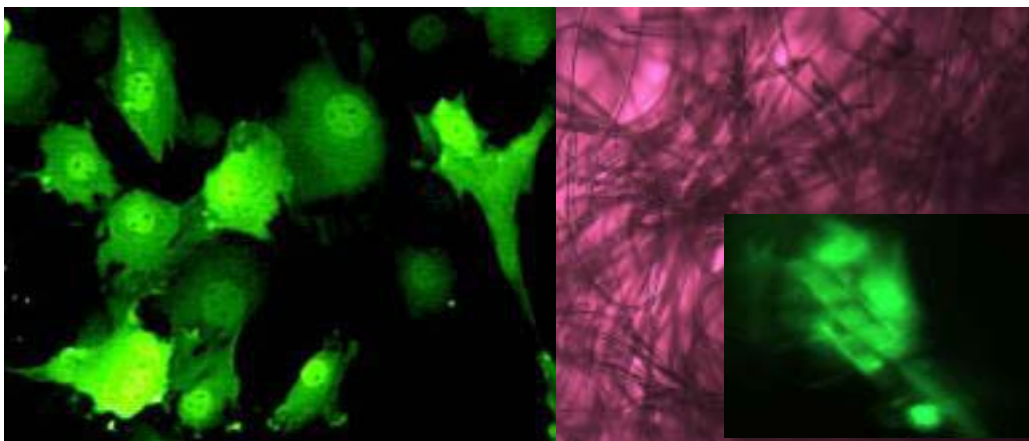


Figura 34. a) Evidencia de Ad-GFP en las células previamente a ser colocadas en el polímero. (CLSM 40x), b) células adheridas al PGLA observadas en un microscopio de fluorescencia de contraste de fases (40x).

Microscopia Confocal (CLSM)

El microscopio confocal, empleado en este estudio, incorpora dos diafragmas para una óptima resolución axial y por medio de combinación de planos logra una imagen en tercera dimensión con fluorocromatografía (CLSM, LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Alemania)

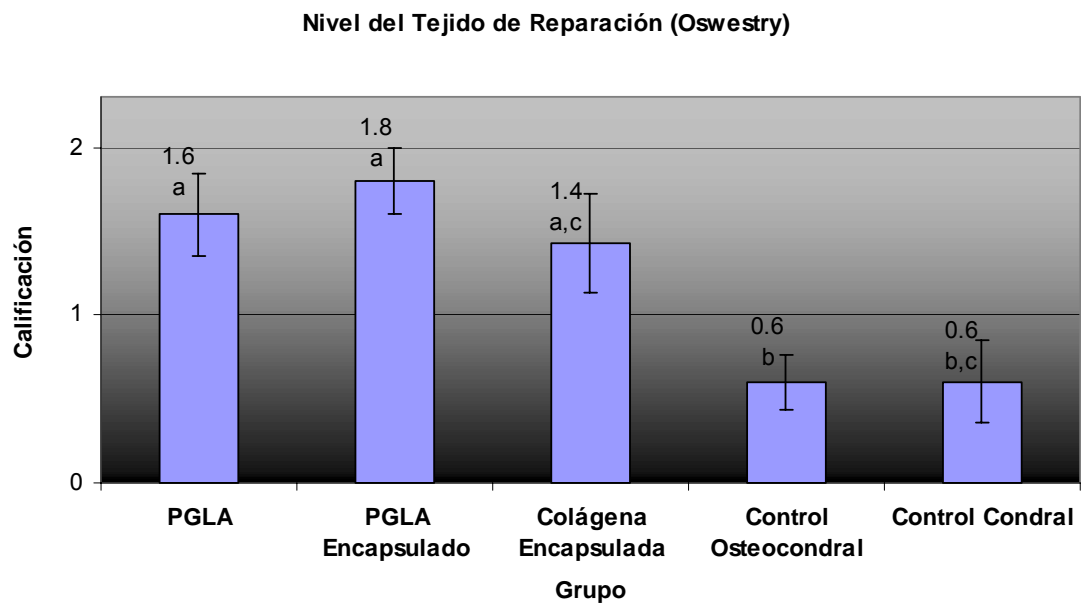
(128). El tejido que se observó tanto en fresco como fijado en glutaraldehído al 2.5%. El tejido de neoformación resultante del implante con condrocitos infectados con Ad-GFP fue estudiado por este método.

Se prepararon laminillas con cortes de 4 μ de espesor para su observación directa en el CLSM y también con mitocondrias marcadas con sonda fluorescente (Mito Tracker Red 580 [M-22425], Molecular probes, Invitrogen, Gibco, NY, USA). Para esta última opción, las laminillas se incubaron en concentraciones sub micromolares de la sonda, las cuales se difunden a través de la membrana plasmática y se acumulan en la mitocondria. Una vez con las mitocondrias marcadas, las muestras se pueden fijar con aldehídos. La solución base se preparó en DMSO a 1mM y se almacenó a -20°C en la oscuridad. De esta solución, se adicionó una dilución de 1:1000 al tejido y se incubó a temperatura ambiente por 1 h, después se lavó 3 veces con PBS y se observó en el CLSM.

1. Valentín Martínez López. Evaluación por citometría de flujo de la transferencia génica adenoviral en células aisladas de cartílago articular de caballo. Tesis de Licenciatura, FES-Iztacala, Nov 2004.

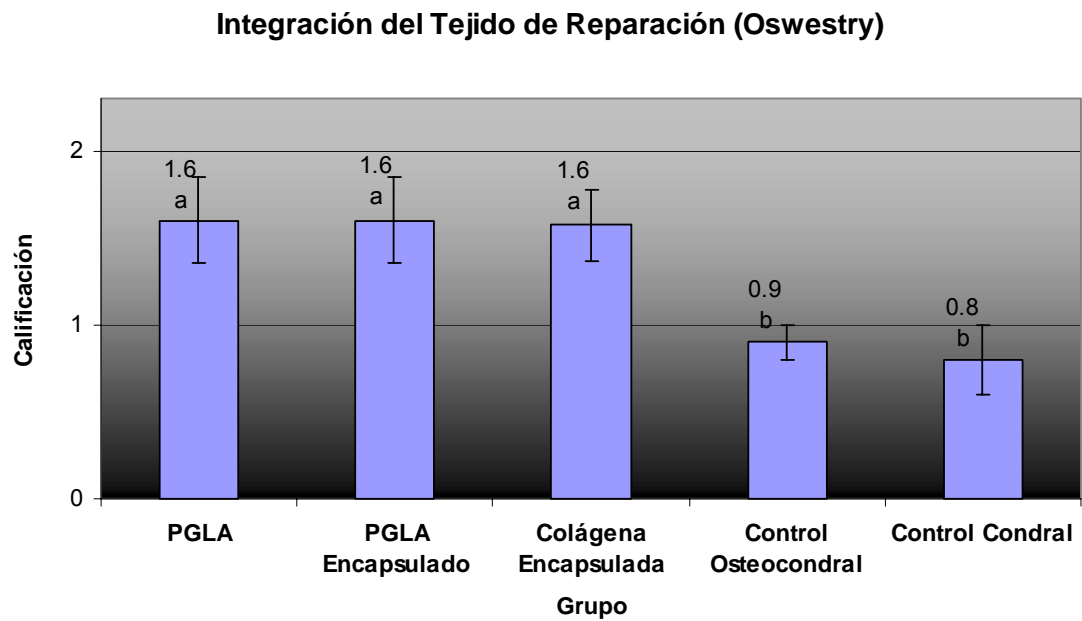
2. ANEXO III

Gráfica 1. Promedios y errores estándar para el nivel de tejido de reparación con respecto a la superficie articular observados por artroscopía (Oswestry) en los grupos evaluados.



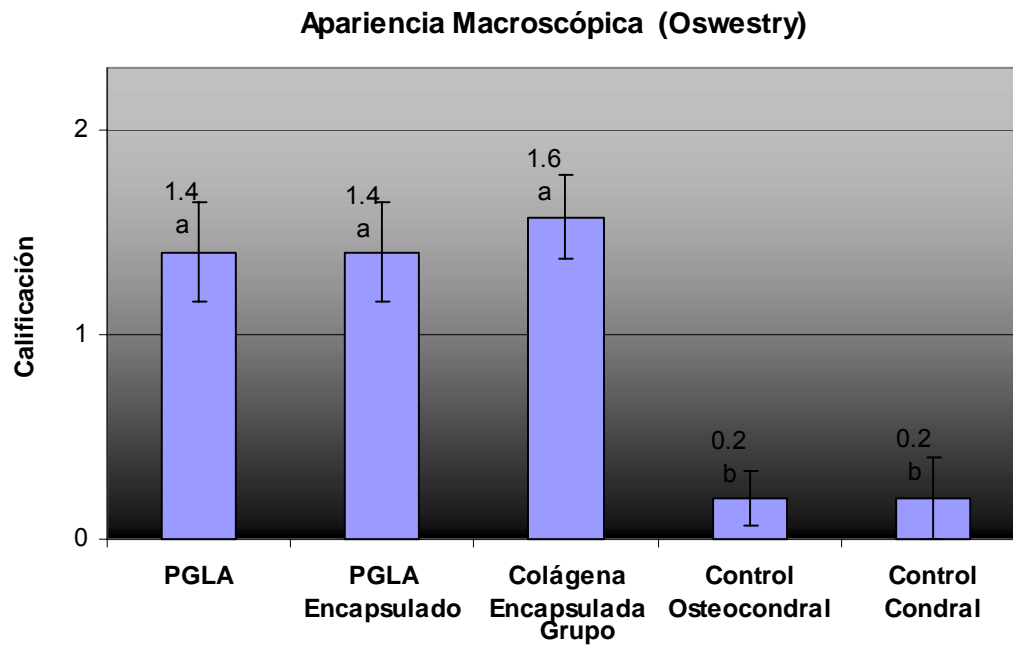
a, b, c Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 2. Promedios y errores estándar para la integración del tejido de reparación al tejido adyacente observados por artroscopía (Oswestry) en los grupos evaluados.



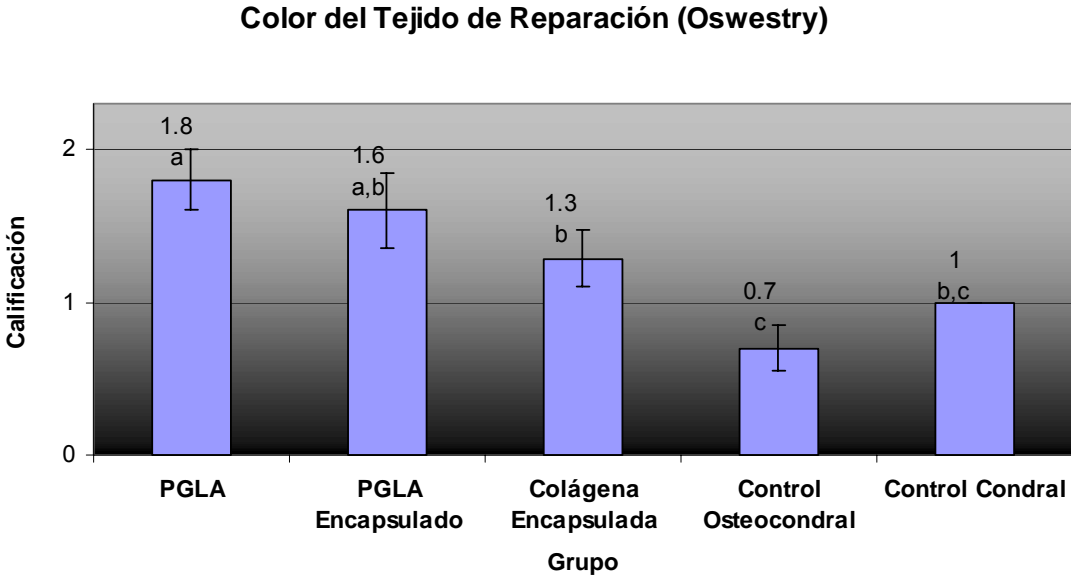
^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 3. Promedios y errores estándar para evaluar la apariencia macroscópica del tejido de reparación observado por artroscopía (Oswestry) en los grupos evaluados.



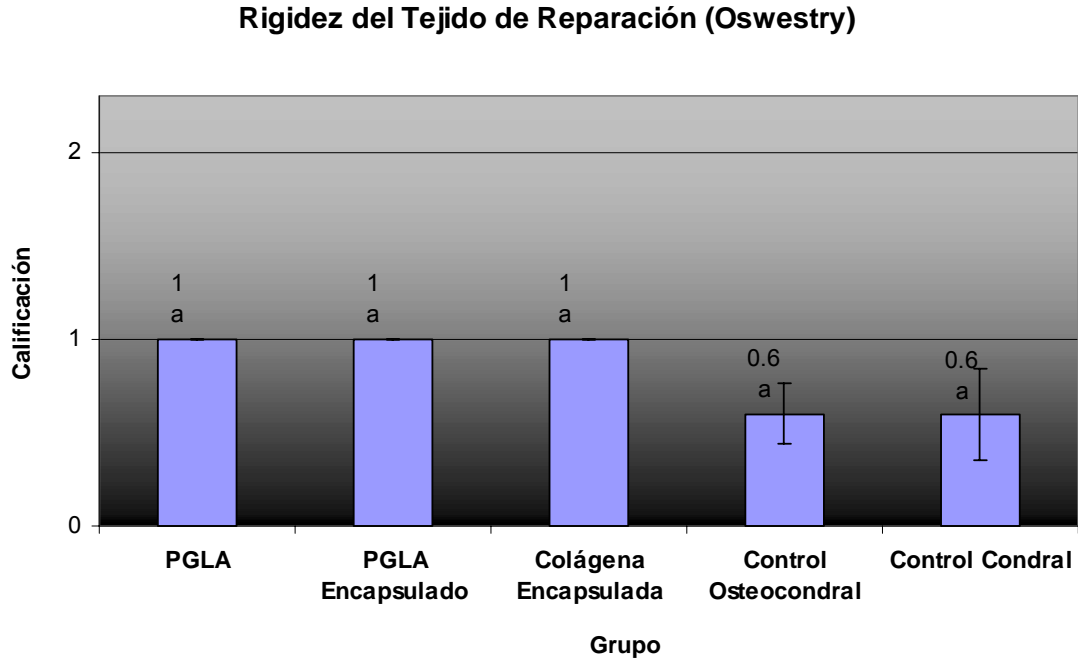
^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 4. Promedios y errores estándar para evaluar el color del tejido de reparación observado por artroscopía (Oswestry) en los grupos evaluados.



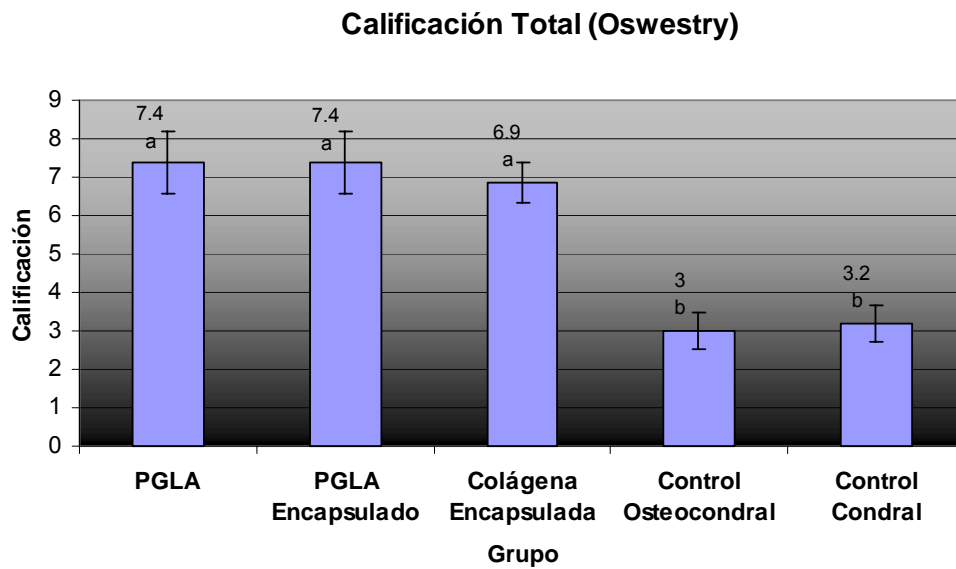
^{a, b, c} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 5. Promedios y errores estándar para evaluar la rigidez del tejido de reparación observado por artroscopía (Oswestry) en los grupos evaluados.



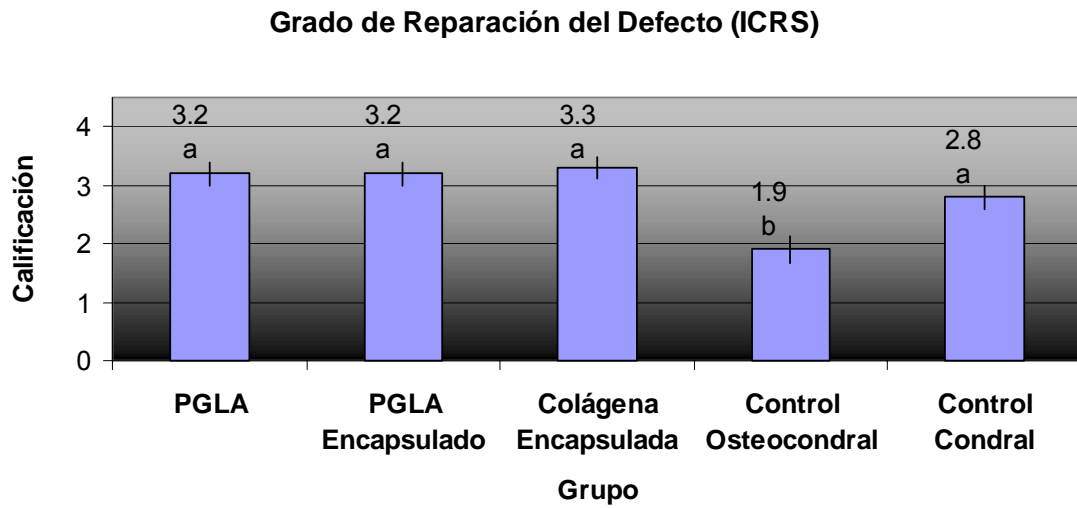
^a No se observó diferencia significativa entre los grupos ($p > 0.05$)

Gráfica 6. Promedios y errores estándar para valorar la suma de evaluaciones del tejido de reparación observado por artroscopía (Oswestry) en los grupos evaluados.



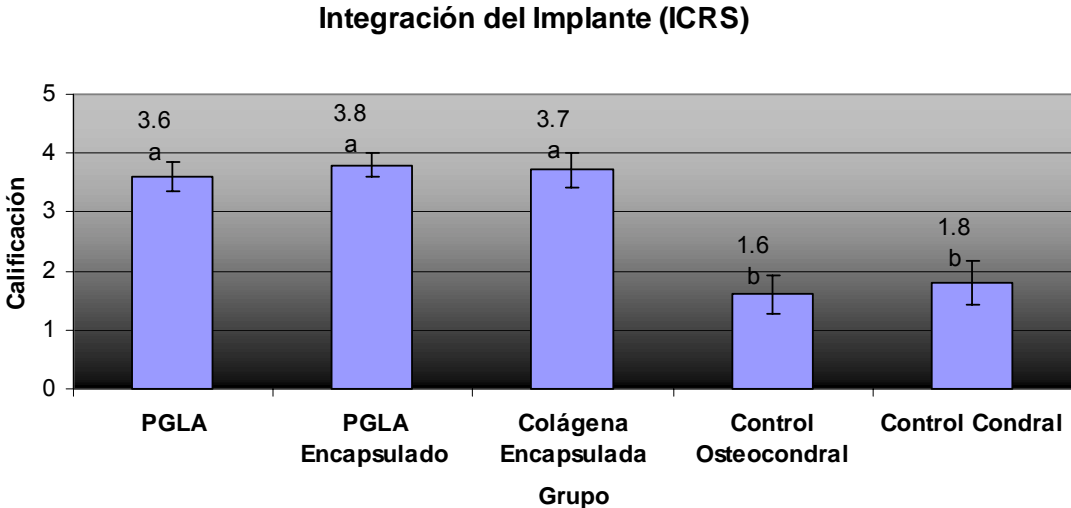
^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 7. Promedios y errores estándar para valorar el grado de reparación del defecto por artroscopía (ICRS) en los grupos evaluados.



^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

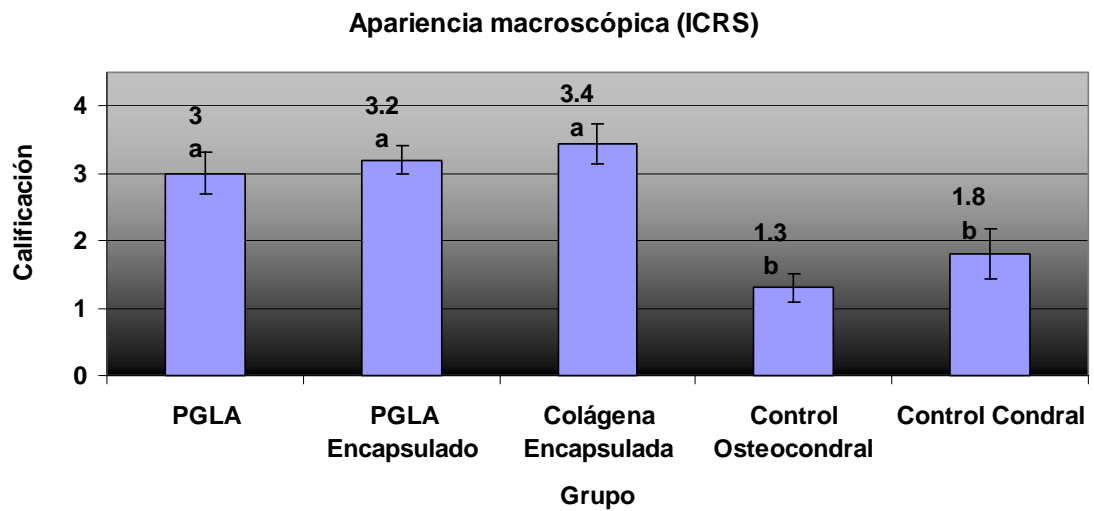
Gráfica 8. Promedios y errores estándar para valorar la integración del tejido de reparación al cartílago adyacente por artroscopía (ICRS) en los grupos evaluados.



a, b

Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

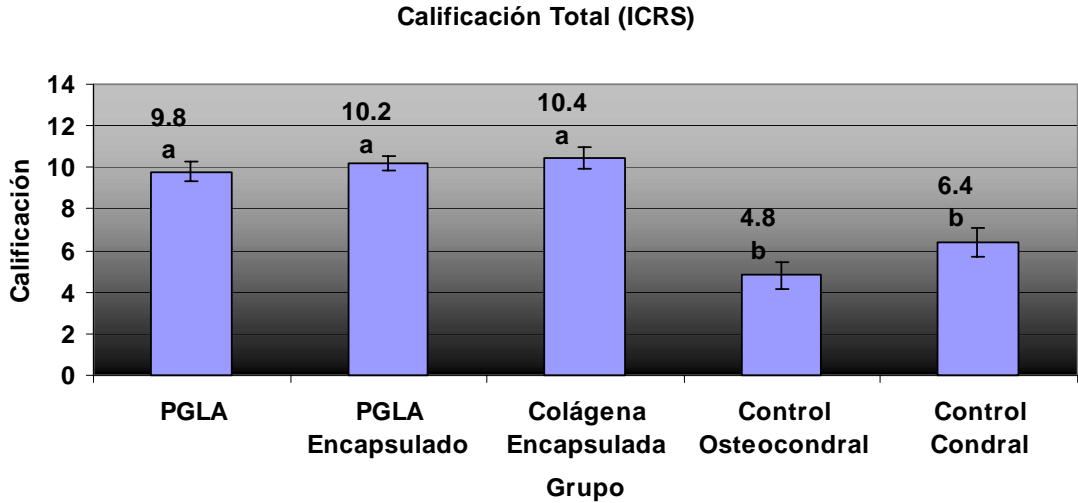
Gráfica 9. Promedios y errores estándar para valorar la apariencia macroscópica del tejido de reparación por artroscopía (ICRS) en los grupos evaluados.



a, b

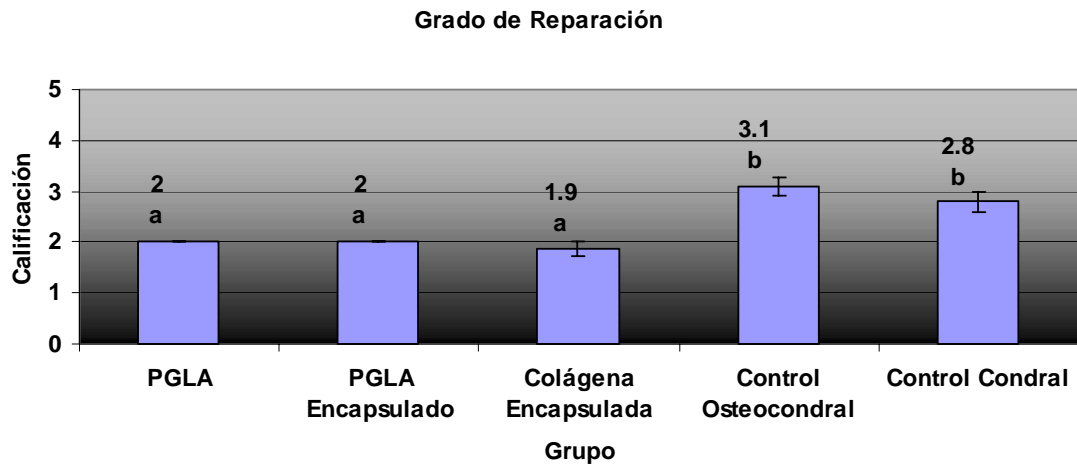
Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 10. Promedios y errores estándar para valorar la calificación total del tejido de reparación por artroscopía (ICRS) en los grupos evaluados.



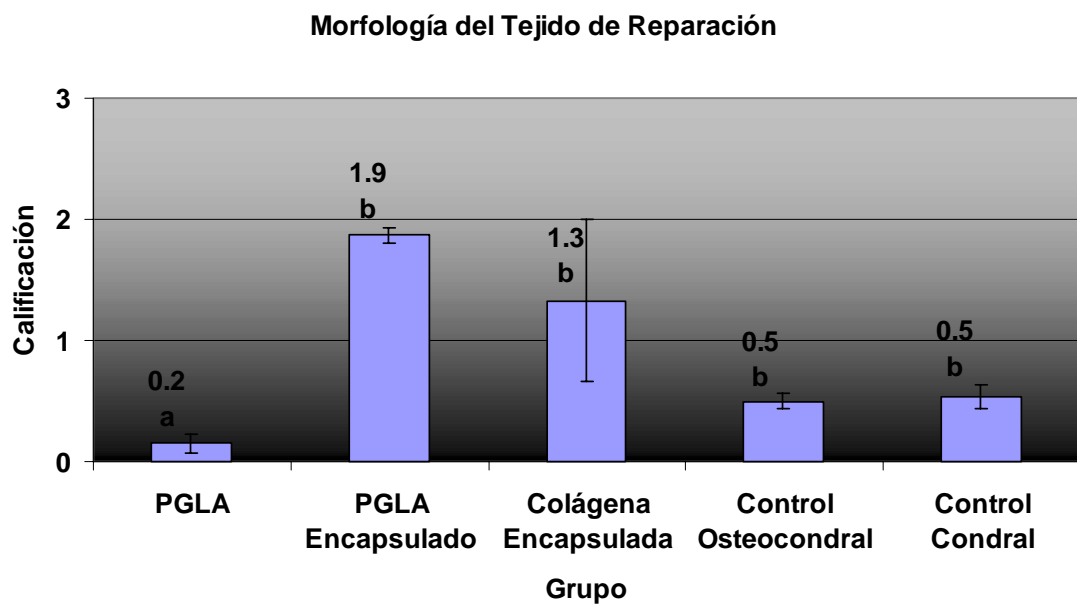
^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 11. Promedios y errores estándar para valorar el grado de reparación del tejido de nueva formación por artroscopía (ICRS) en los grupos evaluados.



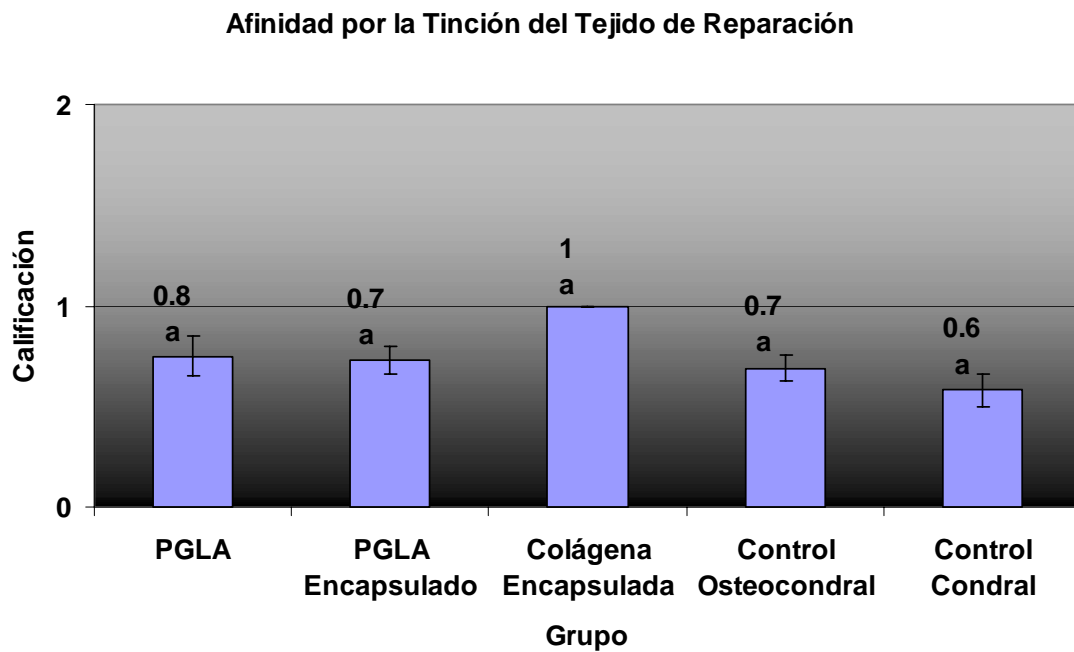
^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 12. Promedios y errores estándar de la valoración de la morfología por medio del sistema de calificación, para la evaluación histológica del tejido de reparación (Mainil-Varlet).



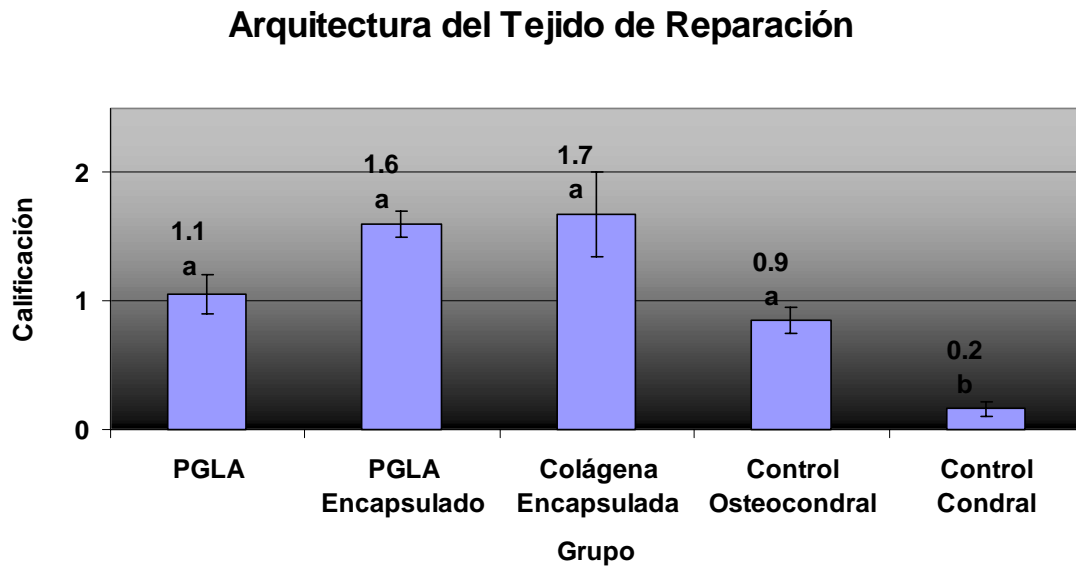
^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 13. Promedios y errores estándar de la valoración de la afinidad por la tinción por medio del sistema de calificación, para la evaluación histológica del tejido de reparación (Mainil-Varlet).



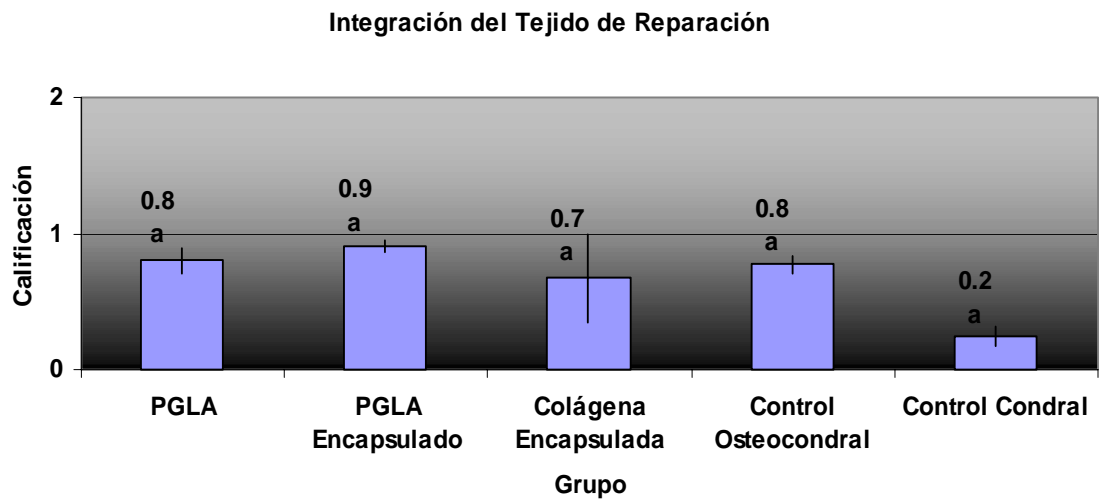
^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 14. Promedios y errores estándar de la valoración de la arquitectura por medio del sistema de calificación, para la evaluación histológica del tejido de reparación (Mainil-Varlet).



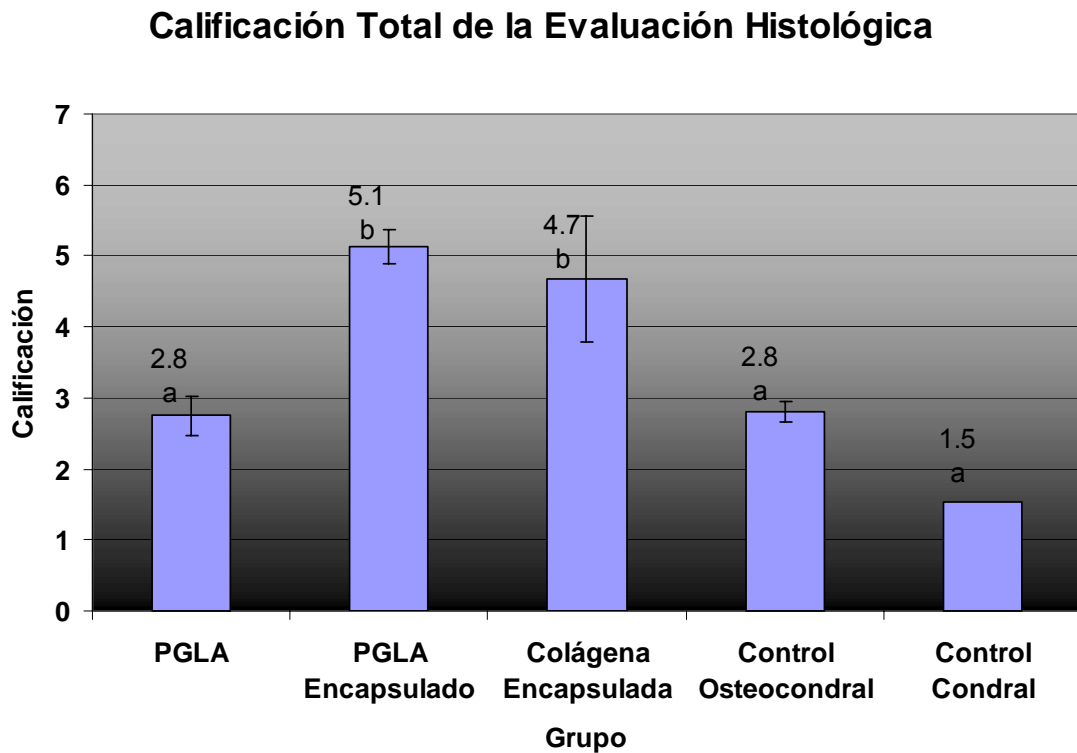
^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 15. Promedios y errores estándar de la valoración de la integración del tejido de reparación por medio del sistema de calificación, para la evaluación histológica (Mainil-Varlet).



^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)

Gráfica 16. Promedios y errores estándar de la valoración por medio del sistema de calificación, para la evaluación de la calificación total histológica del tejido de reparación (Mainil-Varlet).



^{a, b} Superíndices diferentes indican diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.05$)