



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y EXPRESIÓN DE MENSAJEROS
DE PROTEÍNAS CARTILAGINOSAS EN LA REPARACIÓN
CONDAL EXPERIMENTAL EN UN MODELO ANIMAL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

ELCIRA ALVA VARGAS

TUTOR:

DR. JOSÉ CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN

COMITE TUTORAL:

M. EN C. BIOL. CRISTINA VELASQUILLO MARTÍNEZ

MVZ. MA. ELENA TRUJILLO ORTEGA

MÉXICO, D.F.

2008



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.

DEDICATORIAS

A mis padresLo más grande, con todo mi amor

A mi esposo Oscar.....Con todo mi amor

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México
A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Al Instituto Nacional de Rehabilitación INR de la Secretaría de Salud

Y a los que a continuación menciono:

Dr. José Clemente Ibarra Ponce de León – Tutor principal
M en C Biol. Cristina Velasquillo Martínez – Comité Tutorial INR
MVZ Ma. Elena Trujillo Ortega – Comité Tutorial FMVZ
Biol. Valentín Martínez López – Laboratorio de Ingeniería de Tejidos INR
Dr. David Garciadiego – Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y
Medicina Regenerativa INR
Ma. Del Carmen Parra Cid – Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y
Medicina Regenerativa INR
Lic. Mónica Higuera – Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y
Medicina Regenerativa INR
Dr. Almazán y Vero – Servicio de Artroscopía INR
MVZ Hugo Lecona y a todo su personal – Bioterio INR
Dra. Leticia Baena – Departamento de Patología INR
Técnico Enrique Álvarez – Departamento de Patología INR
Dr. Iván Sánchez Betancourt – Departamento de producción porcina FMVZ
MVZ Horacio, MVZ MC Mariano Hernández y personal de DS-ILPH-UNAM
A mi amiga Erika Mireya – por su apoyo incondicional
A mis hermanas – por ser una fuente de inspiración
A mi esposo Oscar – por su paciencia y apoyo incondicional

Gracias a todos por hacer posible este trabajo!

Portada
Indice
Introducción
Hipótesis de trabajo
Objetivos
Material y Métodos
Resultados
Discusión
Bibliografía

Palabras clave: cartílago articular, histología, matriz extracelular, lesiones cartílago articular, reparación cartílago articular, fibrocartílago, ingeniería de tejidos.

RESUMEN

Los problemas ortopédicos son la causa número uno de invalidez y retiro prematuro en diversas especies, como lo son los cerdos, los equinos y los seres humanos entre otros. La osteoartritis es una enfermedad articular, que se caracteriza por la pérdida progresiva del cartílago articular, el cual no puede recuperarse de manera natural. Con la finalidad de restaurar una superficie articular dañada, se han intentado diferentes alternativas de tratamiento, sin embargo, los resultados clínicos no ofrecen mejoría a largo plazo. La ingeniería de tejidos ofrece mejores expectativas en la reparación condral. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de la reparación condral utilizando un implante de células autólogas sobre un polímero sintético bio-degradable, en comparación con la reparación natural del cartílago en lesiones osteocondrales quirúrgicas. Se utilizaron 6 cerdos, a los cuáles se les creó una lesión osteocondral en el cóndilo medial del fémur de la babilla izquierda, que sirvió como control lesionado, mientras que en la babilla derecha se creó una lesión condral, la cual fue reparada con el constructo realizado en el laboratorio de ingeniería de tejidos. El tejido de reparación fue evaluado a las 20 semanas posteriores a la implantación. Los resultados obtenidos de acuerdo a la evaluación histológica e inmunohistoquímica, tanto en el grupo experimental como en el control, se obtuvo un tejido conectivo fibroso de reparación. El resultado global demostró que aunque el grupo control haya presentado una mejor estructura morfológica, el grupo experimental presenta menor cantidad de tejido fibroso. En ninguno de los estudios realizados a la fecha, en las diversas especies, se ha podido demostrar la regeneración del cartílago articular. Con las técnicas de ingeniería de tejidos empleadas en esta investigación, se indujo a la formación de un tejido fibroso de reparación en lesiones condrales.

Palabras clave: Cartílago articular, ingeniería de tejidos, reparación condral.

SUMMARY

Orthopedic problems, in different species, are the first cause of disability and premature retirement of any activity. Osteoarthritis is a joint disease, characterized by a progressive loss of articular cartilage, which is unable to undergo spontaneous repair after injury. Different treatment alternatives have been attempted in order to resurface damaged articular surface. However, clinical results do not offer long term improvement. Tissue engineering offers a potential new alternative for cartilage repair. The objective of this study was to evaluate by histology and immunohistochemistry, the repair tissue obtained with autologous chondrocyte and biodegradable synthetic polymers in a chondral lesion. Six pigs were used. An osteochondral defect was created in each animal in the medial condyle of the femur. Chondrocytes were isolated from an osteochondral plug. A full thickness chondral defect was then created on the right stifle joint and was repaired using autologous cells seeded onto a biodegradable polymer. Repair tissue was evaluated 20 weeks after implantation of the cell-polymer construct. Histological and immunohistochemistry evaluation reported fibrous connective repair tissue in both groups. Even though the results of the control group present a better morphologic structure, the experimental group had a minor presence of fibrous repair tissue. Tissue engineering techniques used in this study induced the formation of fibrous repair tissue in chondral defects of pig stifle joint.

Key words: Articular cartilage, Tissue engineering, chondral repair.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO Y EXPRESIÓN DE MENSAJEROS DE PROTEÍNAS CARTILAGINOSAS EN LA REPARACIÓN CONDRAL EXPERIMENTAL EN UN MODELO ANIMAL

I. INTRODUCCIÓN

Las lesiones articulares son la causa número uno de discapacidad entre varias especies animales, cerdos, perros, gatos, equinos y humanos. En cerdos es la causa más frecuente de pérdida de valor de los animales de cría y representa del 10 al 20 % de todas las cerdas desvalorizadas. La tasa de pérdida de valor debida a la cojera varía, la cual podría estar asociada con la genética y al tipo de alojamiento.

La osteocondrosis es la principal anomalía de debilidad en las patas de los verracos y cerdas en crecimiento. La incidencia y magnitud de las lesiones producidas por la osteocondrosis aumenta de las 10 a las 20 semanas de edad o de los 60 a 120 kg de peso vivo (Nakano y col. 1981b; Aherene y Brennan, 1985). En animales de 4 a 18 meses de edad, la osteocondrosis afecta a las articulaciones que soportan peso (Dewey, 2000). Las lesiones de osteocondrosis en general se encuentran en varias articulaciones del animal afectado como lo son la rodilla, codos, articulaciones intervertebrales lumbares, corvejones, hombros, cadera, por citar algunos ejemplos. En animales normales, en las áreas que soportan peso de la articulación de la rodilla, el cartílago articular está engrosado y contiene más condroitín sulfato y menos colágeno que las áreas que no soportan peso. A medida que el cerdo crece, el cartílago de la articulación no madura adecuadamente, lo que deja a las superficies articulares propensas al daño mecánico por estrés (Dewey, 2000).

En caballos, la enfermedad articular es la causa más común de claudicación y representa un gran porcentaje en la casuística de los veterinarios dedicados a dicha especie (Schneider *et al.*, 1997). En equinos tales lesiones ocurren durante el entrenamiento o las competencias, como resultado de estrés

biomecánico de intensidad sobre los tejidos que conforman las articulaciones sinoviales (McIlwraith, 1996).

Desde los tiempos de Hipócrates hasta la actualidad es aceptado que una vez destruido el cartílago articular no hay forma de recuperarlo.

El daño al cartílago puede ser causado por el impacto agudo o repetitivo sobre el mismo, así como por las fuerzas de carga y torsión. La respuesta del cartílago normal al trauma o a la degeneración, resulta en una reparación deficiente y los tratamientos actuales en medicina veterinaria son insuficientes (Barnewitz *et al.*, 2003; Gelse *et al.*, 2005).

Desde el punto de vista ortopédico, es aceptado que tanto la artritis traumática aguda como la crónica son capaces de desencadenar una osteoartritis temprana. Dicha enfermedad es considerada como un problema importante de índole económico y social en humanos.

Es por eso que a través de modelos animales de experimentación se han logrado grandes avances en el campo de los cambios degenerativos articulares (Altónaga y col., 2000; Chang *et al.*, 2006). El hecho de que el tejido conectivo del hombre sea comparable desde el punto de vista fisiológico al de muchas especies animales, así como la aparición de forma natural en estos animales de muchas de las enfermedades del sistema musculoesquelético que aparecen en el hombre, han hecho que estos animales sean un modelo ideal para llevar a cabo algunos estudios del sistema musculoesquelético.

El cartílago articular de los animales, es esencialmente similar al del hombre en cuanto a sus aspectos fisiológicos, a su espesor y a sus propiedades materiales. Los modelos animales más utilizados para estudiar problemas de osteoartritis son el perro, el caballo, el cerdo, el ternero, el pavo, la rata y el conejo (Altónaga y col., 2000; Chang *et al.*, 2006).

El desarrollo de la ingeniería de tejidos, tiene como propósito reparar aquellos defectos adquiridos en los órganos a través de la regeneración, su fundamento, esta basado en el implante de células dentro de bio-materiales y en presencia de factores de crecimiento (Langer *et al.*, 1993; Saraf *et al.*, 2006; Takashi *et al.*, 2007). La ingeniería de tejidos puede ser *in vivo* o *ex vivo*. *In vivo* se estimula la respuesta de regeneración propia del organismo, colocando

los bio-materiales adecuados *in situ*; *ex vivo* se obtienen células las cuáles son expandidas en cultivo, unidas a una matriz y reimplantadas en el huésped. Las células, dependiendo de su origen pueden ser heterólogas, autólogas o alogénicas. Las células autólogas son las más utilizadas ya que no causan respuesta inmunológica. Lo ideal es que se obtenga el mayor número de células posibles del mismo órgano, las cuales puedan ser aisladas, expandidas y reimplantadas dentro del mismo paciente en un periodo de tiempo determinado (Smith, 2005).

El desarrollo de la ingeniería de tejidos, específicamente de cartílago articular surge de la necesidad de encontrar un tratamiento efectivo para las diferentes patologías de las articulaciones. Sin embargo, el reto de construir cartílago *in vitro* es el de producir un tejido con la estructura y propiedades necesarias para que pueda ser implantado sobre una lesión dentro de una articulación. Dicho neo-tejido deberá inducir una reparación natural hasta integrarse totalmente al cartílago nativo del paciente (Hardingham *et al.*, 2002; Jorgensen *et al.*, 2001).

La regeneración del cartílago vía implante de condrocitos autólogos, puede mejorar el tratamiento de estos defectos, sin embargo, hay investigaciones contradictorias sobre el éxito de un implante de estas características (Saraf, 2006; Yi Lee Ch *et al.*, 2005), ya que es difícil mantener la morfología y funcionalidad de los condrocitos. Se han desarrollado diferentes estrategias que provean una estimulación sostenida a las células, a través de factores de crecimiento y diferentes moléculas biológicas para promover la diferenciación en los condrocitos (Yi Lee Ch *et al.*, 2005; Smith, 2005). Esto es debido a que al cultivarlos en monocapa se desdiferencian hacia la línea fibroblástica, es decir, las células cambian de una forma redonda a un aspecto estrellado, se aplanan y modifican su capacidad de producir colágena tipo II y proteoglicanos específicos del cartílago, como el agregano. Si bien hoy en día muchos protocolos han establecido la rediferenciación de estas células *ex vivo*, adicionalmente quedaría demostrar si las células desdiferenciadas pueden rediferenciarse *in vivo* en el lugar del implante (Brommer, 2003), y cual es la extensión que alcanzan las células implantadas para contribuir con la reparación. Los resultados de los experimentos de reparación en cartílago tanto

en el humano como en los animales, sugieren que en algunos pacientes la reparación funcional puede ser completa, no obstante los resultados todavía son inconsistentes (Canceda *et al.*, 2003; Masri *et al.*, 2006).

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cartílago articular

El cartílago articular hialino es un tipo de tejido conectivo de sostén altamente especializado, con una marcada durabilidad que recubre las superficies articulares de los huesos en las articulaciones sinoviales o diartroidales (Ham, 1975; Banks, 1981; Junqueira, 1990; Geneser, 2000; Rudert *et al.*, 2000; Gartner *et al.*, 2002; Eckstein *et al.*, 2006). Sus propiedades físicas, bioquímicas y biomecánicas son únicas, además de ser un tejido aneural, avascular y alinfático (Mankin, 1974a; Geneser, 1993; Howard *et al.*, 1994; Eckstein *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2006). El cartílago articular normal y sano es de un color blanco azulado, translúcido, brillante y con una superficie lisa, esta apariencia se debe a su gran contenido de agua (70% en adultos y 80% neonatos).

Al interactuar con el líquido sinovial, el cartílago es el responsable de dar lubricación y rigidez a la articulación en movimiento, respondiendo viscoelásticamente a la carga mecánica. Su nutrición se realiza a partir del líquido sinovial mediante difusión (Todhunter, 1996; Kofron *et al.*, 2005; O'Brien Fergal *et al.*, 2007).

Los condrocitos son las células típicas del cartílago (Pacifici *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2001), las cuales se alojan en pequeñas lagunas o cavidades, producen su propia matriz extracelular y reemplazan a aquellas moléculas de la matriz degradada con el fin de mantener el tamaño adecuado y las propiedades mecánicas del tejido (Mankin, 1974a; Geneser, 1993; Temenoff y Mikos, 2000). Sobre su peso en base seca la matriz extracelular del cartílago articular contiene aproximadamente un 50% de colágena, 35% de proteoglicanos, 10% de glucoproteínas, 3% de minerales, 1% de lípidos, el porcentaje de condrocitos se considera según el volumen, Archer (2002) menciona que los condrocitos ocupan el 10%.

Microscópicamente el cartílago articular es heterogéneo con variación en microestructura entre diferentes articulaciones, áreas de carga y de no carga, así como entre animales jóvenes y adultos (McIlwraith, 1996).

2.2 Histología del cartílago articular

En el estudio del cartílago articular se han realizado diferentes técnicas y entre ellas se encuentran los cortes histológicos. En éstos, la matriz cartilaginosa parece carecer de estructura, ya que la colágena aparece bajo la forma de finas fibrillas (Ham, 1975; Banks, 1981; Geneser, 2000; San Román, 2001; Gartner y Hiatt, 2002; Kumar *et al.*, 2001).

Para identificar histológicamente (Fig.1) al cartílago, es necesario evaluar la apariencia de sus células y su relación con la matriz extracelular. Normalmente en la periferia del cartílago hialino, los condrocitos presentan una forma elíptica, con el eje mayor paralelo a la superficie. En la parte central del cartílago estas células son redondeadas y en general aparecen en grupos de hasta 8 células, todas originadas por mitosis de un único condroblasto. Estos grupos se denominan grupos isógenos. Las células y la matriz cartilaginosa sufren retracción durante el proceso histológico, lo que explica la forma estrellada de los condrocitos y su alejamiento de la cápsula. Los condrocitos llenan totalmente las lagunas, y cuando son típicos tienen núcleo redondeado con uno o más nucleolos. Los condrocitos varían considerablemente de forma y dimensiones. Los más jóvenes, a semejanza de las lagunas que los albergaban, en lugar de tener forma esférica suelen ser aplanados, las células cartilaginosas viejas, mejor dicho completamente diferenciadas, tienden a ser de gran volumen y redondeadas, por lo que las dimensiones indican el grado de diferenciación de cada condrocito (Ham, 1975; Banks, 1981; Junqueira, 1990; Gartner y Hiatt, 1997; Geneser, 2000).

En animales adultos el cartílago articular se divide en cuatro capas o zonas: superficial o tangencial, transicional, media o radial y calcificada; lo cual está basado en las diferencias de morfología de la matriz y su bioquímica (Hayes *et*

al., 2001). A su vez en cada zona del cartílago existen 3 regiones distintas: pericelular, territorial e interterritorial. La región pericelular es una pequeña matriz que rodea inmediatamente las lagunas, se muestra como una red fina de fibras de colágena incluidas en la sustancia parecida a la lámina basal. Tanto la pericelular y la territorial proveen los medios para la unión de los condrocitos a la matriz extracelular y su protección durante la carga articular. La región pericelular contiene exclusivamente a las proteínas de unión. La región territorial está compuesta por condrocitos aplanados orientados en forma paralela a la superficie articular (Banks, 1981; Geneser, 2000).

La zona transicional es más grande que la superficial y contiene condrocitos esféricos, fibras de colágena más grandes pero en menor número, más proteoglicanos y menos agua que la zona superficial.

La zona media o radial es por lo general la de mayor tamaño y cuenta con fibras de colágena de mayor diámetro, la mayor cantidad de proteoglicanos y la menor cantidad de agua. En esta zona las células son más grandes, redondeadas y están arregladas en columnas alineadas perpendicularmente a la superficie articular, al igual que las fibras de colágena. La zona calcificada es una capa delgada de transición entre el hueso subcondral y el cartílago no calcificado, además de poseer condrocitos pequeños de poca actividad metabólica. Se caracteriza por poseer células redondas en varios estados de maduración. Estas células se disponen en columnas con orientación perpendicular a la superficie articular (Banks, 1981; Gartner y Hiatt, 2002; Geneser, 2000; Kumar *et al.*, 2001).

Las propiedades de tinción que presenta el cartílago están relacionadas con los grupos carboxilo, así como la acidofilia de la colágena (Geneser, 2000; Lombardero, 2005).

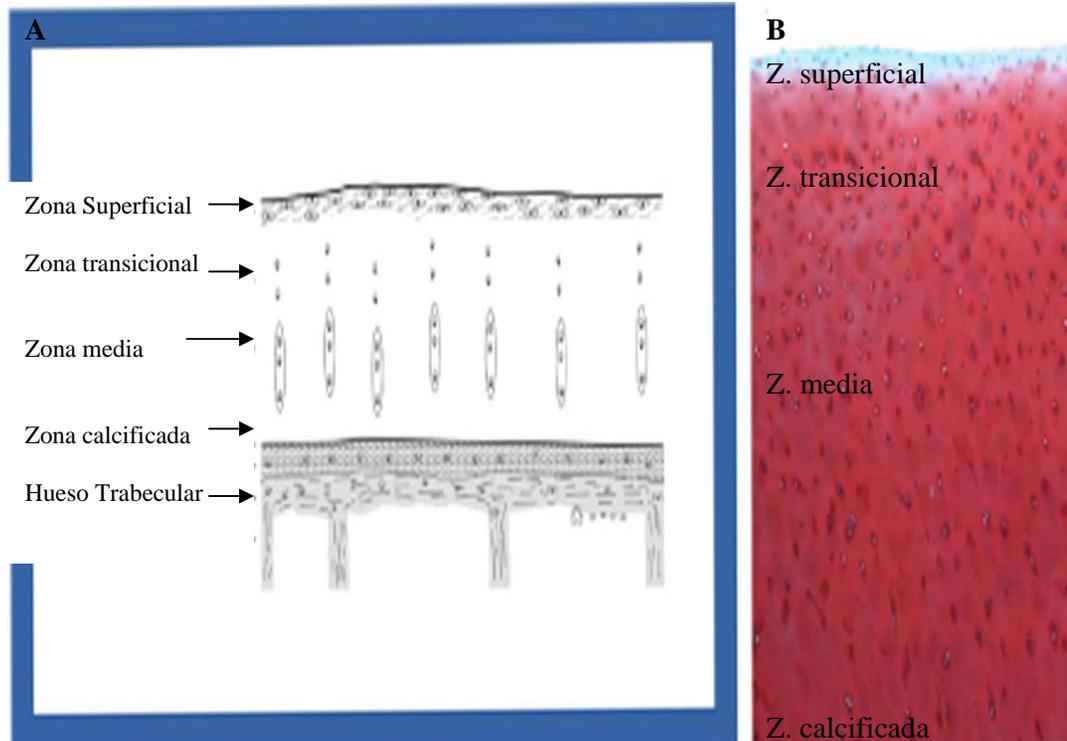


Fig. 1 (A y B) Cartílago articular normal. Superficie cartílago regular. Los condrocitos y la matriz extracelular se encuentran organizados en 4 zonas. (B) Safranina O 5x. Fuente: Pritzker, 2005.

2.3 Composición del Cartílago Hialino

2.3.1 Condrocitos

El condrocito es la base celular constituyente del cartílago (Archer, 2002), citoplasmáticamente se encuentra aislado de sus vecinas. El cartílago está considerado como un tejido embrionario, por su extensiva distribución que provee al feto de moldes para el desarrollo del esqueleto, a través de osificación endocondral (Archer, 2002). Sin embargo en el adulto, la distribución del cartílago es limitada, se localiza en sitios anatómicos donde la mayor función es el soporte (Adams, 2002). En las articulaciones tiene como función adicional el proporcionar una superficie articular lisa y libre de dolor,

pero es precisamente el condrocito quien presenta susceptibilidad en el tejido. Cuando éste falla en el mantenimiento entre la síntesis y la degradación de la matriz extracelular, expone al tejido a un gran número de condiciones degenerativas, la más común es la osteoartritis (Goldring, 2002).

2.3.1.1 Morfología de los condrocitos

Normalmente son redondos o poligonales, excepto en bordes del tejido donde estos son mas aplanados o discoideos, así como en la superficie de las articulaciones.

Intracelularmente, el condrocito muestra una característica típica de actividad metabólica celular (Archer, 2002), tiene que sintetizar y recambiar un gran volumen de matriz que consiste en colágena, proteoglicanos, glucoproteínas y hialuronano (ácido hialurónico o hialuronato). Dentro de la célula se encuentran depósitos de glicógeno y la presencia de un cilio primario (Archer, 2002). Otra característica que presentan los condrocitos es la relativamente gran matriz extracelular al volumen radial de la célula, el radio puede ser correlacionado a la función del cartílago, en mamíferos tiene un radio mayor, los condrocitos ocupan al menos el 10% del volumen del tejido (Archer, 2002).

Los condrocitos de la capa profunda son de mayor tamaño, más redondos, ultraestructuralmente (Fig. 2) se componen de pocas mitocondrias, lisosomas, retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi, vacuolas secretoras, núcleo, vesículas pinocíticas, vacuola y microfilamentos (Todhunter, 1996).

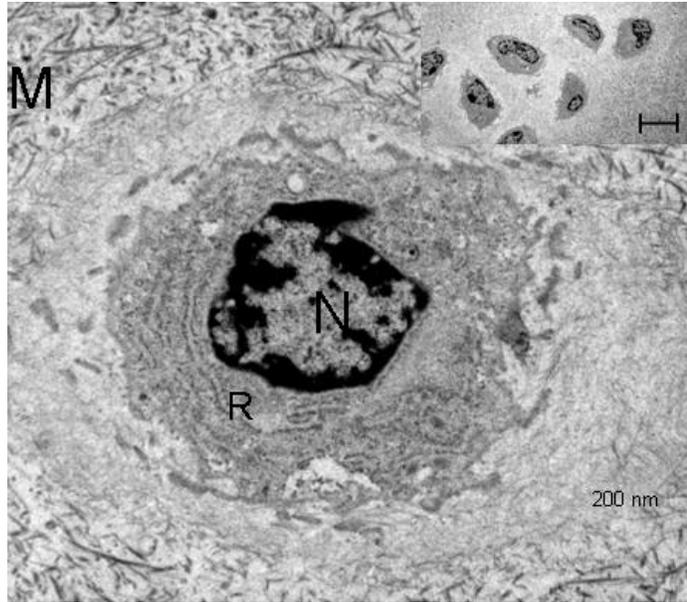


Fig. 2 Micrografía electrónica de un condrocito en donde se observa la matriz (M), el núcleo (N) y el retículo endoplásmico rugoso (R). Fuente: Velasquillo C.

2.3.1.2 Funciones del condrocito

Los condrocitos originarios de la interzona son bastante parecidos a los condrocitos correspondientes de la placa de crecimiento, a pesar de que ambos tipos celulares forman cartílago, presentan importantes diferencias y funciones, como lo son el sintetizar, organizar y mantener la matriz extracelular (Archer, 2002; Platt, 1996; Goldring, 2002). La principal función del condrocito es la de ocupar las estructuras de soporte, como en la tráquea, el cartílago articular y la nariz. Otra función es la del crecimiento, en las placas epifisiales (Archer, 2002; Rodríguez, 1998), el crecimiento constituye un incremento en el volumen, los condrocitos alcanzan esto a través de tres mecanismos: primero a través de la proliferación y producción de más células; segundo a través de la secreción de matriz extracelular y tercero a través del incremento de volumen celular que ocurre durante la hipertrofia

2.3.2 Matriz extracelular (MEC)

La matriz extracelular es la responsable del mantenimiento de la homeostasis del cartílago, es el principal componente ya que determina las propiedades biomecánicas. La apariencia traslúcida (Temenoff y Mikos, 2000) del cartílago hialino se debe principalmente a que es un tejido que contiene una gran cantidad de agua (70% de su peso en adultos y 80% en neonatos) y a su fina estructura de fibras de colágena. Sobre su peso en base seca, el cartílago articular contiene aproximadamente 50% de colágena, 35% de proteoglicanos, 10% de glucoproteínas; 3% de minerales, 1% de lípidos (Mankin, 1974a; Geneser, 1993; Buckwalter, 1997), el porcentaje de condrocitos se considera según el volumen, Archer (2002) menciona que los condrocitos ocupan el 10%.

La función principal del cartílago articular depende del estado de hidratación y del arreglo de su matriz extracelular (Kuettner *et al.*, 1982b). El agua constituye aproximadamente un 75% del peso húmedo del cartílago (Mallein, 1998) y es más abundante en las capas superficiales, participa en la difusión de nutrientes, la mayor parte se encuentra en el espacio extracelular, un 30% se asocia con el espacio intrafibrilar dentro del colágeno y el resto se encuentra en el espacio de poros moleculares de la matriz extracelular.

La cantidad de agua depende de diferentes factores: a) concentración de proteoglicanos, que debido a su actividad osmótica causan la acumulación de grandes volúmenes, esto hace que aumente la presión resultante de las cargas negativas; b) organización macromolecular de la colágena; c) resistencia y rigidez de la red de colágena (Alberts *et al.*, 2002).

2.3.2.1 Colágena

Es un componente básico del cartílago articular, está compuesto por una triple hélice de cadenas polipeptídicas. Existen diferentes variantes de colágena que se distinguen por la composición de las cadenas que forman la triple hélice. Aproximadamente el 90 – 95% de la colágena del cartílago articular es

colágena tipo II (Roberts *et al.*, 2002), la cual es responsable de la fuerza tensil del cartílago articular (Banks, 1981; Geneser, 2000; Gartner *et al.*, 2002). Los restantes son colágena tipo V, VI, IX y XI. La incorporación nueva de los diferentes tipos de colágena es importante para la organización física de la matriz (McIlwraith, 1996; San Román, 2000; Taylor *et al.*, 2001; Gartner *et al.*, 2002).

La colágena es un homotrímero que tiene un alto nivel de organización estructural. Cuenta con una unidad básica que es el tropocolágeno, el cual está compuesto por tres cadenas polipeptídicas o cadenas α . La colágena tipo IX está formada por tres tipos distintos de cadenas α_1 , α_2 y α_3 . La cadena α_1 contiene una región globular no helicoidal y la cadena α_2 está modificada para contener una cadena de glucosaminoglicanos. El tipo X es una colágena de bajo peso molecular que contiene tres cadenas α idénticas. El tipo VI no es un componente primario de la matriz extracelular, pero la encontramos en el área pericelular, alrededor de los condrocitos. El tipo XII contiene tres cadenas α_1 , se encuentra presente en pequeñas cantidades. Estructuralmente la colágena tipo XIV es similar al tipo IX, sin embargo se desconoce su función.

2.3.2.2 Proteoglicanos

Los proteoglicanos están formados por una serie de compuestos solubles conjugados de alto peso molecular, siendo uno de los componentes sólidos de la matriz extracelular. Los proteoglicanos están compuestos por numerosas cadenas de glucosaminoglicanos que están unidas de manera covalente a una proteína central. Los glucosaminoglicanos (GAGs) son unidades de disacáridos unidos en los que uno de los azúcares se une a un azúcar aminosulfatado (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina). Existen diferentes glucosaminoglicanos en el cartílago articular que pueden asociarse con proteoglicanos: ácido hialurónico, condroitín sulfato, dermatán sulfato, heparán sulfato, keratán sulfato. La distinción entre los glucosaminoglicanos son los azúcares, el tipo de unión, y el número y localización de los grupos sulfato. El

ácido hialurónico es un disacárido de glucoronato y N-acetyl glucosamina, es el único glucosaminoglicano que no es sulfatado. El condroitín sulfato es un disacárido de glucoronato de N-acetyl galactosamina mientras que el dermatán sulfato es derivado del condroitín sulfato por epimerización del glucoronato en ioduronato. El keratán sulfato es un disacárido de galactosa y N-acetyl glucosamina. La mayoría de los glucosaminoglicanos están unidos mediante enlaces covalentes y van unidos a una proteína central para producir proteoglicanos (Alberts *et al.*, 2002). El ácido hialurónico es la excepción, ya que no está unido a una proteína central. ((Banks, 1981; Gartner *et al.*, 2002; Geneser, 2000; Ham, 1975; Junqueira, 1981; San Román, 2000).

Los glucosaminoglicanos proporcionan un soporte mecánico para el tejido, constituyen el 10% del peso total de las proteínas (Alberts *et al.*, 2002). Se diferencian de otras glucoproteínas por su naturaleza, organización de las cadenas glucídicas laterales y su cantidad. Las glucoproteínas contienen entre un 1 y un 60% en el peso de oligosacáridos cortos, mientras que los proteoglicanos contienen hasta un 95% (Alberts *et al.*, 2002).

El tamaño que presentan los proteoglicanos y su capacidad para formar grandes agregados, juega un papel muy importante para retener moléculas de agua en el tejido y así formar una estructura elástica que contribuye a las propiedades materiales del cartílago.

La concentración de proteoglicanos incrementa en medida que aumenta la profundidad del cartílago desde la superficie articular, sin embargo las fibras de colágena están más concentradas en la superficie ya que es el sitio donde son requeridas para resistir la tensión cuando es aplicada una carga.

2.3.2.3 Agrecano

El agrecano es el proteoglicano más abundante y mejor definido del cartílago articular (Banks, 1981; Gartner y Hiatt, 2002; Junqueira, 1990; San Román, 2000; Taylor *et al.*, 2001) es el encargado de darle esa apariencia de gel a la matriz extracelular. Este gran proteoglicano está compuesto de una proteína

central que tiene más de 100 cadenas de glucosaminoglicanos unidas. Los principales glucosaminoglicanos que encontramos en el agregano son condroitín sulfato y keratán sulfato, sin embargo la cantidad de condroitín sulfato es generalmente mayor (Gartner y Hiatt, 2002; Taylor *et al.*, 2001).

Las moléculas de agregano rellenan en su mayoría los espacios interfibrilares de la matriz extracelular y se cree que junto con el líquido tisular que atraen, son las responsables de la distribución de las fuerzas de compresión al cartílago, ya que éstas le confieren elasticidad y capacidad de recuperar su forma normal (Geneser, 2000; Temenof y Mikos, 2000; Eckstein *et al.*, 2006).

2.3.2.4 Ácido hialurónico

El ácido hialurónico es el único glucosaminoglicano que no está unido a una proteína central, además de que no está sulfatado. Las moléculas de agregano están unidas al ácido hialurónico por medio de una glucoproteína de unión, para formar la estructura del agregado proteoglicano. Además de que es capaz de lubricar las superficies articulares ya que es un componente del líquido sinovial (Ham, 1975; McIlwraith, 1996; Gartner y Hiatt, 2002).

2.3.3 Proteínas no colágenas

La capacidad de adhesión que poseen las células hacia los componentes producidos en su matriz interna se encuentra mediada por glucoproteínas de adhesión (condronectina). La condronectina tiene sitios de fijación para la colágena tipo II, condroitín sulfato, ácido hialurónico e integrinas de condroblastos y condrocitos. La función principal de las integrinas es la de enlazar a la matriz extracelular con el citoesqueleto. La fibronectina se encuentra en el cartílago articular, al igual que en otros tejidos, ayuda a estabilizar la interacción de la matriz extracelular con los condrocitos, los cuales

son sujetos fuertemente a ella (Ham, 1975; Banks, 1981; Geneser, 2000; Temenoff y Mikos, 2000; San Román, 2001; Gartner y Hiatt, 2002).

2.4 Nutrición del cartílago articular

Se podría esperar que cualquier tejido que se desarrolla a partir del mesénquima fuera abastecido en abundancia por capilares, respecto a esto, el cartílago es único, ya que no contiene capilares en su interior que alimenten a sus células en forma directa. Los capilares que abastecen al cartílago se encuentran fuera de su superficie. Los condrocitos son alimentados, a través de sustancias disueltas, mediante gradientes de difusión, la porosidad de la matriz es un factor muy importante en la conservación del tejido.

El líquido sinovial se forma principalmente como un trasudado proveniente de la red vascular extensa de las articulaciones sinoviales, éste tiene los elementos necesarios para llenar los requerimientos nutricionales del cartílago articular (Mankin, 1974a; Hurtig *et al.*, 1988; Chang *et al.*, 2006). Las propiedades de goteo del cartílago articular, proveen de un mecanismo para el movimiento de los nutrientes y de los productos de desecho a través de este tejido a vascular. Las células del cartílago articular, como todas las cartilagosas, se caracterizan por poseer un metabolismo anaeróbico ya que el consumo de oxígeno es casi nulo (Gartner y Hiatt, 2002; Geneser, 2000).

2.5 Fibrocartílago

El fibrocartílago, que se obtiene como tejido de reparación de un defecto osteocondral, se encuentra constituido por colágena de tipo I, este es diferente desde el punto de vista histológico a la arquitectura del cartílago hialino ya que no cuenta con la arquitectura típica por zonas (Hayes *et al.*, 2001). Es un tejido denso que carece de pericondrio, no cuenta con la típica diferenciación por zonas, no posee una capa calcificada, no presenta tide mark y tiene muy baja

afinidad histoquímica por las tinciones especiales para proteoglicanos, como es el caso de Safranina O (Geneser, 1993; Gartner y Hiatt, 1994).

Es una forma de transición entre el tejido conectivo denso y el cartílago hialino ya que está compuesto por una combinación de fibras de colágena tipo I, fibroblastos y células cartilaginosas ubicadas en lagunas rodeadas por cantidades variables de matriz. Los condrocitos son pequeños y suelen estar ubicados en filas paralelas, entre ellos se observan densos haces de fibras de colágena (Banks, 1981; Ross y Rieth, 1987; Gartner y Hiatt, 1994; Geneser, 1993).

Una vez formado el fibrocartilago como un tejido de reparación osteocondral, puede ser que los fibroblastos sufran metaplasia para semejar cartílago hialino durante un periodo corto de tiempo. Sin embargo cuando las superficies articulares reparadas son sometidas a un trabajo atlético, se puede provocar que el cartílago hialino metaplásico, se revierta a tejido fibroso (McIlwraith y Nixon, 1996).

La cantidad de moléculas de proteoglicanos que se encuentran en el fibrocartilago es significativamente menor, en comparación con el cartílago hialino articular normal. Debido a esto, el fibrocartilago no produce una rigidez compresiva adecuada contra la carga mecánica, y esta sujeto a una deformación excesiva bajo una carga fisiológica, lo que eventualmente conduce a la degeneración articular (Vachon *et al.*, 1989).

2.6 Tipos de lesiones en el cartílago articular

Existen tres principales tipos de lesión en el cartílago articular:

- 1) Trastorno a la matriz extracelular, si esta se encuentra dañada por efectos físicos como lo son los traumatismos de tipo directo, o si la lesión no es muy severa, los condrocitos que quedaron viables van a incrementar su actividad de síntesis en un intento para reparar el tejido (Buckwalter, 1997; Temenoff y Mikos, 2000).

2) Defectos de espesor parcial, cuando estos defectos presentan alteraciones en la superficie del cartílago que no se extienden hasta el hueso subcondral, los condrocitos cercanos al daño fincan un tipo de reparación intrínseca al reiniciar su división por mitosis, proliferar e incrementar la síntesis de colágena, proteoglicanos y ADN. Sin embargo esta actividad es limitada y no resulta en una reparación óptima del tejido. (Buckwalter, 1997; Huber *et al.*, 2000).

3) Defectos de espesor total con y sin daño al hueso subcondral. En estos defectos se ven involucradas todas las capas del cartílago llegando hasta el hueso subcondral. En el caso de que el hueso sufra hemorragia, el tipo de reparación es extrínseca, ya que el defecto depende de elementos mesenquimales del hueso subcondral, que participan en la formación del tejido conectivo nuevo, generalmente fibrocartílago. Hay casos en los que el tejido de reparación persiste sin cambios, progresivamente se remodela formando una superficie articular funcional, aunque en lesiones osteocondrales de gran tamaño, el tejido de reparación muestra evidencias de degeneración con una disminución en la cantidad de proteoglicanos, incremento en el contenido de colágena tipo I, pérdida de células con apariencia de condrocito, predominan los fibroblastos. El tejido neoformado es incapaz de soportar el uso y la carga constante, dejando áreas de hueso subcondral expuesto (Buckwalter, 1997; Temenoff y Mikos, 2000).

2.7 Reparación del cartílago

La reparación articular utilizando tejido osteocondral fresco transplantado de cadáveres a pacientes vivos, tiene como objetivo el de renovar la superficie articular dañada con un tejido que contenga las propiedades anatómicas, bioquímicas y funcionales del cartílago articular nativo, lo cual tendrá resultados presumiblemente satisfactorios (Hayes y Averett, 2001; Yun *et al.*, 2008).

El uso de los aloinjertos osteocondrales es poco recomendable ya que en algunos casos, se ha visto una respuesta inmune contra el tejido del donador, con la infiltración linfocítica de la membrana sinovial, citotoxicidad por

leucocitos intra-articulares, y la formación de adherencias sinoviales al sitio injertado (Vachon *et al.*, 1992; Temenoff y Mikos, 2000). El uso de material osteocondral alogénico congelado es una alternativa, ya que la criopreservación reduce la inmunogenicidad de los aloinjertos, aunque la viabilidad de los condrocitos tiene un efecto detrimental (Desjardins *et al.*, 1991a y 1991b).

La utilización de autoinjertos es una técnica más confiable, ya que se maneja su propio tejido, con lo cual se evitan los problemas que provocan los aloinjertos (Vachon *et al.*, 1992; Schenck, 2001).

La mosaicoplastía es una técnica en la cual se toman discos osteocondrales de zonas de no carga articular, para ser implantados en defectos osteocondrales que se localicen en zonas de carga articular del mismo paciente. Esta técnica quirúrgica ha sido utilizada con cierto éxito en el tratamiento de defectos de cartílago en rodillas de humanos desde 1992, se han desarrollado trabajos experimentales para evaluar el proceso de reparación en conejos, perros, y borregos (Suh *et al.*, 1997; Schenk, 2001; Hangodoy *et al.*, 2004).

Al descubrir que los condrocitos se replicaban *in vitro* cuando eran enzimáticamente aislados de su matriz, fue posible cultivarlos con la finalidad de tener una opción más en la reparación de los defectos del cartílago articular (Suh *et al.*, 1997; Ochi *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2006). El trasplante de condrocitos autólogos ha demostrado ventajas sobre el uso de condrocitos alogénicos, ya que se evita el rechazo inmunológico y la transmisión de enfermedades infecciosas (Brittberg *et al.*, 1994; Yi Lee *et al.*, 2005; Litzke *et al.*, 2004; Ochi *et al.*, 2004). El beneficio de transplantar condrocitos que no presentan matriz extracelular que los rodee, está en la transferencia de un concentrado de células metabólicamente activas, que rellenan la superficie articular sin problemas de tamaño y adhesión, que presentan los injertos osteocondrales (McIlwraith y Nixon, 1996; Ochi *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2006).

Desafortunadamente, el transplantar condrocitos en suspensión, no ha sido un éxito; esto debido a la incapacidad de mantener a las células en el defecto por un periodo de tiempo prolongado, que les permita producir su propia matriz

extracelular. Se ha desarrollado un método quirúrgico, mediante el cual se sutura un parche de periostio autógeno, unido con fibrina sobre el defecto, en el cual previamente se le inyectan condrocitos autólogos provenientes de un cultivo (Litzke *et al.*, 2004; Yi Lee *et al.*, 2005). Con esto se evita que las células se salgan del defecto y parece tener resultados prometedores.

2.8 Ingeniería de tejidos

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario de investigación, que combina los conocimientos de las ciencias de los materiales con la biología molecular y celular, teniendo un gran potencial para su aplicación en la medicina (Schultz *et al.*, 2000; Temenoff y Mikos, 2000; Hardingham *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2002 Schachar *et al.*, 1999). El trasplante de cartílago articular ha ganado un lugar prominente en la investigación de las ciencias básicas en ortopedia, desarrollando tratamientos nuevos para las enfermedades músculoesqueléticas (Schachar *et al.*, 1999; Hardingham *et al.*, 2002; Ochi *et al.*, 2004). La reparación del cartílago basada en técnicas de ingeniería de tejidos, podría beneficiar a miles de pacientes humanos cada año, así como también en medicina veterinaria (Vacanti y Langer, 1999; Barnewitz *et al.*, 2003). El elemento clave es el uso de mecanismos basados en los procesos biológicos, que inducen la reparación de tejidos lesionados o afectados por alguna enfermedad (Hardingham *et al.*, 2002). En el futuro, la construcción de tejidos vivos *in vitro* reduciría la necesidad de transplantar órganos.

El principio de la ingeniería de tejidos, se basa en el cultivo y multiplicación de células en estructuras biocompatibles y biodegradables, que proporcionen las señales físicas y químicas necesarias para guiar su diferenciación y ensamble en tejidos tridimensionales (Griffith y Naughton, 2002; Moran *et al.*, 2003). El campo de la ingeniería de tejidos involucra al estudio de células vivas en diferentes formas, ya sea para restaurar, mantener o promover la formación o regeneración de órganos y tejidos, a través de la combinación de tres

componentes: a) Células: las más utilizadas en ortopedia son las células mesenquimales madre provenientes de la médula ósea; b) Estructuras tridimensionales o matrices: estas proveen una plantilla o vía que conduce el crecimiento del tejido, y c) Moléculas bioactivas: éstas son morfógenos o factores de crecimiento, quienes estimulan la actividad celular y su diferenciación hacia factores físicos o químicos para producir hueso, cartílago o menisco (Ibarra *et al.*, 2000) entre otros (Nehrer, 1998; Elisseeff, 2000; Schultz *et al.*, 2000; Schenck, 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002).

Los estudios experimentales sobre la colocación de injertos con condrocitos en defectos articulares de humanos y animales, parece ser el más prometedor (O'Driscoll, 2001; Van der Kraan *et al.*, 2002). El implante de condrocitos autólogos ha sido utilizado como tratamiento para los defectos de cartílago en los últimos 14 años, aunque todavía existe discusión sobre la eficacia del procedimiento (Schultz *et al.*, 2000). Se han realizado a nivel mundial más de 6000 procedimientos de implantación con condrocitos autólogos, un ejemplo es un estudio realizado en más de 200 pacientes humanos durante un periodo de 2-10 años, donde del 74 al 90 % de los pacientes tuvieron excelentes resultados clínicos, sin embargo a la fecha no existe suficiente información publicada sobre la biología y naturaleza bioquímica del cartílago reparado (Roberts *et al.*, 2002).

La finalidad de transplantar condrocitos en un vehículo biocompatible y biodegradable de un compuesto adherente como matriz (Schultz *et al.*, 2000; Van der Kraan *et al.*, 2002; Hunziker, 2001), es la de proporcionar una mayor seguridad para que dichas células permanezcan en el defecto el tiempo suficiente para sintetizar una matriz extracelular nueva y se puedan unir al hueso subcondral.

Para cumplir con dicho propósito, se estudiaron varios tipos de materiales, tanto biológicos como sintéticos. Los materiales biológicos son mejores en cuanto a su disponibilidad y compatibilidad con los condrocitos, pero los polímeros sintéticos (Moran *et al.*, 2003) proveen mayor longevidad y mínimo riesgo de una respuesta inmune en el ambiente articular (Fortier *et al.*, 1998b; Temenoff y Mikos, 2000; Ochi *et al.*, 2004).

Idealmente, el cartílago articular neoforado por ingeniería de tejidos deberá poseer una estructura, composición bioquímica, propiedades mecánicas y capacidad de auto-mantenimiento, iguales a las del cartílago nativo sano (Van der Kraan *et al.*, 2002).

2.9 Evaluación del cartílago articular

2.9.1 Técnicas histológico - histoquímicas

El elemento fundamental de los métodos histoquímicos es la utilización de acciones físicas y químicas sobre preparados histológicos, para determinar la localización de sustancias químicas de las células y los tejidos. La reacción histoquímica debe inducir la formación de un producto insoluble y visible al ser coloreado. La mayoría de las tinciones usadas en histología son hechas a base de sales hidrosolubles, descritas como tinciones ácidas o básicas.

Las propiedades de tinción del cartílago están relacionadas con los grupos sulfato y carboxilo (componentes basófilos), así como con la naturaleza acidófila de la colágena (Banks, 1981; Gartner y Hiatt, 2002; Geneser, 2000).

2.9.1.1 Tinción con hematoxilina y eosina (H y E)

La tinción con hematoxilina y eosina sirve para evaluar la morfología celular y la estructura de la matriz extracelular (Fig. 3). La matriz del cartílago es basófila (azul o morado) muy marcado alrededor de cada grupo isógeno de la matriz territorial, esto se debe a la gran cantidad de glucosaminoglicanos sulfatados ácidos en esa zona. Las fibras de colágena y el citoplasma de las células son acidófilas (rosa o rojo).

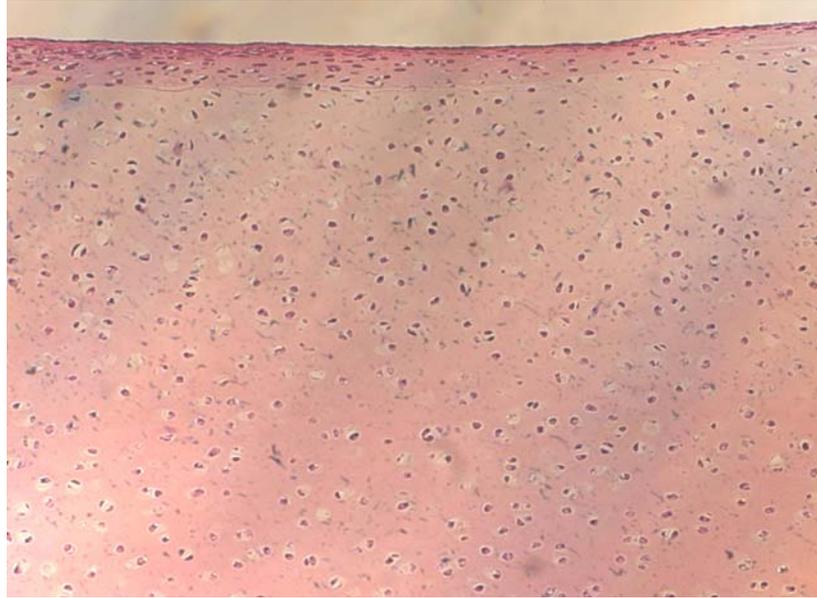


Fig.3 H y E de cartílago articular sano de cerdo. Se observan los núcleos en azul y en rosa la MEC, se observa parte del espesor de la superficie articular del cartílago (100 veces amplificada). Fuente: Alva E., 2008.

2.9.1.2 Tinción con safranina O

La tinción con safranina-O (Fig. 4) es una técnica semicuantitativa, ya que por su carga catiónica y unión a los proteoglicanos aniónicos (GAGs sulfatados con carga negativa), es un indicador muy útil del contenido de proteoglicanos en la matriz extracelular del cartílago articular, que se tiñen de un color rojo-anaranjado. Con esta tinción la región pericelular y territorial siempre se tiñen más intensamente que la región inter-territorial (Breinan *et al.*, 1997; Prophet *et al.*, 1991).



Fig. 4 Safranina O de cartílago articular sano de cerdo. Se observa de color rojo-anaranjado el contenido de proteoglicanos en la matriz extracelular del cartílago (100 veces ampliada). Fuente: Alva E., 2008.

2.9.1.3 Tinción con azul alciano

La tinción con azul alciano (Fig.5) es una tinción diferencial que sirve para determinar la presencia de glucosaminoglicanos (GAGs) ácidos (mucopolisacáridos) en la matriz del cartílago articular (Prophet *et al.*, 1991; Yates *et al.*, 2005; Rudert *et al.*, 2000).

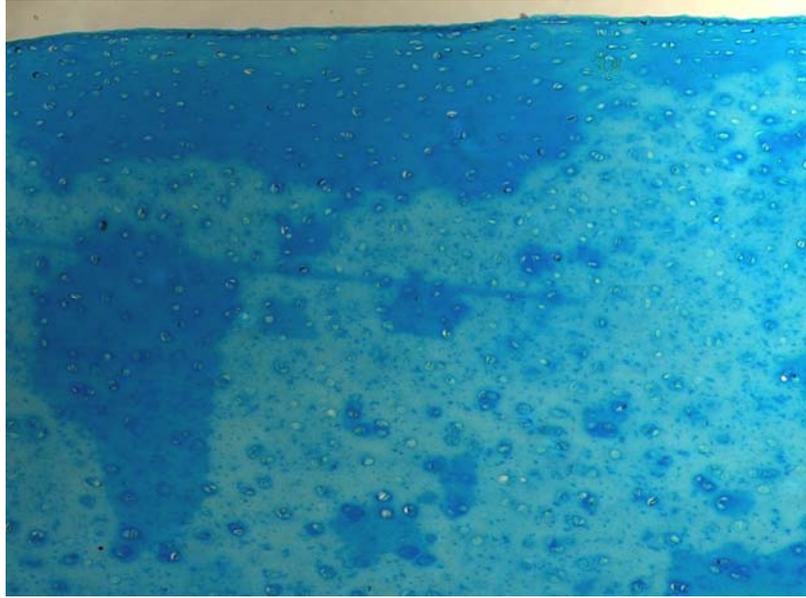


Fig.5 Azul Alciano de cartílago articular sano de cerdo. Observamos la presencia de glucosaminoglicanos en la matriz del cartílago articular (100 veces amplificada).

Fuente: Alva E., 2008.

2.9.1.4 Tinción tricrómica de Masson

La tinción tricrómica de Masson (Fig.6) sirve para indicar la presencia de colágena en la matriz extracelular (azul). Los núcleos de los condrocitos se tiñen de azul oscuro mientras que el citoplasma de las células de rojo (Geneser, 2000).



Fig.6 Tricrómica de Masson de cartílago articular sano de cerdo. Observamos de color azul la presencia de colágena en la matriz extracelular, de azul oscuro los núcleos de los condrocitos y de rojo el citoplasma de las células (100 veces amplificada). Fuente: Alva E., 2008.

III. HIPÓTESIS

Se demostrará que las estructuras de polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables sembradas con condrocitos autólogos y envuelta en una monocapa de células aisladas del cartílago, empleadas para reparar defectos condrales creados quirúrgicamente, darán lugar a la formación de un neot Tejido con características histológicas similares a las del cartílago normal.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar la eficiencia de la reparación condral utilizando un implante de células autólogas sobre un polímero sintético bio-degradable, en comparación con la reparación natural del cartílago en lesiones osteocondrales quirúrgicas.

4.2 Objetivos Específicos

1.- Evaluar por medio de histología, utilizando las tinciones de Hematoxilina y Eosina, Safranina O, Tricrómica de Masson y Azul Alciano, el tejido de reparación obtenido en ambas articulaciones de los cerdos (control y experimental), utilizando un sistema de calificación preestablecido.

2.- Evaluar por medio de Inmunohistoquímica al tejido de reparación obtenido en ambas articulaciones de los cerdos (control y experimental), utilizando un sistema de calificación preestablecido.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 6 cerdos adultos clínicamente sanos (machos), con un peso promedio de 70 kg., al inicio de la investigación. Los animales se mantuvieron en las instalaciones del departamento de cerdos de la FMVZ-UNAM.

Los animales fueron transportados, conforme al calendario quirúrgico, al Bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) en donde se les realizó a través de artroscopia una biopsia osteocondral del cóndilo medial de la articulación fémoro-tibio-patelar izquierda. Los animales se transportaron 3 días antes de la cirugía al INR con el propósito de que se aclimataran a las condiciones del bioterio del INR.

5.1 Manejo individual y cuidados preoperatorios

- Ayuno sólido 12 horas previas a la cirugía y agua a libre acceso.
- Evaluación clínica completa.

5.2 Protocolo de anestesia

Todos los cerdos fueron operados bajo anestesia general siguiendo el mismo protocolo.

- Se pesó al animal utilizando una báscula.
- Una vez pesado se realizó la inducción utilizando una dosis única de Xilacina 5 mg/kg vía intramuscular y un bolo de Propofol 4 mg/kg.
- Colocación de un catéter # 22 intravenoso periférico.
- Se le administró una infusión de Propofol vía endovenosa, 4 mg/kg/min.

Una vez que el cerdo se encontraba derribado se trasladó a la mesa de cirugía donde se colocó en posición de decúbito dorsal, se intubó orotraquealmente para asistirlo durante el plano anestésico con oxígeno. El tipo de anestesia que

se utilizó fue una anestesia por goteo con una infusión de Propofol en Solución glucosada vía endovenosa a una dosis de 0.002 mg/kg.

El monitoreo anestésico consistió en la evaluación de los signos vitales: frecuencia cardiaca, frecuencia respiratoria, pulso, color de las mucosas y presión arterial.

Se proporcionó soporte cardiovascular con la administración de solución glucosada.

5.3 Procedimiento quirúrgico

Con base en las técnicas artroscopias descritas por McIlwraith (1996) y Beale *et al.* (2003), se realizaron de forma aséptica los mismos procedimientos quirúrgicos en todos los cerdos de experimentación, utilizando una lente artroscópica (Olympus Winter and Ibe GMBH, Hamburgo Alemania) y una video cámara digital.

5.3.1 Toma de la muestra osteocondral para el cultivo de condrocitos

Una vez anestesiado el cerdo y colocado sobre la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal y con el miembro pelviano izquierdo extendido, se embrocó la babilla izquierda con yodo povidona espuma y alcohol isopropílico al 70% en forma convencional. Posteriormente dicha articulación se cubrió con campos estériles, dejando libre el área operatoria (cara craneal de la babilla) y se mantuvo en extensión para facilitar el abordaje a la articulación.

Sobre la piel de la cara craneal de la articulación femoro tibio-patelar, se palparon los tres ligamentos patelares (medial, medio y lateral) y la cresta tibial. Se identificó el espacio entre los ligamentos lateral y medial, donde se ubicó el portal artroscópico a nivel del punto medio, entre la cresta tibial y el borde distal de la patela. En dicho punto, se introdujo un catéter que se conectó a un sistema de irrigación articular. Una vez distendida la cápsula articular se retiró el catéter y sobre ese mismo sitio se perforó la cápsula articular y se introdujo

el trocar artroscópico de punta roma con su camisa en el sitio de la incisión, atravesando la cápsula articular y quedando dentro de la articulación fémoro-patelar. De esta manera se creó el primer portal que sirvió para introducir el artroscopio. Después se sacó el trocar de la camisa, la cual quedó dentro de la cavidad articular y se introdujo en ella el artroscopio, al que se le conectó tanto una cámara artroscópica como el cable de la fuente de luz. Las imágenes intra-articulares pudieron ser observadas en un monitor a color (Sony Trinitron, Sony Corporation, Japón).

Una vez que el artroscopio se introdujo en la articulación, se le conectó el ingreso del sistema de irrigación con solución Hartmann, para mantener distendida la cápsula. Al quedar posicionado el artroscopio frente al surco troclear, se movió hacia medial y próximamente para así localizar al cóndilo medial de fémur, la cual fue el área donadora de cartílago.

Posteriormente se creó el otro portal, se realizó una incisión vertical sobre la piel de 1 cm. de longitud entre los ligamentos patelares medio y medial, a nivel del punto medio entre la cresta tibial y el borde distal de la patela. Se incidió la cápsula y se introdujo un instrumento de plástico estéril de punta roma (COR System. MA, EUA), de frente y de manera perpendicular hacia el cóndilo medial del fémur, el cual sirvió para ubicar el área donadora del cartílago. Se retiró dicho instrumento y se introdujo en su lugar un sacabocado de doble componente en forma de "T", de acero inoxidable, estéril y especial para la toma de biopsias osteocondrales en forma de disco de 8 mm de diámetro (COR System. MA, EUA). Una vez colocado sobre el sitio donador, se puso un yunque especial en su extremo externo y se golpeó éste con un martillo ortopédico convencional (FIEM, México), para hundir al sacabocado 8 mm de profundidad en el cartílago articular y hueso subcondral del cóndilo medial del fémur. Con movimientos rotatorios manuales se extrajo de forma estéril la muestra osteocondral en forma de cilindro. Finalmente, la articulación se lavó con el sistema de irrigación, se retiraron los instrumentos y se suturaron las incisiones.

La muestra osteocondral obtenida se colocó para su transporte en un tubo cónico de plástico estéril de 50 ml, que contenía medio de cultivo celular M 199

(Bio-Whitaker, Maryland, EUA) al cual se le adicionaron antimicrobianos al 10% (penicilina-estreptomina y anfotericina B). El tubo se colocó en una hielera a 4°C y se trasladó de inmediato al Laboratorio de Ingeniería de Tejidos del INR, donde fue procesado el cartílago articular para cultivo celular.

El defecto creado se dejó intacto de tal manera que se reparó de manera natural, por lo que fue designado como control.

5.4 Protocolo para el procesamiento del cartílago articular

1. La muestra osteocondral fue manejada dentro de una campana de flujo laminar (Forma Scientific, Inc. Ohio, EUA).
2. Se realizaron dos lavados de la muestra con solución salina buferada de fosfatos "PBS" (Invitrogen Co. Gibco. NY, EUA), adicionada con antibióticos y antimicóticos al 10% (penicilina, estreptomina y anfotericina B).
3. Se preparó una solución de colagenasa tipo II al 0.3% (Worthington. NJ,EUA) en el medio para cultivo celular M 199.
4. El cartílago se colocó en una caja de petri y se fragmentó lo más posible.
5. Los fragmentos de cartílago se colocaron en un tubo con 5 ml de medio M 199 adicionado con antibióticos/antimicóticos al 1% y 75 µl de colagenasa (200 µg/ml), formándose así una solución de colagenasa al 0.3%.
6. Los fragmentos con la solución se incubaron a 37° C en agitación constante, en un agitador orbital (Shel Lab, Oregon EUA) durante 4 horas, para su digestión.
7. Se centrifugó el tubo a 25° C a 1500 rpm durante 10 minutos.
8. Se retira el medio + colagenasa.
9. Agregó medio M 199 con antibióticos/antimicóticos al 1 %.
10. Se resuspendió el botón celular.
11. Se centrifugó de nuevo a 25° C a 1500 rpm durante 10 minutos.
12. Se separaron las células y el medio.

13. Al tejido se le agregó M 199 con suero bovino fetal (SBF) y antibióticos/antimicóticos al 1%. En un volumen conocido, 5 ml, resuspendiendo el botón celular.
14. Se tomaron 10 μ l de la solución anterior y se mezclaron con 10 μ l de azul de tripano al 0.4 % (Gibco BRL, Life Technologies. NY, EUA).
15. El conteo se realizó en una cámara de Neubauer, en donde se contaron las células del cuadrante central con la ayuda del microscopio óptico de luz invertida (40x) [Carl Zeiss, Axiovert 25, Alemania]. Las células vivas se observan de color blanco y las muertas de color azul.
16. Se calculó el porcentaje de viabilidad celular.
17. Se calculó el número de células vivas $\times 2$ (factor de dilución-20 μ l) \times 10000 (constante) \times volumen de suspensión= total de células vivas.
18. Se sembraron las células en una caja de cultivo primario T75 con 10 ml de una solución compuesta por M 199 con suero bovino fetal y antibióticos/antimicóticos al 1%.
19. La caja de cultivo colocó en un incubador de CO₂ al 5%, a 37° C y 85% de humedad relativa (NUAIRE, US Autoflow, EUA).
20. El medio de cultivo se cambió cada tercer día, monitoreando las células al microscopio.
21. Así hasta que las células llegaron a su confluencia (aproximadamente 4 semanas).

Una vez que el cultivo celular llegó a su confluencia se realizó el primer pase a través de una tripsinización en la cual se buscó que las células se desprendieran y se disgregaran.

1. La caja de cultivo se manejó dentro de una campana de flujo laminar.
2. Se aspiró el medio utilizando pipetas pasteur.
3. A cada caja T 75 se le agregan de 8 a 10 ml de PBS con la finalidad de humectar la caja.
4. Se retiró el PBS de cada una de las cajas.

5. Se le agregaron de 6 a 8 ml de EDTA/PBS 1 mM y se dejó 5 minutos a 37° C.
6. Se aspiró el EDTA/PBS.
7. Se agregaron 2 ml de tripsina al 0.25% (Gibco, Invitrogen Corp. NY, EUA) y se dejó incubar de 1 a 5 minutos a 37° C y se observa al microscopio.
8. Se agregaron 5 ml de albúmina y se lavó la caja T 75.
9. Se transfirieron a un tubo de 15 ml.
10. Se agregaron 5 ml más a la caja T 75 para lavarla y así arrastrar con el mayor número de células posible transfiriéndolo al tubo cónico de 15 ml.
11. Se centrifugó a 1500 rpm/10 minutos a 4° C.
12. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular.
13. Se le agregó al botón celular 5 ml de medio M 199 con antibiótico al 2% y se volvió a centrifugar a 1500 rpm/10 minutos a 4° C.
14. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular agregándole medio M 199 con Suero Bovino Fetal y antibiótico al 2%.
15. Se realizó el conteo celular para así determinar la viabilidad celular.
16. Se calculó el número de células obtenidas en el cultivo primario.
17. Posteriormente se recultivó durante 4 semanas (primer pase) y 4 semanas más (segundo pase).

5.5 Siembra de las células sobre el polímero. Formación del implante (constructo)

Una vez que las células llegaron a confluencia en las cajas de cultivo del segundo pase se realizó lo siguiente para sembrar las células sobre el polímero:

1. Se aspiró el medio de las cajas T 75.
2. Se agregaron 10 ml de PBS para humectar la caja.

3. Se retiró el PBS.
4. Se le agregaron de 6 a 8 ml de EDTA/PBS 1 mM y se deja 5 minutos a 37° C.
5. Se aspiró el EDTA/PBS.
6. Se preparó una dilución de la tripsina, en un tubo cónico de 15 ml se administraron 2ml de tripsina con 2 ml de EDTA/PBS. A cada una de las cajas de cultivo se le agregaron 2 ml de tripsina diluida y se dejaron incubar de 1 a 3 minutos a 37° C.
7. En cuanto la monocapa se empezó a desprender se agregaron 5 ml de albumina y se transfirió a un tubo de 15 ml.
8. Se agregaron 5 ml más a la caja T 75 para lavarla y así arrastrar con el mayor número de células posible, transfiriéndolo al tubo cónico de 15 ml.
9. Se centrifugó a 1500 rpm/10 minutos a 4° C.
10. Se aspiró el sobrenadante y se le agrega 10 ml de M 199+ SBF+ antibiótico 2%.
11. Se centrifugó a 1500 rpm/10 min a 4° C.
12. Se calculó el número de células a través de un conteo celular.
13. Se separó la monocapa de la caja petri utilizando un cell scrapper, formando una especie de círculo para así colocar en su centro el polímero de colágena. (Fig. 7)
14. Una vez que se colocó el polímero sobre la monocapa, al tubo cónico que contiene a las células se le aspira el sobrenadante dejando únicamente el botón celular.
15. Se le agregó al botón celular 100 µl de M199 con Suero Bovino Fetal y antimicrobianos y las células en suspensión se sembraron sobre el polímero cubriéndolo con la monocapa de células.
16. El constructo (co polímero-células) se colocó en un incubador de CO₂ al 5%, a 37° C y 85% de humedad relativa durante 1.5 horas.
17. Se agregó una solución compuesta por: medio de cultivo M199, 10% SBF, antimicrobianos y ácido ascórbico hasta cubrir el constructo.
18. El constructo se incubó durante 5 días para permitir la adhesión celular.

19. Al quinto día los constructos fueron implantados en cada uno de los cerdos.



Fig.7 Recubrimiento del polímero y del botón celular con la monocapa.

5.6 Implantación del constructo en la babilla experimental vía artrotomía

En cada uno de los cerdos se implantó un constructo de polímero/células en la babilla derecha. El sitio de implantación fue el cóndilo medial del fémur. Se realizó un abordaje para ligamento patelar medial, realizando la disección hasta llegar a la capsula articular. Una vez encontrada la capsula articular se realiza una capsulectomía para así exponer el sitio de implantación, en este caso el cóndilo femoral medial. Utilizando un sacabocado en forma de "T", de acero inoxidable, estéril y especial para tomar biopsias osteocondrales en forma de disco de 8mm de diámetro (COR System. MA, EUA). Se marcó el cartílago articular sobre el sitio al cual se le iba a realizar el implante y utilizando un desperiostizador se levantó el disco de cartílago de 8mm, dejando expuesto el

hueso subcondral (Fig.8) al cual se le realizó hemostasia. Una vez creado el defecto de cartílago, se realizó un orificio de 10 mm de profundidad en el hueso subcondral y en el centro del defecto con la ayuda de un taladro eléctrico convencional (Black & Decker, EUA).

El constructo fue sacado de su caja y perforado a manera de botón con el ancla del fijador (Fig.9). Se utilizó como fijador del implante un RAPIDLOC® PDS MENISCAL REPAIR SYSTEM/12° (Mitek. MA, EUA). El ancla del fijador se colocó en la perforación, se impactó, se activó el disparador y el ancla se fijó en el hueso subcondral. Finalmente utilizando un “empuja-nudos” el capuchón se deslizó hacia el defecto condral (Fig.10). Antes de cortar la sutura se corroboró la fijación del implante realizando movimientos de flexión y extensión de la articulación femoro-patelar. Una vez fijado se retiró la sutura y se lleva a cabo el cierre de la herida por planos de manera convencional.

Al finalizar el procedimiento quirúrgico, el cerdo fue oxigenado y trasladado a un cuarto para su recuperación anestésica donde fue asistido por personal del equipo veterinario del INR. Una vez estable el cerdo, se trasladó con los demás animales quedando bajo supervisión del equipo veterinario.

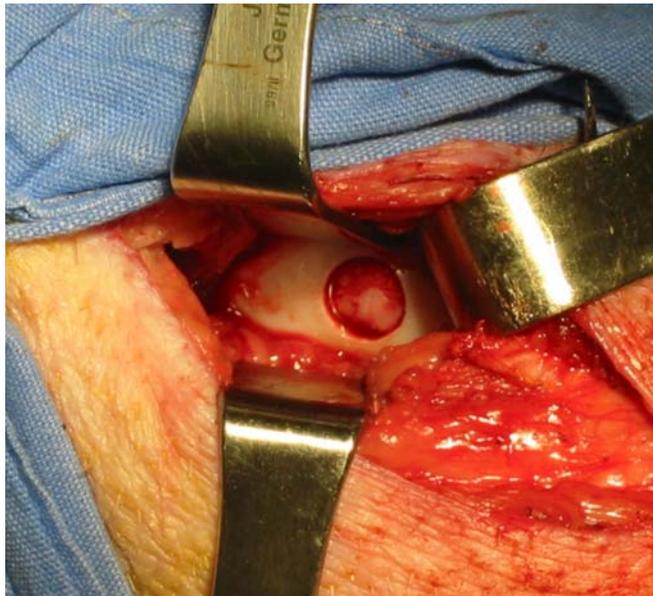


Fig. 8 Toma de muestra osteocondral en forma de disco de 8 mm para cultivo y para implante del constructo, donde se deja expuesto el hueso subcondral.

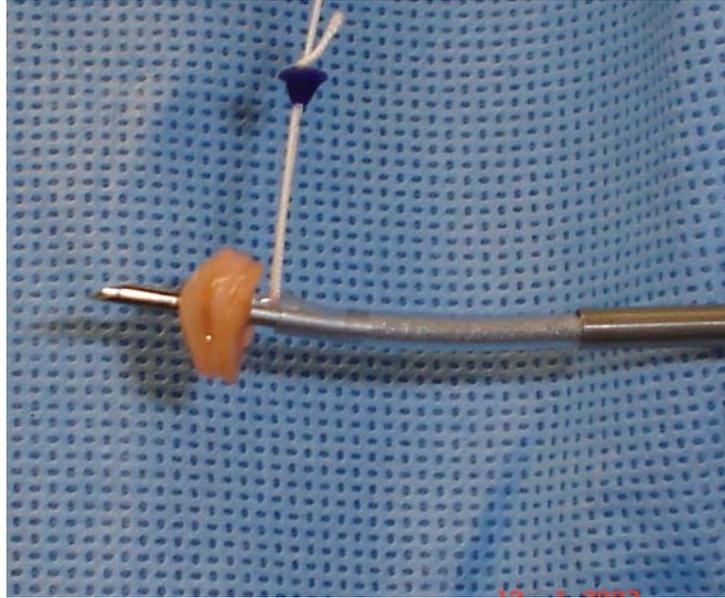


Fig.9 Polímero sembrado con células (constructo) perforado con el ancla RAPIDLOC® para su fijación en el hueso subcondral.

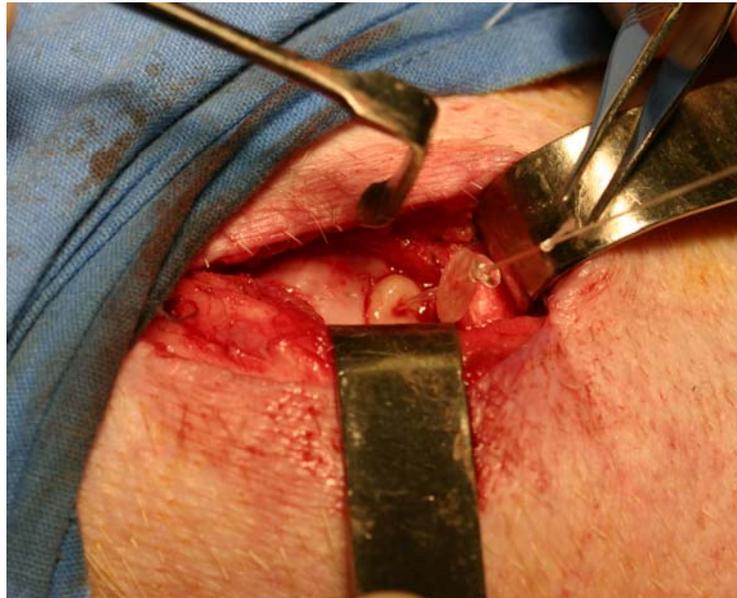


Fig. 10 Fijación del constructor en la perforación realizada con un taladro convencional, utilizando un empuja nudos para deslizar el capuchón hacia el defecto condral.

5.7 Manejo y cuidados postoperatorios

Se administró Cefalotina Na vía endovenosa a una dosis de 25 mg/kg de peso durante la cirugía y se continuo con el mismo antibiótico vía intramuscular durante 5 días más cada 12 horas. Además a cada cerdo se le administró Tramadol por vía endovenosa al terminar la cirugía a una dosis de 1.1 mg/kg la cual se continuó durante 5 días más vía intramuscular cada 8 horas. Se les administró un anti-inflamatorio no esterooidal/analgésico (Flunixin de Meglumine) durante 7 días a una dosis de 100 mg/50 kg de peso cada 12 horas; esto con la finalidad de prevenir inflamación y dolor articular. Los animales fueron revisados 3 veces al día por el equipo veterinario del bioterio del INR y una vez terminado el periodo de tratamiento fueron regresados a las instalaciones de la FMVZ-UNAM. Cada uno de los cerdos tuvo su propio expediente clínico donde se registraron las evaluaciones clínicas y los tratamientos administrados.

5.8 Evaluación del tejido de reparación

El tejido de reparación de ambas babillas de cada uno de los cerdos fue evaluado a las 20 semanas posteriores a la implantación de los injertos.

Se utilizaron dos métodos distintos para tal fin: Histología e Inmunohistoquímica

Una vez cumplidas las 20 semanas en cada cerdo, se practicó la eutanasia a cada uno de ellos en la sala de necropsias de la FMVZ-UNAM.

Bajo sedación previa con xilacina (PISA, México) 5 mg/kg vía intramuscular, cada cerdo fue sacrificado con una pistola de émbolo oculto.

A los cadáveres les fueron amputadas ambas babillas (control-izquierda y experimental-derecha), incluyendo músculos y la piel, con la ayuda de una segueta y un cuchillo. Las babillas fueron trasladadas de inmediato al INR para la evaluación de los tejidos de reparación.

5.8.1 Evaluación histológica

Las babillas fueron abiertas por artrotomía para así exponer la articulación femoro-patelar. En ambas (experimental y control) de cada uno de los cerdos se utilizó un osteotomo y un martillo convencional, esto para extraer manualmente el tejido de reparación obtenido. Se tomó parte del cartílago nativo que se encontraba en la periferia del tejido de reparación.

Las muestras colectadas, fueron procesadas mediante técnicas histológicas para su evaluación, utilizando cuatro diferentes tinciones: Hematoxilina y Eosina (H y E), Safranina O, Tricrómica de Masson y Azul Alciano e Inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales Anti hCL (II) (ICN) y Anti hCL (I) (ICN).

Las preparaciones de cada cerdo se calificaron con base en los parámetros de la siguiente tabla:

Sistema de puntuación histológico-histoquímico, para la evaluación del tejido de reparación

(Roberts et al., 2002)

Características del tejido	Calificación
Morfología	Hialino=3 Hialino/fibrocartílago= 2 Fibrocartílago= 1 Tejido fibroso= 0
Afinidad por la tinción	Cercana a la normal= 1 Anormal= 0
Agregados de condrocitos	Ninguno= 1 Menor o igual al 25% de las células= 0.5 Mayor al 25% de las células= 0
Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal= 2 Moderadamente irregular= 1 Muy irregular= 0
Integración basal	Buena= 1 Pobre= 0

Total máximo de puntos = 8

5.9 Protocolo de tinciones histológicas

5.9.1 Protocolo de tratamiento para portaobjetos con TESP

Se utilizaron las siguientes soluciones: TESP 4%: Acetona 288 ml, TESP 12 ml; Alcohol Acido: Etanol Absoluto 315 ml, Agua 135 ml, HCl 50 ml.

Se coloca un tren con las soluciones, los portaobjetos se sumergieron en alcohol ácido durante 4 minutos a temperatura ambiente (TA), se pasaron al recipiente con agua durante 2 minutos a TA, se colocan dentro del recipiente con etanol 96°, se dejan secando a 82°C durante 60 minutos, se dejan a TA durante 10 minutos, se sumergen en el TESP 4% durante dos minutos a TA, se lavan en acetona durante dos minutos y se dejan secando toda la noche.

5.9.2 Protocolo para el procesamiento del tejido de reparación obtenido para histología

Se procesaron las muestras obtenidas de cada uno de los cerdos (control y experimental) con ciertas modificaciones, ya que se tuvieron que estandarizar previamente las técnicas de tinción específicas para cartílago articular del cóndilo femoral medial del cerdo.

1. Las muestras se fijaron en PFA al 4% durante 24 horas.
2. Se descalcificaron las muestras en solución Krajian (CTR Científico. Monterrey, México).
3. Se fijaron las muestras en formol buferado.
4. Las laminillas se deshidrataron en agitación.

5.9.3 Protocolo de cortes histológicos de cartílago

Se identificaron los portaobjetos tratados con TESPA. La muestra (bloque) se colocó previamente a -20°C durante 5 minutos. En un microtomo se realizaron cortes seriados, los cuales se colocaron sobre los portaobjetos, una vez hechos los cortes las preparaciones se colocaron a 60°C sobre la plancha durante una hora, posteriormente se dejaron a 37°C toda la noche, al día siguiente se colocaron dentro de una cámara de vacío durante 24 horas a temperatura ambiente, al sacarlas de la cámara están listas para ser procesadas en histología e inmunohistoquímica.

5.9.3.1 Desparafinación

Las preparaciones fueron colocadas sobre la plancha a 60°C por 12 horas para desparafinarlas.

5.9.3.2 Rehidratación

Las muestras de tejido (preparaciones) deben de hidratarse de la siguiente manera antes de realizar la tinción:

1. Se sumergieron las preparaciones en dos baños de Xilol de 5 minutos cada uno.
2. Se sumergieron durante dos minutos en etanol 50% - xilol 50%.
3. Se sumergieron en dos cambios de Etanol 100% durante 2 minutos cada uno de los baños.

4. Se sumergieron en dos cambios de Etanol 96% durante 2 minutos cada uno.
5. Se lavaron con agua corriente (30 baños).

5.9.4 Tinción con Hematoxilina y Eosina (H y E)

1. Se colocaron las preparaciones en una canastilla de metal y se sumergieron en una solución de hematoxilina de Harris (Merck, Alemania) durante 1.5 minutos.
2. Se lavaron en un recipiente con agua corriente (30 baños) hasta quitar el exceso de hematoxilina, hasta que el agua salga transparente.
3. Se sumergieron en una solución acuosa de hidróxido de amonio al 1% (1 vez).
4. Se lavaron las preparaciones con agua corriente (30 baños).
5. Se sumergieron en una solución de carbonato de litio saturado (4 veces).
6. Se lavaron con agua corriente (30 veces).
7. Se limpió con una gasa seca el exceso de hematoxilina de las preparaciones.
8. Se sumergieron las preparaciones en Etanol al 96% 30 veces.
9. Se tiñeron con Eosina (Merck, Alemania) durante 1 a 2 minutos.

5.9.5 Tinción con Safranina-O

La desparafinación y la rehidratación tienen el mismo procedimiento que el anexo 5.9.3.1 y el 5.9.3.2

1. Se sumergieron las preparaciones en Hematoxilina de Weigert, se dejó durante 3 minutos.
2. Se sumergieron en agua corriente 30 veces o hasta quitar el exceso e colorante en el tejido.
3. Se sumergieron en Agua destilada, 3 veces.
4. Se sumergieron en el colorante verde brillante durante 7 minutos.
5. Se sumergieron las preparaciones en una solución de ácido acético al 3%, 3 veces.
6. Se tiñeron las preparaciones en una solución de Safranina O (Merck, Alemania) al 0.1%, durante 40 minutos.

La deshidratación tiene el mismo procedimiento que el anexo 5.9.4.1

5.9.6 Tinción Tricrómica de Masson

La desparafinación y la rehidratación tienen el mismo procedimiento que el anexo 5.9.3.1 y el 5.9.3.2

1. Las preparaciones se enjuagaron en agua destilada, 3 veces.
2. Se sumergieron en una solución fijadora de Bowin durante 24 horas.
3. Éstas se lavaron con agua corriente hasta quitar el exceso de colorante en el tejido.
4. Se sumergieron en 3 cambios de agua destilada.
5. Se sumergieron de 3 a 5 minutos en hematoxilina de Weigert.

6. Se lavaron con agua corriente hasta retirar el exceso de hematoxilina.
7. Se lavaron 3 veces con agua destilada.
8. Se sumergieron las preparaciones en una solución de fucsina ácida 1% - escarlata de Biebrich (Merck, Alemania) 1 % durante 20 minutos.
9. Se enjuagaron con agua destilada.
10. Se diferenciaron las preparaciones en una solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico (Merck, Alemania) durante 15 minutos.
11. Se contrastaron con una solución de azul de anilina (Merk, Alemania) durante 20 minutos.
12. Se sumergieron en una solución de ácido acético 1%, 5 veces hasta quitar el exceso de colorante.

5.9.7 Tinción con Azul Alciano

La desparafinación y la rehidratación tienen el mismo procedimiento que el anexo 5.9.3.1 y el 5.9.3.2

1. Las preparaciones se metieron en una solución de azul alciano (Merck, Alemania) 8GX (1g) en una solución de 100 ml de ácido clorhídrico al 0.1 N, durante 24 horas.
2. Se secaron las laminillas con papel filtro.
3. Las preparaciones se sumergieron durante 5 segundos en: alcohol etílico al 96% (2 veces), alcohol etílico absoluto al 100% (2 veces) y alcohol xilol.
4. Se dejaron en xilol durante 20 minutos.

5.10 Protocolo de preparación del cartílago para la inmunohistoquímica

5.10.1 Protocolo para la fijación y descalcificación de cartílago

La muestra se colocó directamente en PFA 4% pH 7.4, se dejó a 4°C durante 24 horas, se retiró esta solución y se le agregó PFA 4% - EDTA 100mM, se dejó en agitación continua a 4°C. Esta solución se cambio dos veces por semana y constantemente con una hoja de bisturí se cortaba el hueso de la muestra hasta que la cantidad de hueso fuera minima o dejara de crepitar, la duración de este procedimiento depende de la cantidad de hueso obtenido en la muestra. Una vez que la muestra se encontró lista, se procedió a realizar la deshidratación de la muestra.

5.10.2 Protocolo para la deshidratación del cartílago

Una vez descalcificada la muestra se eliminó el PFA 4% - EDTA 100 mM, una vez retirado se realiza lo siguiente en agitación:

1. Se lavaron con PBS 1X durante 40 minutos.
2. Se sumergieron en Etanol 50% durante 40 minutos.
3. Se sumergieron en Etanol 70% durante 40 minutos.
4. Se sumergieron en dos baños de Etanol 96% durante 40 minutos cada uno.
5. Se sumergieron en dos baños de Etanol 100% durante 40 minutos cada uno.
6. Se sumergieron en Etanol - Xilol durante 40 minutos.
7. Se sumergieron en dos baños de Xilol durante 40 minutos cada uno.
8. Se sumergieron en Xilol – Parafina toda la noche en el horno de hibridación a 60°C.

9. Se cambiaron a parafina y se meten al horno a 60°C toda la noche.
10. Se cambiaron a una parafina nueva durante 1 hora en el horno.
11. Se realizó la inclusión del tejido con parafina.

5.11 Inmunohistoquímica para la detección de colágena tipo II y tipo I

5.11.1 Protocolo para realizar la inmunohistoquímica

Los cortes embebidos en parafina se desparafinan e hidratan de la siguiente manera:

1. Las preparaciones con los tejidos se incubaron a 56°C en posición vertical con la ayuda de una gradilla metálica para preparaciones durante 1 hora.
2. Las preparaciones con los tejidos se introdujeron en un vaso de Koplín en donde se realizaron 3 cambios de Xilol de 5 minutos cada cambio con la finalidad de desparafinar.
3. Las preparaciones se cambiaron a otro vaso Koplín con etanol absoluto durante 5 minutos.
4. Nuevamente se cambiaron a otro vaso de Koplín que contenía etanol absoluto durante 5 minutos.
5. Las preparaciones se cambiaron a otro Koplín con etanol al 96% durante 3 minutos.
6. Las preparaciones se cambiaron a etanol al 70% durante 3 minutos.
7. Las preparaciones se cambiaron a Tris 1X durante 5 minutos.
8. Las preparaciones se cambiaron a PBS 1X durante 5 minutos.
9. Se tomó un portaobjeto con los tejidos y cuidadosamente, con la ayuda de una gasa limpia, se secó sin tocar o alterar el tejido. Es importante dejar el área que rodea al tejido seco, sin embargo debe impedirse que el corte histológico se seque.

10. Se aplicó una barrera hidrofóbica con el PAP PEN alrededor de cada corte histológico.
11. Las preparaciones se colocaron en posición horizontal en una cámara húmeda, se aplicaron 200 ml de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 3.0% en cada corte histológico rodeado de la barrera hidrofóbica. Los cortes se dejaron 10 minutos a temperatura ambiente. En este paso se bloque la actividad endógena de la peroxidasa que se podría encontrar en el tejido.
12. Las preparaciones se pasaron a un vaso de Koplín con PBS 1X durante 10 minutos para lavar el H_2O_2 aplicado.
13. Se eliminó el exceso de PBS presente en las preparaciones escurriéndolas y quitando el exceso con una gasa limpia. Las preparaciones se regresaron a la cámara húmeda y a cada tejido se le agregó 200 μ l de condroitinasa ABC, con la finalidad de realizar una recuperación antigénica, durante 1 hora con 30 minutos a 37°C.
14. Las preparaciones se pasaron a un vaso de Koplín con PBS 1X en posición vertical para lavar la condroitinasa ABC durante 10 minutos.
15. Las preparaciones se volvieron a pasar a un vaso de Koplín con PBS 1X durante 5 minutos.
16. Las preparaciones se cambiaron a PBS 1X durante 5 minutos.
17. Se retiró el exceso de PBS de las preparaciones con una gasa limpia y seca y se colocaron en la cámara húmeda en posición horizontal. Se aplicó sobre el tejido 2 ó 3 gotas de "Dako Protein Block" y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente.
18. Durante la incubación, se diluyó el anticuerpo primario anti-colágena II y colágena I hecho en ratón 1:20 usando como diluyente el "Dako antibody diluting buffer".
19. El anticuerpo diluido se centrifugó durante 10 segundos a la máxima velocidad alcanzada por la centrífuga durante este tiempo.
20. Se retiró cuidadosamente el "Dako Protein Block" de los tejidos con una micropipeta de 200 μ l y se aplicó el anticuerpo primario diluido.

Las laminillas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se dejaron a 4°C hasta el siguiente día.

21. Las laminillas se pasaron a un vaso de Koplín con PBS 1X para lavar el anticuerpo durante 10 minutos.
22. Se colocaron de nuevo en un vaso que contenía PBS 1X durante 5 minutos.
23. De nuevo se colocaron en un vaso Koplín que contenía PBS 1X durante 5 minutos.
24. Se retiró el exceso de PBS de las laminillas con una gasa y se colocó en la cámara húmeda. Se aplicó sobre el tejido 2 ó 3 gotas de “Dako Labelled Polymer-HRP anti-mouse” y se dejó 60 minutos a 37°C.
25. Se sumergieron en un vaso Koplín con PBS 1X para lavar el “Dako Labelled Polymer-HRP anti-mouse” durante 5 minutos.
26. Se retiró el exceso de PBS de las preparaciones y se colocaron en la cámara húmeda. Se aplicó sobre el tejido “Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System”.
27. Se esperó hasta que el tejido histológico adquiriera el color producido por la reacción. Esto tomó menos de 5 minutos. Los cortes histológicos se taparon de la luz.
28. Una vez que terminó la reacción, las preparaciones se sumergieron en PBS 1X durante 5 minutos.
29. Se sumergieron en una caja para tinción con Hematoxilina durante 1 minuto.
30. Se lavaron con agua corriente para retirar el exceso de hematoxilina.
31. Las preparaciones se sumergieron en agua amoniacal, una vez.
32. Se sumergieron en hidróxido de amonio, una vez.
33. Se sumergieron en agua destilada 5 veces para eliminar el exceso de hidróxido de amonio.
34. Las preparaciones se sumergieron en etanol al 70% durante 1 minuto.

35. Las preparaciones se sumergieron en etanol al 96% durante 1 minuto.
36. Las preparaciones se sumergieron en etanol absoluto durante 1 minuto.
37. Las preparaciones se sumergieron en Xilol durante 1 minuto.
38. Nuevamente se sumergieron las preparaciones en Xilol durante 1 minuto.
39. Se limpiaron las preparaciones para quitar el exceso de Xilol y se les aplicó resina transparente hasta cubrir los cortes histológicos.
40. Cuidadosamente se colocó un cubreobjetos sobre los tejidos embebidos en la resina y se dejaron secar hasta el siguiente día.

5.12 Análisis estadístico

En el presente trabajo se aplicó una estadística no paramétrica, utilizando la U de Mann Whitney.

Las diferencias entre experimentales y controles se consideraron significativas cuando la probabilidad de error alfa fue menor a 0.05.

Los datos fueron analizados en el programa de cómputo SPSS.

VI. RESULTADOS

En ninguno de los cerdos se presentó complicación alguna durante el postoperatorio, no se presentó ni inflamación articular ni claudicación, esto con base al examen del aparato locomotor realizado en cada uno de los animales.

Babilla izquierda= Control.

Babilla derecha= Experimental.

6.1 Evaluación histológica del tejido de reparación

El tejido de reparación obtenido tanto en la babilla control - izquierda como en la experimental – derecha, de cada uno de los cerdos, fue calificado con base a los parámetros descritos en la literatura para la evaluación de tejido de reparación condral.

Características del tejido	Calificación
1. Morfología	Hialino=3 Hialino/fibrocartilago= 2 Fibrocartilago= 1 Tejido fibroso= 0
2. Afinidad por la tinción	Cercana a la normal= 1 Anormal= 0
3. Agregados de condrocitos	Ninguno= 1 Menor o igual al 25% de las células= 0.5 Mayor al 25% de las células= 0
4. Arquitectura de la superficie	Cercana a la normal= 2 Moderadamente irregular= 1 Muy irregular= 0
5. Integración basal	Buena= 1 Pobre= 0

Total máximo de puntos = 8

Resultados obtenidos en la evaluación histológica del tejido de reparación del cartílago articular.

Tabla 1

Características morfológicas del tejido neoformado en Safranina O

Características del tejido	Cerdos											
	Grupo Control						Grupo Experimental					
	1C	2C	3C	4C	5C	6C	1E	2E	3E	4E	5E	6E
Morfología	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1
Afinidad por la tinción	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
Agregados de condrocitos	1	1	0	0	1	1	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0
Arquitectura de la superficie	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Integración basal	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
Subtotal	6	6	1	3	4	5	2.5	2.5	2.5	3	1.5	2
Total	25						14					

En esta tabla podemos observar que la puntuación obtenida en las cinco características del tejido neoformado del grupo control, las cuales son significativamente mayores que las obtenidas en el grupo experimental, con lo cual se muestra que el grupo control presenta una mejor estructura morfológica que el grupo experimental.

Comparación y presencia de tejido fibroso entre el Grupo control y el Grupo experimental.

Tabla 2

Formación de tejido fibroso en la tricrómica de Masson

Características del tejido	Cerdos											
	Grupo Control						Grupo Experimental					
	1C	2C	3C	4C	5C	6C	1E	2E	3E	4E	5E	6E
Morfología	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1
Afinidad por la tinción	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0
Agregados de condrocitos	1	1	0	0	1	1	0.5	0.5	0.5	0	0.5	0
Arquitectura de la superficie	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Integración basal	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1
Subtotal	6	6	1	3	4	5	2.5	2.5	2.5	3	1.5	2
Total	25						14					

En esta tabla podemos observar que al analizar las cinco características del tejido neoformado a través de la tinción Tricrómica de Masson, la puntuación obtenida en el grupo experimental es menor que la del grupo control, lo que nos indica que en el grupo experimental hay menor presencia de tejido fibroso en comparación con el grupo control.

En conclusión los resultados obtenidos en la Tabla 1, las tinciones histológicas de hematoxilina eosina, safranina O y azul alciano, nos indican que en el grupo control lesionado hay mayor presencia de proteoglicanos que en el grupo experimental.

Los resultados obtenidos en el Tabla 2, la tinción tricrómica de masson, nos muestra que en el grupo experimental hay menor cantidad de tejido fibroso que en el grupo control, lo que demuestra que aunque la morfología sea mejor en el grupo control, la presencia de tejido fibroso es mayor en éste que en el experimental.

Se realizó un análisis estadístico donde se comparó la puntuación obtenida del grupo experimental contra el grupo control, obteniendo así un valor de significancia, a través del cual se puede afirmar si hubo diferencia estadística entre ambos grupos.

Tabla 3

Comparación de las 5 características del tejido neoformado entre el cerdo 1 del grupo control (1C) y del grupo experimental (1E)

Características del tejido	Cerdo		Valor de p
	1C	1E	
Subtotal	6	2.5	0.045

(p<0.05) Si hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control.

Tabla 4

**Comparación de las 5 características del tejido neoformado entre el cerdo
2 del grupo control (2C) y del grupo experimental (2E)**

Características del tejido	Cerdo		Valor de p
	2C	2E	
Subtotal	6	2.5	0.045

(p<0.05) Si hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control.

Tabla 5

**Comparación de las 5 características del tejido neoformado entre el cerdo
3 del grupo control (3C) y del grupo experimental (3E)**

Características del tejido	Cerdo		Valor de p
	3C	3E	
Subtotal	1	2.5	0.282

(p>0.05) No hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control

Tabla 6

**Comparación de las 5 características del tejido neoformado entre el cerdo
4 del grupo control (4C) y del grupo experimental (4E)**

Características del tejido	Cerdo		Valor de p
	4C	4E	
Subtotal	3	3	0.282

(p>0.05) No hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control.

Tabla 7

Comparación de las 5 características del tejido neoformado entre el cerdo 5 del grupo control (5C) y del grupo experimental (5E)

Características del tejido	Cerdo		Valor de p
	5C	5E	
Subtotal	4	1.5	0.309

(p>0.05) No hubo diferencia estadística significativa entre el grupo experimental y el control

Tabla 8

Comparación de las 5 características del tejido neoformado entre el cerdo 6 del grupo control (6C) y del grupo experimental (6E)

Características del tejido	Cerdo		Valor de p
	6C	6E	
Subtotal	5	2	0.166

(p > 0.05) No hubo diferencia estadística significativa entre ambos grupos

6.2 Expresión de colágena tipo II y colágena tipo I mediante Inmunohistoquímica

Tabla 9

Análisis de la expresión de colágena tipo I y II por inmunohistoquímica

Expresión de proteínas	Cerdos											
	Grupo Control Lesionado						Grupo Experimental					
	1C	2C	3C	4C	5C	6C	1E	2E	3E	4E	5E	6E
Expresión de Colágena II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Expresión de Colágena I	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Los resultados obtenidos en la Tabla 9 nos revelan que tanto en el grupo experimental como en el grupo control se obtuvo la expresión de colágena tipo I y no así la expresión de colágena tipo II.

Constructo

Se realizó un análisis histológico - histoquímico del constructo (Fig. 11) realizado para evaluar sus características antes de la implantación en los animales. Al analizarlos se encontró la presencia de células de aspecto blástico, con una matriz rica en colágena, con presencia de glucosaminoglicanos y positiva en la inmunohistoquímica a la presencia de colágena tipo I.

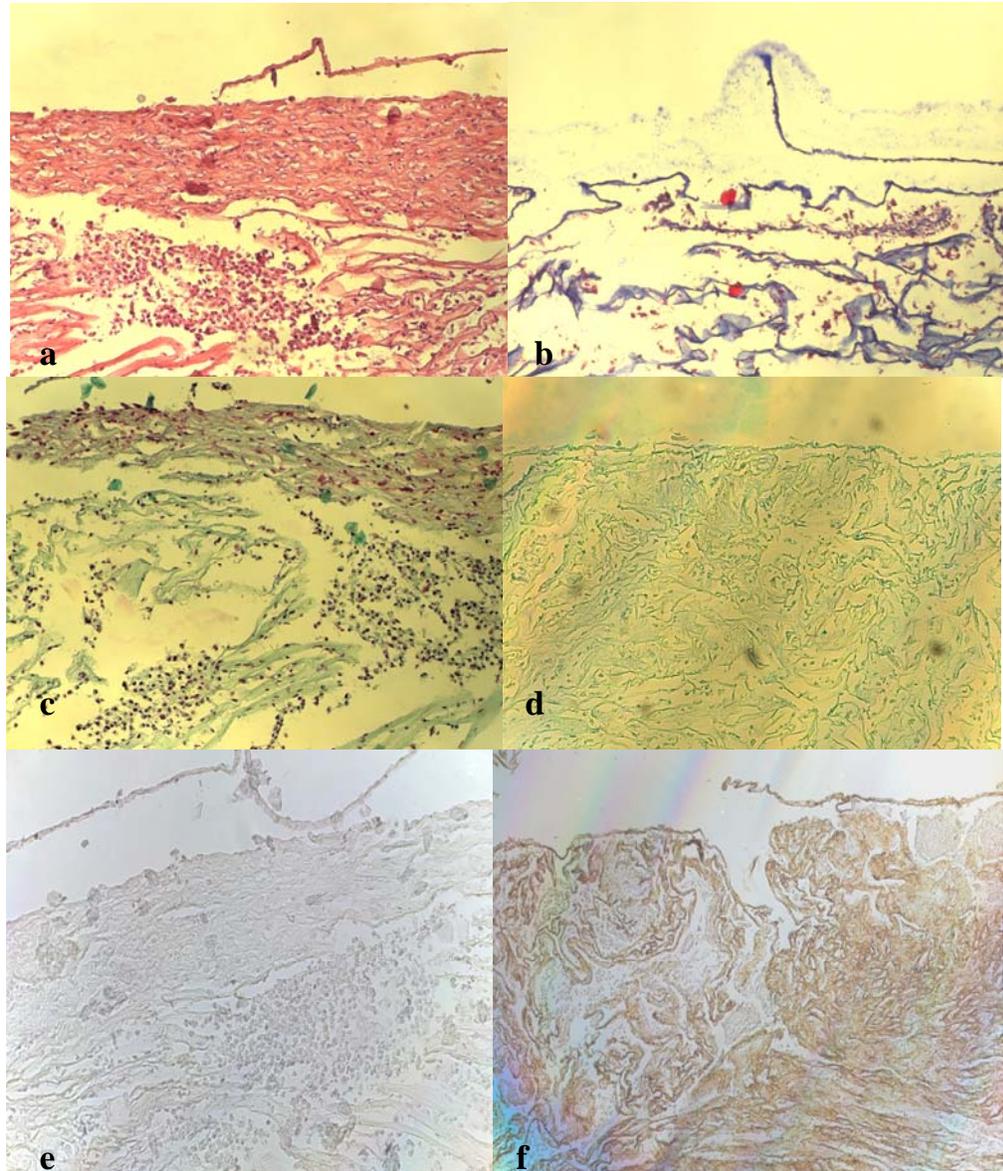


Fig. 11 Polímero sembrado sin implantarse en animales, fotomicrografías 100 veces amplificadas **a)** H y E donde se pueden observar células de aspecto blástico; **b)** Tricrómica de Masson se observa una matriz rica en colágena; **c)** Safranina O se observa la presencia de glucosaminoglicanos; **d)** Azul Alciano ; **e)** Expresión de proteínas de la MEC, colágena tipo II a través de Inmunohistoquímica , la cual se negativa; **f)** Positiva presencia de colágena tipo I a través del uso de Inmunohistoquímica.

Comparación cartílago articular reparado por sí mismo contra un cartílago reparado a través de un implante de condrocitos autólogos

Se tomaron las muestras más representativas obtenidas en ambos grupos, para así realizar su comparación (Fig. 12), en donde el tejido de reparación macroscópico del grupo control, es un tejido que no se integra completamente al tejido nativo de la periferia, el nivel del tejido se encuentra al mismo nivel en relación a la superficie articular, sin embargo su superficie es irregular, de color blanco, con textura lisa y de consistencia firme. La falta de integración al tejido nativo la podemos confirmar en la tinción de H y E ya que se puede observar la separación entre ambos tejidos. En el implante, macroscópicamente, observamos que el tejido de reparación, constructo, no se integra completamente al tejido vecino, se encuentra hundido en relación a la superficie articular, su superficie es irregular, de color blanco, con una textura lisa y de consistencia firme. Sin embargo aunque macroscópicamente no observamos una buena integración al tejido nativo de la periferia en la tinción de H y E podemos observar que el tejido de reparación esta bien integrado al tejido nativo.

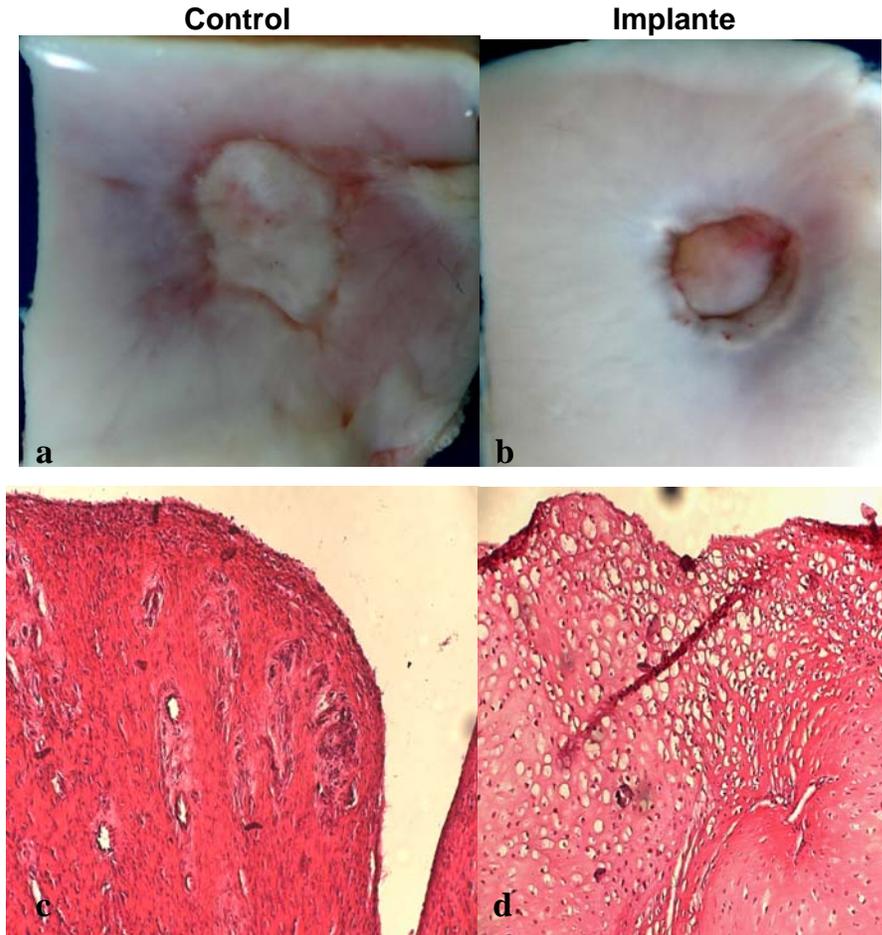


Fig. 12 Fotomicrografías 100 veces amplificadas **a)** Explante macroscópico de una lesión osteocondral reparada por sí misma; **b)** Explante macroscópico de una lesión osteocondral reparada a través de un implante de condrocitos autólogos; **c)** H y E de un control lesionado en donde se observa proliferación del tejido de granulación, neoformación vascular y proliferación de condrocitos; **d)** H y E de un implante en donde se observa fibrosis con proliferación de condrocitos así como neoformación vascular y zonas de calcificación y osificación endocondral.

Análisis de la presencia de fibrosis entre grupos

Al comparar la presencia de tejido fibroso entre ambos grupos se tomaron las muestras representativas de cada uno de los grupos (Fig. 13), en donde se observa que en el grupo control hay mayor presencia de fibras de colágena, éstas organizadas paralelamente a la superficie articular del cartílago, mientras que en el implante se observa en menor cantidad la presencia de fibras de colágena, también se puede observar la integración del constructo implantado al tejido adyacente.

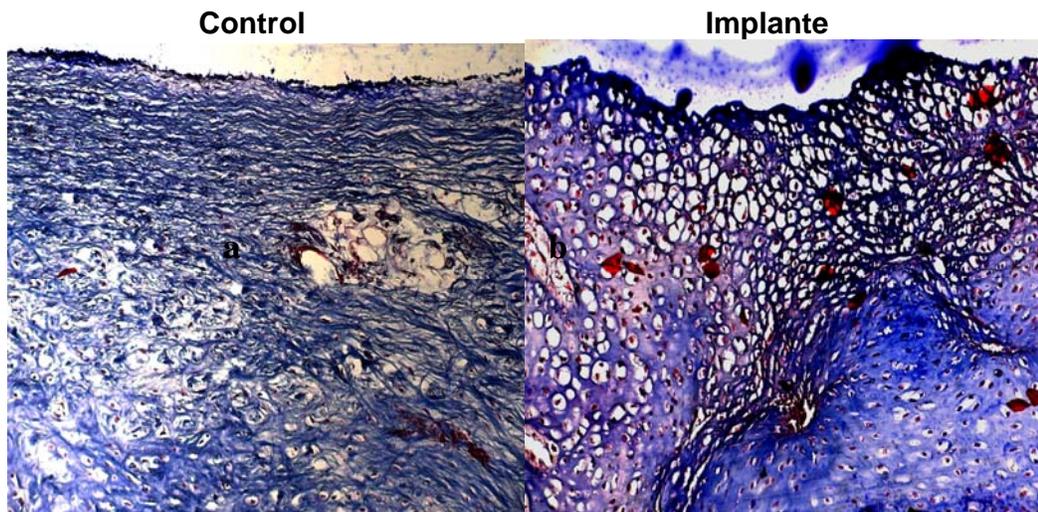


Fig. 13 Fotomicrografía 100 veces amplificada **a)** Tricrómica de Masson de un control donde se pueden observar zonas de mayor concentración de colágena y de fibrosis; **b)** Tricrómica de Masson de un implante en donde se observan fibras de colágena, neoformación vascular.

Análisis de proteínas de la Matriz Extracelular

Al realizar la histología e histoquímica para las proteínas de la matriz extracelular (Fig.14) se tomaron las muestras más representativas de ambos grupos, en donde observamos que con la tinción de Azul Alciano en el grupo control hay una pérdida por la afinidad tintorial debido a la ausencia de glucosaminoglicanos, en el implante se observa una pérdida de la matriz extracelular. En la tinción de Safranina O observamos que en el grupo control hay una proliferación de condrocitos dispuestos en grupos isógenos, mientras que en el implante se observa una pérdida de la matriz extracelular, lo cual nos lleva a una ausencia en el contenido de proteoglicanos, sin embargo ambos grupos presentan una pérdida de la afinidad tintorial. La expresión de colágena tipo II, proteína típica del cartílago articular sano, mediante inmunohistoquímica fue negativa tanto en el grupo control como en el implante, sin embargo la expresión de colágena I fue positiva en ambos grupos, lo que nos indica presencia de un tejido de tipo fibrocartilaginoso.

Control

Implante

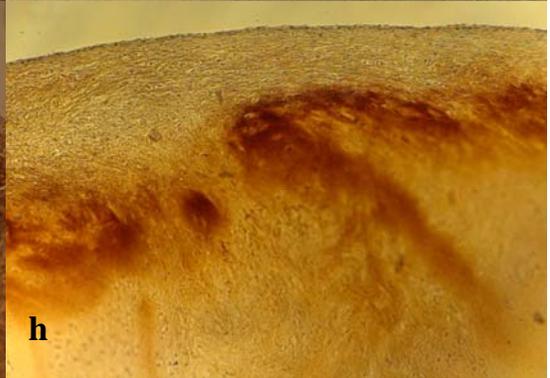
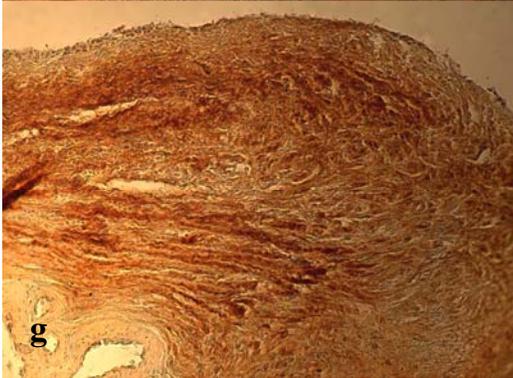
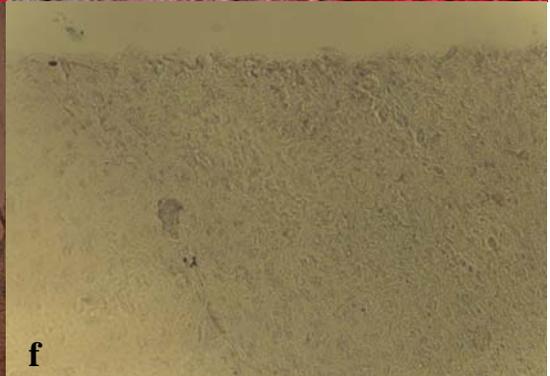
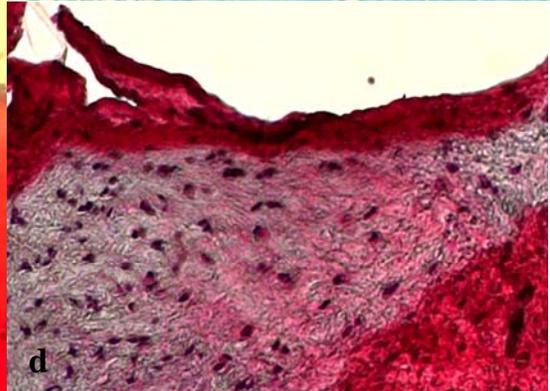
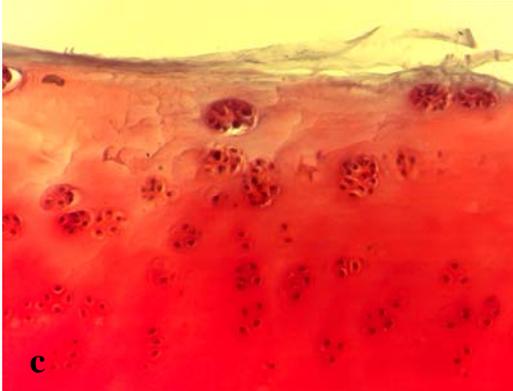
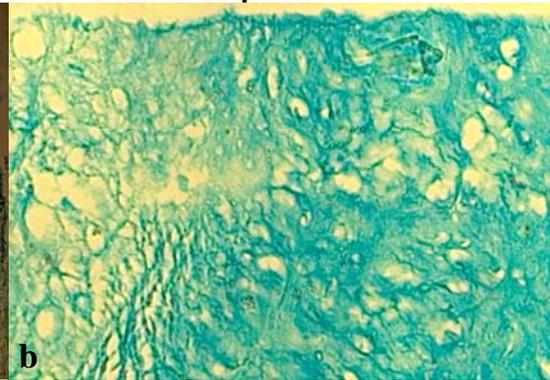
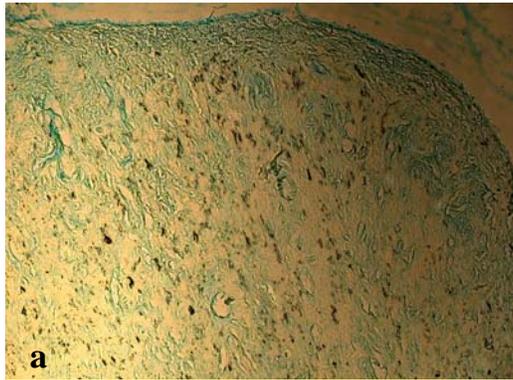


Fig.14 Fotomicrográficas (100 veces amplificadas) **a)** Azul Alciano de un control lesionado en donde se observa una pérdida por la afinidad tintorial; **b)** Azul Alciano de un implante donde se muestra pérdida de la matriz extracelular; **c)** Safranina O (200 veces amplificada) de un cerdo control lesionado donde se observa proliferación de condrocitos dispuestos en grupos isógenos y disminución de la afinidad tintorial; **d)** Safranina O de un control lesionado en donde se observa pérdida de la afinidad tintorial y pérdida de la matriz extracelular; **e)** Inmunohistoquímica para la expresión de colágena tipo II en un cerdo control lesionado la cual es negativa debido a que no hay presencia de la expresión de colágena tipo II; **f)** Inmunohistoquímica para la expresión de colágena tipo II en un Implante, la cual se observa con un resultado negativo; **g)** Inmunohistoquímica para la expresión de colágena tipo I, positivo, en un control lesionado; **h)** Inmunohistoquímica para la expresión de colágena tipo I, positivo, en un implante.

VII. DISCUSIÓN

La osteoartritis es una entidad patológica que se caracteriza por la degeneración progresiva y pérdida del cartílago articular, que provoca dolor crónico y disfunción articular. Desafortunadamente, la capacidad de regeneración espontánea del cartílago articular es muy limitada (Todhunter *et al.*, 1993; Buckwalter y Mankin, 1998). La osteoartritis tiene una gran importancia desde el punto de vista clínico y económico, lo cual da la pauta para buscar nuevas opciones de tratamiento médico y quirúrgico (Frisbie, 2004).

En el presente estudio se realizó un implante de condrocitos autólogos, utilizando como modelo de experimentación al cerdo, ya que éste presenta mayor espesor en el cartílago articular.

Estudios realizados anteriormente en el laboratorio de ingeniería de tejidos del INR, y publicados por el Dr. Villalobos, muestran un tejido de reparación más cercano al cartílago articular normal desde el punto de vista histológico. A diferencia en este estudio, se colocó una matriz diferente que es colágena (Resorb). Es probable que el andamio utilizando no sea el adecuado, esto debido a que la zona del implante es considerada como una zona de carga, por lo cual la resistencia de éste debiera ser mayor, y es probable que debido a la zona se hubieran perdido células del constructo.

De acuerdo a los resultados obtenidos con la evaluación histológica en el presente estudio, el tejido de reparación obtenido de ambos grupos (experimental y control) mostraba características de cartílago fibroso, y en donde tampoco se presentaron diferencias estadísticas significativas.

Esto hace suponer que posiblemente los parámetros evaluados en el tejido de reparación no fueron lo suficientemente específicos para poder establecer pequeñas diferencias entre ambos grupos, o que el tiempo para la evaluación del tejido fue muy corto. De acuerdo con los resultados de diferentes investigaciones (Frisbie, 2004; Hidaka *et al.*, 2003), se considera que el tiempo de evaluación es tan importante como la técnica de reparación condral

utilizada, para determinar las características histológicas del tejido de reparación.

Sin embargo, podemos concluir que con las técnicas de ingeniería de tejidos e implantación empleadas en el presente estudio, se indujo a la formación de un tejido de reparación en lesiones condrales, sin que necesariamente pudiéramos demostrar la obtención de cartílago articular con características normales.

En un futuro, será necesario realizar investigaciones a través de la ingeniería de tejidos, en donde se utilicen diferentes tipos de polímeros biocompatibles y biodegradables. Los cuales sean lo suficientemente resistentes como matriz, para utilizarlos en una zona articular de carga.

VIII. LITERATURA CITADA

1. Adams CS, Shapiro IM, The fate of the terminally differentiates chondrocyte: evidence for microenviromental regulation of chondrocyte apoptosis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2002; 13 (6):465-473.
2. Aherene FX, Brennan JJ. Nutrition and leg weakness. *Proc. Guelph Pork Symposium*. J.J. 1985; 157-163.
3. Aigner T, Stöve J, Collagens major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Osteoarthritis Cartilage* 2003; 3:501-512.
4. Aigner T, Gickert K, Von del Mark K. Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions. *Osteoarthritis Cartilage* 1997; 3:183-9.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, *Molecular Biology of the Cell* 4th edition. Garland Science, USA 2002, 1090-1125.
6. Altónaga JR, Gonzalo Orden JM. Resonancia Magnética del Sistema Músculo Esquelético. En: *Modelos animales de experimentación*: 227-231.
7. Archer CW, Redman S, Khan I, Bishop J, Richardson K. Enhancing tissue integration in cartilage repair procedures. *Journal of Anatomy* 2006; 209: 481-493.
8. Banks WJ. *Histología Veterinaria Aplicada*. México: Editorial El Manual Moderno, 1981; 132-145; 298-327.
9. Barnewitz D, Evers A, Zimmermann J, Wilke I, KapsC, Sittinger M. Tissue eingeneering: new treatment of cartilage alterations in degenerative joint diseases in horses-preliminary results of a long term study. *Berl. Münch. Tierarzatl Wonchenschr* 2003; 116: 157-161.
10. Beale BS, Hulse DA, Schulz KS, Whitney WO. *Small Animal Arthroscopy*. 1st ed. Philadelphia, Pennsylvania USA: Saunders, 2003:117-157.
11. Breinan HA, Minas T, Hsu H, Nehrer S, Sledge CB, Spector M. Effect of cultured autologous chondrocytes on repair of chondral defects in a

- canine model. *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1997; 79(10): 1439-1451.
12. Brittberg M, Lindhal A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *The New England Journal of Medicine* 1994; 331(14): 889-895.
 13. Brommer H, Van Weeren PR, Brama PAJ, Barneveled A. Quantification and aged-related distribution of articular cartilage degeneration in the equine fetlock joint. *Equine Veterinary Journal* 2003; 35 (7): 697-701.
 14. Buckwalter JA. Articular cartilage. *Instr Course Lectures* 1983; 32: 349-370.
 15. Buckwalter JA. Chondral and osteochondral injuries: mechanisms of injury and repair responses. *Operative Techniques in Orthopaedics* 1997; 7 (4): 263-269.
 16. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *Journal of Orthopaedics and Sports Physical Therapy* 1998; 28 (4): 192-202.
 17. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr. Course Lect.* 1998; 47:487-504.
 18. Canceda R, Donzin B, Giannoni P, Quatro R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix biology* 2003; 22(1) 81-91.
 19. Chang CH, Kuo TF, Lin ChCh, Chou ChH, Chen KH, Lin FH, Liu HCh. Tissue engineering-based cartilage repair with allogeneous chondrocytes and gelatin-chondroitin-hyaluronan tri-copolymer scaffold: A porcine model assessed at 18, 24, and 36 weeks. *Biomaterials*. 2006; 27: 1876-1888.
 20. Desjardins MR, Hurtig MB, Palmerr NC. Heterotopic transfer of fresh and cryopreserved autogenous articular cartilage in the horse. *Veterinary Surgery* 1991a; 20 (6): 434-452.

21. Desjardins MR, Hurtig MB, Palmer NC. Incorporation of fresh and cryopreserved bone in osteochondral autografts in the horse. *Veterinary Surgery* 1991b; 20 (6): 446-452.
22. Dewey CE. Enfermedades de los sistemas nervioso y locomotor. En: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editors. *Enfermedades del cerdo*. Buenos Aires, República Argentina: Inter-Médica, 2000:703-720.
23. Eckstein F, Hudelmaier M, Putz R. The effects of exercise on human articular cartilage. *Journal of Anatomy*. 2006; 208: 491-512.
24. Elisseeff J. Photoencapsulation of chondrocytes in polyethylene oxide-based semi-interpenetrating networks. *Journal of Biomedical Material Research* 2000; 51 (2): 164-171.
25. Fortier LA, Brofman PJ, Nixon AJ, Mohammed HO. Disparate chondrocyte metabolism in three-dimensional fibrin cultures derived from autogenous or commercially manufactured fibrinogen. *American Journal of Veterinary Research* 1998b; 59 (4): 514-520.
26. Frisbie DD, Trotter GW, Powers BE, Rodkey WG, Steadman JR, Howard RD, Park RD and McIlwraith CW. Arthroscopic subchondral bone plate microfracture technique augments healing of large chondral defects in the radial carpal bone and medial femoral condyle of horses. *Veterinary Surgery* 1999; 28 (4):242-255.
27. Frisbie DD, Nixon AJ, Lust G. Phenotypic expresión of equine articular chondrocytes grown in three-dimensional cultures supplemented with supraphysiologic concentrations of insulin-like growth factor-1. *American Journal of Veterinary Research* 2002a; 63 (2): 301-305.
28. Frisbie D. Current and future treatments of equine joint disease. Focus on joints Seminar of the American Association of Equine Practitioners (AAEP); 2004 July 22-24; Louisville, Kentucky: AAEP Seminar, 2004:157-176.
29. Garcíadiego D, Rosales C, Kato M, Chimal J, Coordination of chondrocyte differentiation and joint formation by $\alpha 5\beta 1$ integrin in the developing appendicular skeleton. *Development* 2004 131: 4735-4742.

30. Gartner LP and Hiatt JL. Color atlas of histology, 2nd ed. Baltimore USA: Williams & Wilkins, 1994.
31. Gartner LP y Hiatt JL. Histología texto y atlas. 2a ed. México: Mc. Graw-Hill, Interamericana, 2002.
32. Gelse K, Aigner T, Stöve J, Schneider H. Gene Therapy Approaches for Cartilage Injury and Osteoarthritis. Curr. Med. Chem.- Anti Inflammatory & Anti-Allergy Agents. 2005. 4:265-279.
33. Geneser F. Tejido esquelético. En: Histología. 2^a ed. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 1993: 200-205.
34. Geneser F. Histología. 3ra ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana, 2000.
35. Goldring MB. Molecular regulation of the chondrocyte phenotype. Journal Musculoskeletal Neuron Interact. 2002; 2 (6): 517-520.
36. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities. Science 2002; 295: 1009-1016.
37. Ham AW. Tratado de Histología. 7a edición. México: Editorial Interamericana, 1975.
38. Hangody L, Rathonyi GK, Duska Z, Vasarhelyi G, Fules P, Modis L. Autologous osteochondral mosaicoplasty. Surgical Technique. Journal of Bone and Joint surgery (American) 2004; 86-A Supplement 1: 65-72.
39. Hardingham T, Oldershaw R, Tew S. Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. Journal of Anatomy. 2006; 209: 469-480.
40. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. Arthritis Research 2002; 4 (suppl 3): 63-68.
41. Hayes DW Jr, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury and repair. Clinics in Podiatry Medicine & Surgery 2001: 18 (1): 35-53.
42. Hayes DW Jr, Averett RK. Articular cartilage transplantation. Current and future limitations and solutions. Clinics in Podiatry Medicine & Surgery 2001: 18 (1): 161-176.
43. Howard RD, McIlwraith CW, Trotter GW, Powers BE, McFadden PR, Harwood FL, Amiel D. Long-term fate and effects of exercise on sternal cartilage autografts used for repair for repair of large osteochondral

- defects in horses. American Journal of Veterinary Research 1994; 55 (8): 1158-1167.
44. Huber M, Trattnig S, Lintner F. Anatomy, biochemistry and physiology of articular cartilage. Investigative Radiology 2000; 35 (10): 573-580.
 45. Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining process insuperable? Osteoarthritis and Cartilage 1999a; 7: 15-28.
 46. Hunziker EB. Articular cartilage repair: Basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. Osteoarthritis and Cartilage 2001a; 10, 432-463.
 47. Hurtig MB, Novak K, McPherson R, McFadden S, McGann LE, Muldrew K, Schachar NS. Osteochondral dowel transplantation for repair of focal defects in the knee: An outcome study using an ovine model. Veterinary Surgery 1998; 27:5-16.
 48. Ibarra C, Koski JA, Warren RF. Tissue engineering meniscus: cells and matrix. Orthopaedics Clinics of North America 2000; 31: 411-418.
 49. Jorgensen C, Noel D, Apparailly F, Sany J. Stem Cells for repair of cartilage and bone: the next challenge in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases 2001; 60 (4): 305-309.
 50. Junqueira LC. Histología básica. 3ra edición. México: Salvat Editores: 1990.
 51. Kofron, Laurencin, Gene therapy in orthopaedics. Current gene therapy 2005 5 (1): 49-58.
 52. Kuettner KE, Pauli BU, Gall G, Memoli VA, Schenk RK. Synthesis of cartilage matrix by mammalian chondrocytes *in vitro* I. Isolation, culture characteristics and morphology. The Journal of Cell Biology 1982a; 93: 743-750.
 53. Kumar P, Oka M, Toguchida J, Kobayashi M, Uchida E, Nakamura T, Tanaka K. Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. Journal of Anatomy. 2001; 199: 241-250.

54. Langer R and Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260 (5110): 920-926.
55. Little C, Meeker C, Golub S, Lawlor K, Farmer P, Smith S, Fosang A. Blocking aggrecanase cleavage in the aggrecan interglobular domain abrogates cartilage erosion and promotes cartilage repair. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007; 117 (6): 1627-1636.
56. 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. *Annals of Biomedical Engineering* 2004; 32(1): 57-69.
57. Lombardero GG, Evaluación por resonancia magnética, artroscopia e histología de defectos condrales en caballos, reparado mediante técnicas de ingeniería de tejidos. (tesis de maestría) Ciudad de México (Distrito Federal) México. UNAM 2005.
58. Mallein GF, Kosher RA, Upholt WB, Tanzerr ML. Temporal and spatial analysis of cartilage proteoglycan core protein gene expression during limb development by in situ hybridization. *Developmental Biology*. 1998; 126 (2): 337-345.
59. Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (first of two parts). *The New England Journal of Medicine* 1974a; 291(24): 1285-1292.
60. Mankin HJ. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (second of two parts). *The New England Journal of Medicine* 1974b; 291(25): 1335-1340.
61. Marcacci M, Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Busacca M, Zaffagnini S. Arthroscopic Autologous Osteochondral Grafting for Cartilage Defects of the Knee. *American Journal of Sports Medicine* 2007; 35; 2014-2021.
62. Masri M, Ibarra C, Lombardero G, Paasch L, Situación Actual de la reparación condral en el equino. *Veterinaria México* 2006; 37(3) 369-378.

63. McIlwraith CW. General pathobiology of the joint and response to injury. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. Joint disease in the horse. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996:40-69.
64. McIlwraith CW, Nixon AJ. Joint resurfacing: attempts at repairing articular cartilage defects. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. Joint disease in the horse. Philadelphia:W.B. Saunders Company, 1996: 317-334.
65. Moran JM, Pazzano D, Bonassar LJ. Characterization of polylactic acid-polyglycolic acid composites for cartilage tissue engineering. Tissue Engineering 2003; 9 (1): 63-70.
66. Müller F, Müller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel M, Staudenmaier. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. Biomaterials. 2006; 27: 3955-3963.
67. Nakano T, Aherene FX, Thompson JR. Effects of feed restriction, sex, and diethylstilbestrol on the occurrence of joint lesion with some histological and biochemical studies of the articular cartilage of growing – finishing swine. Can J Anim Sci. 1981b; 59:167-179.
68. Nehrer S. Chondrocytes seeded collagen matrices implanted in a chondral defect in a canine model. Biomaterials 1998; 19(24): 2313-2328.
69. O'Brien F, Harley B, Waller M, Yannas I, Gibson L, Prendergast P. The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. Technology and Health Care. 2007; 15:3-17.
70. O'Driscoll SW. Preclinical cartilage repair: current status and future perspectives. Clinical Orthopaedics and Related Research 2001; (391 Suppl): 397-401.
71. Ochi M, Adachi N, Nobuto H, Yanada S, Ito Y, Agung M. Articular Cartilage Repair Using Tissue Engineering Technique – Novel Approach with Minimally Invasive Procedure. Artificial Organs 2004; 28 (1): 28-32.

72. Pacifici M, Koyama E, Iwamoto M. Mechanisms of Synovial Joint and Articular Cartilage Formation: Recent Advances, But Many Lingerin Mysteries. *Birth Defects Research (Part C)* 75: 237-248, 2005.
73. Platt D. Articular cartilage homeostasis and the role of growth factors and cytokines in regulating matrix composition, In McIlwraith CW, Trotter GW, editors. *Joint disease in the horse*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996; 29-40.
74. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, Path FRC, van der Berg WB. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2005; 1-17.
75. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, editors. *Laboratory methods in histotechnology*. 4th ed. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1991.
76. Roberts S, McCall IW, Darby AJ, Menage J, Evans H, Harrison PE, Richardson JB. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Research and Therapy* 2002; 5 (1): 60-73.
77. Rodríguez JI, Tejidos de sostén: Cartilaginosa y óseo, en: Paniagua Citología, España 1998.
78. Ross MH y Rieth EJ. *Atlas de histología*. Barcelona: Ediciones Doyma, 1987.
79. Rudert M, Hirschmann F, Schulze M, Wirth CJ. Bioartificial Cartilage. *Cells Tissues Organs* 2000; 167:95-105.
80. San Román F. El cartílago articular. *Iams Nutrition Symposium*. Chicago: (1) 2000.
81. Saraf A, Mikos A. Gene delivery strategies for cartilage tissue engineering. *Matrix Biology* 2006.
82. Schachar NS, Novak K, Muldrew K, Zernicke RF, McGann LE. Articular cartilage joint surface reconstruction techniques. *Journal of Orthopaedic Science* 1999; 4(6): 457-461.

83. Schenck RC. Strategies in contemporary tissue engineering. Proceedings of the 68th Annual Meeting; 2001 March 1; USA. American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2001.
84. Schneider RK, Jenson P, Moore RM. Evaluation of cartilage lesions on the medial femoral condyle as a cause of lameness in horses: 11 cases (1988 – 1994). Journal of the American Veterinary Medical Association 1997; 210(11): 1649-1652.
85. Schultz O, Sittinger M, Haeupl T, Burmester GR. Emerging strategies of bone and joint repair. Arthritis Research 2000; 2: 433-436.
86. Smith GD, Knutsen G, Richardson JB. A clinical review of cartilage repair techniques. Journal of bone and Joint Surgery British Volume. 2005; 87-B (4): 449-445.
87. Suh J, Aroen A, Muzzonigro T, Disilvestro M, Fu F. Injury and repair of articular cartilage: related scientific issues. Operative Techniques in Orthopaedics 1997; 7 (4): 270-278.
88. Taylor J, Richardson J. Cartilage culture. Trauma 2001; 3: 205-209.
89. Temenoff JS and Mikos AG. Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. Biomaterials 2000; 215(5): 431-440.
90. Todhunter RJ, Anatomy and Physiology of Synovial Joints. In: McIlwraith CW, Trotter GW, editors. Joint disease in the horse. Philadelphia: W.B. Saunders Company 1996:1-28.
91. Vacanti JP and Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. Lancet 1999; (354 Supp) 1: 132.134.
92. Vachon AM, McIlwraith CW, Trotter GW, Noeedin RW, Powers BE. Neochondrogenesis in free intra-articular, periosteal, and perichondrial autografts in horses. American Journal of Veterinary Research 1989; 50 (10): 1787-1794.
93. 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. American Journal of Veterinary Research 1992; (6): 1038- 1047.

94. Van der Kraan PM, Buma P, Van Kuppevelt T, Van den Berg WB. Interaction of chondrocytes, extracellular matrix and growth factors: relevance for articular cartilage tissue engineering. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10: 631-637.
95. Velasquillo C, Garciadiego D, Ibarra C. Diferenciación del cartílago articular y osteoarthritis *Rheumatology Clinic*. 2007; 3 Sup1 4:S2-5.
96. Verdonk R, Steinwachs M, Vanlauwe J, Engebretsen L. Current opinion of orthopaedic surgeons on cartilage repair: the results of a global web-based survey. *Trends in cartilage repair*. 2006;1-16.
97. Warford A, Lauder I. In situ hybridization in perspective. *Journal of Clinical Pathology* 1991; 44:177-181.
98. Yates KE, Shortkroff S, Reish RG. Wnt Influence on Chondrocyte Differentiation and Cartilage Function. *DNA and Cell Biology Volume* 2005; 24(7): 446-457.
99. Yi Lee Ch, Liu X, Chaung H, Ping Z. A Modified Cell Culture Method for Autologous Chondrocyte Transplantation. *Connective Tissue Research*, 46:93-99, 2005.
100. Yun K, Tae Moon H. Inducing Chondrogenic Differentiation in Injectable Hydrogels Embedded with Rabbit Chondrocytes and Growth Factor for Neocartilage Formation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008; 105 (2): 122-126.
101. Zijun Zhang, J Mitchel McCaffery, Hyaline cartilage engineered by chondrocytes in pellet culture: histological, immunohistochemical and ultra structural analysis in comparison with cartilage explants. *J. Anat* 2004 205: 229-237.