



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
"HOSPITAL GENERAL DR. MANUEL GEA
GONZALEZ"

**"DESARROLLO DE TEJIDO CARTILAGINOSO OBTENIDO
POR INGENIERIA TISULAR EN RATAS. CARACTERISTICAS
POSTIMPLANTACIÓN CON DOS METODOS DE OBTENCIÓN
CELULAR"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER LA ESPECIALIDAD DE
CIRUGIA PLASTICA Y RECONSTRUCTIVA

PRESENTA

DR. HÉCTOR AGUSTÍN CANTÚ MARTÍNEZ

Director de Tesis:

DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA

Investigador asociado:

DR. CHRISTIAN MORALES OROZCO

Investigador en Ciencias Médicas:

M en C. MIRZA GABRIELA ROMERO VALDOVINOS

Investigador en Ciencias Médicas

QFB. MARGARITA LEYVA LEYVA

Jefe del Departamento de Patología.

DRA. SARA PARAGUIRRE MARTÍNEZ.



MEXICO D.F.

AGOSTO 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

Al departamento de Bioterio, especialmente a los veterinarios Pedro Palomares Pérez y Luis E. Fernández Amaya, al Departamento de Biología Molecular e Histocompatibilidad, así como al departamento de patología por toda su ayuda para el desarrollo de este protocolo experimental, ya que sin su ayuda este trabajo no hubiera podido realizarse.

**Este trabajo fue realizado en el Hospital General Dr. Manuel Gea González
bajo la Dirección del DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA.**

Este trabajo de Tesis con No.PROT-05-86-2006, presentado por el alumno HÉCTOR AGUSTÍN CANTÚ MARTÍNEZ se presenta en forma con visto bueno por el Tutor principal de la Tesis DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA, con fecha del 20 DE JULIO DEL 2009 para su impresión final.

**TUTOR PRINCIPAL
DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA**

Autorizaciones

Dr. OCTAVIO SIERRA MARTÍNEZ
Director de enseñanza
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA
Jefe de la División de CIRUGIA PLASTICA Y RECONSTRUCTIVA
Hospital General “Dr. Manuel Gea González”

DESARROLLO DE TEJIDO CARTILAGINOSO OBTENIDO POR INGENIERIA TISULAR EN RATAS. CARACTERISTICAS POSTIMPLANTACIÓN CON DOS METODOS DE OBTENCIÓN CELULAR

Colaboradores:

Nombre: DR. FERNANDO MOLINA MONTALVA

Firma: _____

Nombre: DR. CHRISTIAN MORALES OROZCO

Firma: _____

Nombre: M en C. MIRZA GABRIELA ROMERO VALDOVINOS

Firma: _____

Nombre: QFB. MARGARITA LEYVA LEYVA

Firma: _____

Nombre: DRA. SARA PARAGUIRRE MARTÍNEZ

Firma: _____

INDICE

Glosario	IV
Relación de figuras y tablas	7
Resumen	8
Abstract.....	9
1. Introducción y Antecedentes.....	10
2. Justificación	18
3. Hipótesis	18
4. Objetivos	18
4.1. Objetivo General.....	18
4.2. Objetivos Específicos	18
5. Material y Métodos.....	19
5.1. Tipo de estudio	
5.2. Universo	
5.3. Tamaño de la Muestra	
5.4. Variables	
5.5. Criterios de selección de la muestra	
5.6. Procedimiento	
5.7. Análisis estadístico	
5.8. Consideraciones Éticas	
6. Resultados	27
7. Discusión	34
8. Conclusiones	37
9. Bibliografía.....	38

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema de cuadrícula de las 12 regiones en donde se inocularon los cultivos celulares (cel), con sus diferentes concentraciones de Acido Hialuronico (AH) y de Fibrina (F), siendo los de la columna derecha de cartílago auricular y los de la izquierda de grasa Inguinal.

Figura 2.- Imagen del dorso de la rata en donde se observa la distribución de las regiones en estudio, en donde mediante mínimas incisiones se introdujeron los cultivos celulares mezclados con las diferentes concentraciones de fibrina y Acido Hialuronico.

Figura 3.- Tinción de Hematoxilina y Eosina (HE) 40x. Se observan nichos celulares de condrocitos bien estructurados, con núcleos definidos e intensamente teñidos.

Figura 4.- Tinción de Azul Alcian 40x. Se tiñen de color rosa los núcleos celulares, con una matriz extracelular teñida de azul.

Figura 5.- Tinción de Von Kosa 20x. Núcleos teñidos de color rosa, esparcidos en la matriz cartilaginosa.

Figura 6.- Tinción de fibras elásticas 40x, se observa la presencia de elastina demostrada por un color pardo.

Figura 7.- Técnica de inmunohistoquímica se identificó la Proteína Morfogénica de Hueso (BMP)

Figura 8.- Tinción de HE de las regiones 1 y 2. Se observa crecimiento de células cartilaginosas, distribuidas en forma laminar en la periferia del andamio de AH.

RESUMEN

Antecedentes: Se han obtenido múltiples tejidos mediante ingeniería tisular utilizando diferentes andamios, incluyendo el tejido cartilaginoso.

Objetivo: Obtener tejido cartilaginoso mediante el desarrollo de 2 líneas celulares derivadas de condrocitos y células madres mesenquimatosas derivadas de grasa. Determinar el efecto del Acido Hialurónico(AH) y fibrina, aprobados para su uso en humanos utilizándolos como andamios.

Material y métodos: se utilizaron 25 ratas Wistar a las que se les extrajeron cartílago auricular y grasa inguinal y mediante técnicas de ingeniería tisular, se obtuvieron condrocitos y células madre mesenquimatosas de grasa, diferenciadas hacia la línea condral. Posteriormente se reinsertaron en los andamios y después de 5 semanas post implantación se analizaron los tejidos obtenidos.

Resultados: Se obtuvo tejido cartilaginoso al implantarse células condrales derivadas de ambas líneas celulares, demostrado mediante tinciones específicas (HE, Azul Alcian, Von Kosa) e inmunohistoquímica (Colágena tipo 1 y BMP). Posterior a la colocación los implantes aumentan de consistencia de una manera significativa estadísticamente $p < 0.01$. La proporción de AH y de fibrina inciden en la consistencia de una manera significativa $p < 0.05$.

Conclusión: Se obtuvo tejido cartilaginoso derivado de 2 líneas celulares. La utilización de diferentes concentraciones de AH y Fibrina incide en la consistencia del implante.

ABSTRACT

Background: Multiples tissues have been obtained by means of tissue engineering, including cartilage, using several scaffolds.

Objective: Obtain cartilage by 2 different cell lines in culture derived from chondrocytes and fat mesenchymatous stem cells. Determine the effect of Hyaluronic acid and fibrin glue in the constructs.

Material and methods: Auricular cartilage and inguinal fat was obtained from 25 Wistar rats. Cell expansion by culture and construction of implants in scaffolds made from hyaluronic acid (HA) and/or fibrin glue was done before reimplantation. Five weeks later, tissue was obtained from the rats and analyzed.

Results: Cartilaginous tissue was obtained when constructs made from cells derived from two cell lines in HA and fibrin glue scaffolds were inserted for 5 weeks. Cartilage was demonstrated by Alcian blue, Hematoxylin-eosin and Von Kosa stains, and immunohistochemistry (Type 1 collagen and bone morphogenetic protein antibodies). Hardness of constructs increases after implantation ($p < 0.01$). HA and fibrin also affect the hardness ($p < 0.05$)

Conclusion:

Cartilage tissue was obtained from two different cell lines. HA and fibrin glue proportion in the construct affects the hardness of the implant, before and after implantation.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La pérdida tisular es uno de los mayores retos encontrados por el cirujano plástico. Un abordaje que se ha utilizado para este problema, es la utilización de tejido heterólogo, sin embargo este tiene el inconveniente de necesitar inmunosupresión para evitar el rechazo. En la actualidad, el trasplante autólogo, se ha vuelto el estándar de oro para la reconstrucción de tejidos para una serie de patologías que implican pérdida tisular, entre las que se encuentran las malformaciones congénitas, traumatismos, resecciones por cáncer, así como para la reparación de músculo, hueso y cobertura cutánea después de quemaduras.

Los principales inconvenientes del trasplante autólogo, son los riesgos quirúrgicos, la dificultad técnica y la morbilidad del área donadora (1). Se ha intentado el uso de materiales aloplásticos como el teflón, silicón y otros, pero tienen múltiples inconvenientes como rechazo, exposición e infección, por lo que su uso es cuestionado en la actualidad.

Uno de los tejidos más utilizados en la reconstrucción es el cartílago, el cual tiene múltiples usos; ha sido exitoso para diseñar o mejorar el contorno debajo de la piel, reconstrucción auricular, reconstrucción nasal, reconstrucción de párpados, tratamiento de degeneración articular, reconstrucción de pezones, tratamiento de enoftalmos y otros (2).

El cartílago es un tejido altamente especializado que consiste en condrocitos embebidos en una matriz extracelular compuesta primariamente por proteoglicanos (PGs), agua y colágena. A diferencia del hueso, este tiene una menor vascularidad, por lo que posee una menor capacidad de regeneración (2) por lo que la lesión cartilaginosa usualmente resulta en formación de cicatriz en vez de regeneración (3). La nutrición a través de difusión en vez de una red vascular, permite que el cartílago pueda ser transferido de un sitio a otro, pudiendo ser tallado en formas complejas, por ejemplo en orejas para la reconstrucción en malformaciones congénitas (4), y reconstrucción facial. El cartílago es un material bifásico, con una matriz sólida que consiste en una red

de colágena densa suspendida en un gel de PGs y una fase fluida intersticial. Las células componen únicamente un pequeño porcentaje del volumen del cartílago (1% a 12%), los requerimientos metabólicos del condrocito son mucho menores que las células en tejidos vascularizados. El condrocito secreta continuamente moléculas extracelulares incluyendo colágena, glicosaminoglicanos (GAG), y elastina; cada una se relaciona con las características biomecánicas. Al proliferar los condrocitos, se envuelven en una matriz multilaminada y forman una unidad denominada condrón. En el condrón la matriz pericelular es rica en PGs y ácido hialurónico (AH). Los PGs con cargas moleculares negativas son los responsables de mantener la hidratación la resistencia compresiva. Estos incluyen el condroitin 4-sulfato, condroitin 6-sulfato, dermatán sulfato y queratán sulfato. También existen PGs no agregantes como el biglicano y el decorin, cuyo propósito no está establecido claramente. La matriz interterritorial del condrón es rica en colágena así como en PGs y otras proteínas. El tipo predominante de colágena en cartílago elástico y hialino es el tipo I con cantidades menores de tipo VI, tipo IX, tipo XI y otros. En el fibrocartílago, la colágena predominante es tipo I (hasta 90%), con menor cantidad de tipo II, tipo III y tipo V. Otras proteínas como la elastina encontrada en el cartílago elástico, en combinación con la colágena, son capaces de sostener la tensión. La organización de la matriz se relaciona con la función. El cartílago articular es importante para la lubricación y resistencia, el intervertebral absorbe los impactos transfiriendo la fuerza de un vector axial a uno tangencial; los cartílagos de tráquea, oreja, nariz, faringe y costillas mantienen la forma, dan resistencia y proveen flexibilidad.(2)

La estructura relativamente simple del cartílago, ha permitido un progreso significativo en la ingeniería tisular del mismo. El cartílago puede ser dividido en diversas categorías dependiendo de la composición de la matriz y de su papel biológico en el cuerpo. El cartílago hialino, que es rico en colágena tipo II se encuentra en las costillas, tráquea y superficies articulares. El cartílago elástico contiene elastina y se encuentra en tejidos como oído externo, epiglotis y laringe. El fibrocartílago, rico en colágena tipo I se encuentra en tejidos

sometidos a tensión, como la porción externa de discos intervertebrales, meniscos y ciertos ligamentos y tendones (2).

Las zonas donadoras de cartílago autólogo para reconstrucción craneofacial se encuentran en raíz y reborde del hélix auricular, concha auricular, cartílago septal y cartílago costal. El cartílago fresco autólogo sobrevive fácilmente los procedimientos de trasplante y casi no se reabsorbe a través del tiempo (2,4). Para la reconstrucción articular se ha utilizado cartílago articular de zonas no comprometidas (5). La mayor zona donadora de cartílago es el costal. Este cartílago es moldeable y fácilmente moldeable en diferentes formas. Los inconvenientes principales son el procedimiento invasivo para obtenerlo, la calcificación en pacientes mayores (2,6) y las deformidades en la parrilla costal postoperatoria (7,8). La concha auricular y el septum cartilaginosa nasal son otras zonas de uso común en rinoplastia reconstructiva y estética, reconstrucción de órbita y pezón (2). Los injertos pueden usarse en tabla o machacados para relleno (9-11).

El trasplante de cartílago alogénico se usó en la primera mitad del siglo XX (2), sin embargo estudios posteriores demostraron que a pesar de que los condrocitos se encuentran en un ambiente privilegiado inmunológicamente, protegidos por la matriz extracelular (otros ejemplos incluyen la córnea y la epidermis), la celularidad de los injertos disminuye progresivamente, y a largo plazo todos los aloinjertos de cartílago se reabsorben significativamente (12). Los xenoinjertos tienen un pronóstico aún peor (13). Otra preocupación por el uso de cartílago de fuentes alogénicas o xenogénicas es la transmisión de enfermedades virales. Aunque no hay casos reportados de transmisión de VIH asociados a aloinjertos de cartílagos, no se recomienda el uso de aloinjertos o xenoinjertos de cartílago (2). Los condrocitos no expresan receptores CD34, sin embargo el tejido puede contaminarse con sangre durante la extracción. Si existen casos reportados de transmisión de virus de hepatitis C asociados a aloinjertos óseos (14,15). Estas limitantes colocan al trasplante autólogo como el candidato ideal para la obtención de cartílago, sin embargo la limitación

cuantitativa de los sitios donadores y la morbilidad asociada a la obtención, nos obligan a buscar nuevas soluciones.

Algunos de los abordajes más promisorios para la reconstrucción tisular y la reparación del cartílago es el uso de ingeniería tisular para generar nuevo tejido cartilaginoso (1,16-17). La investigación en células madres mesenquimatosas de médula ósea que pueden ser estimuladas para diferenciarse en líneas condrogénicas, osteogénicas, neurogénicas y otras; y el uso de células progenitoras multilinaje obtenidas de tejido graso lipoaspirado son rutas promisorias para obtener cartílago con menor morbilidad en el sitio donador que el uso de cartílago autólogo (1,17-28). En la actualidad, múltiples grupos han logrado aislar células madres mesenquimatosas de tejido lipoaspirado procesado (PLA) y diferenciarlas a estructuras cartilaginosas. Incluso hay reportes de estudios preclínicos y series clínicas iniciales en donde se muestra que las células madre derivadas de tejido adiposo puede utilizarse para el relleno de defectos tisulares (29)

Otros grupos han abordado el tema de otra manera, en teoría, una muestra pequeña de condrocitos se podrían obtener por digestión enzimática de cartílago no comprometido. Estas células pueden crecer in vitro, y al tener una cantidad suficiente, combinarse con un andamio o polímero biológicamente compatible, y ser transplantado en el sitio deseado para restaurar la función (2). Este abordaje ha sido probado en modelos animales, y recientemente en humanos y ya ha alcanzado aplicaciones clínicas (30-34).

El otro elemento crítico para la ingeniería tisular del cartílago es encontrar un andamio adecuado que permita o acelere la formación de nueva matriz extracelular. El uso de polímeros, naturales y sintéticos que se reabsorba controladamente, puede ser favorable in vivo e in vitro. Diversos andamios han sido probados en modelos animales para la ingeniería de cartílago, entre ellos se encuentran esponjas de colágena, AH, hidrogeles como la fibrina, y andamios sintéticos poliméricos como ácido poliláctico, polietileno, polipropileno y polivinilo (35-40). Se ha propuesto que el AH, un componente de la matriz extracelular

predominante durante la embriogénesis de las extremidades, actúa como un protector celular (33)

Actualmente, el tratamiento más común para una lesión articular es crear microfracturas y sangrado en el hueso subcondral con el intento de estimular la regeneración cartilaginosa, sin embargo el cartílago así formado no posee las características biomecánicas del cartílago articular normal lo que lleva a resultados a largo plazo inconsistentes; también se ha utilizado el implante autólogo de condrocitos en la articulación (28, 41,42). La carga económica actual ocasionada por las patologías articulares es muy alta (28). Sin embargo, el tratamiento actual dista de ser ideal, por lo que la investigación en el desarrollo de cartílago con las propiedades biomecánicas específicas para cada objetivo es intensa.

El uso de células madre para la inducción osteogénica y condrogénica está ampliamente caracterizada (19-22), y en nuestro servicio en conjunto con los investigadores del departamento de biología molecular e histocompatibilidad, tenemos experiencia para tener una viabilidad de células madre obtenidas de médula ósea u otros tejidos y hacer una inducción bioquímica a diferentes líneas histológicas en el modelo animal.

En 2001 Zuk y cols. (19) describieron una población de células derivadas del tejido lipoaspirado humano con potencial de diferenciarse en diferentes líneas celulares. La extracción celular la realizan mediante liposucción convencional con técnica tumescente. Después de lavado se logra un rendimiento medio de 404 millones de células (43). En un trabajo posterior (44), caracterizaron esta población celular. La inducción condrogénica, bajo condiciones de micromasa, logra una condensación celular a las 12 horas después de la inducción, seguido por la formación de crestas y nódulos a los 2 días. Los nódulos en esta etapa son positivos para la tinción AB que tiñe PGs sulfatados. La condrogénesis es dependiente de la alta densidad, y de la presencia de factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1). Los nódulos inducidos por 14 días expresan queratán, condritín sulfato y colágena tipo II. Cuantitativamente, existe un

aumento en la expresión de PGs sulfatados hasta las 2 semanas de inducción, seguido de una disminución a las 3 semanas. Esto puede representar una remodelación de la matriz condral. El medio de cultivo resulta en la expresión génica consistente con la condrogénesis, específicamente colágena tipo II isoformas IB y IIB (21). También expresan el PG aggrecan, entre los días 7 al 10. Otras colágenas inducidas son tipo I y III, además de los PGs, decorin y biglican. Huang y cols. en 2002, con un método similar obtuvieron células madre de los cojines grasos inguinales de las ratas y logran su diferenciación condrogénica y osteogénica. Después de la expansión en cultivo por tres recambios, logran la diferenciación condrogénica utilizando TGFβ-1, insulina, transferrina y dexametasona como inductores. Mediante tinción con Azul Alcian determinaron la presencia de PGs sulfatados y mediante inmunohistoquímica la presencia de colágena tipo II. No se observa condrogénesis con cultivos celulares con densidades celulares menores a las 1×10^6 /ml. Usando un método diferente, Ericksson y cols. en 2002, lograron inducir diferenciación condral in vivo e in vitro usando una matriz de alginato en células madre derivadas de liposucción. El medio condrogénico incluyó piruvato de sodio, ascorbato 2-fosfato, dexametasona y TGFβ-1. El cartílago diseñado fue insertado en ratones inmunotolerantes, con lo que demostraron la presencia de colágena tipo II, colágena tipo VI y aggrecan (componente estructural cartilaginosa) mediante inmunohistoquímica. A las 12 semanas, las células se encontraron embebidas en una matriz extracelular con características inmunohistoquímicas similares a los controles de cartílago humano (28). Interesantemente también encontraron una disminución in vitro de la biosíntesis después de dos semanas de cultivo, este tiempo también mostró la máxima concentración de moléculas de matriz. Argumentan que este fenómeno puede ser regulado por una retroalimentación negativa que incluye el receptor CD44 al hialuronato. La composición a largo plazo de la matriz extracelular parece depender de las características del microambiente tisular.

Otro abordaje de importancia en la ingeniería tisular del cartílago, es la obtención de cartílago autólogo, su expansión en cultivo y su posterior reimplante (2).

Rodríguez y cols. demostraron la posibilidad de generar cartílago nuevo a partir de condrocitos articulares humanos (44). Posteriormente van Osch y cols. (van Osch, 2001) lograron diseñar cartílago derivado de condrocitos obtenidos de aurículas de conejos jóvenes y adultos, así como de humanos. Después de 5 a 8 semanas los condrocitos humanos pudieron insertarse en matrices de alginato como andamio. Encontraron una mayor cantidad de producción de colágena tipo II al suministrar TGF- β e IGF (35).

Recientemente Mesa y cols. (34) utilizaron condrocitos aislados de rodilla y cadera de ovejas, implantados en un andamio de fibrina en tejido subcutáneo de ratones desnudos. La forma inicial se conservó durante 12 semanas, con un aumento discreto de la masa en los derivados de ovejas jóvenes. Encontraron formación de colágena a las 7 y 12 semanas y contenido de GAGs en la matriz extracelular. El cartílago derivado de ovejas jóvenes mostró una mayor formación de colágena, DNA y GAGs que el de ovejas adultas. Emans y cols, en conejos, aislaron cartílago articular de rodilla y lo expandieron por 3 recambios. Utilizando andamios de polietilenglicolteraftalato / polibutilenteraftalato reimplantaron los condrocitos después de 5 semanas de cultivo. Utilizaron un sello de hialuronato en la cápsula articular posterior al reimplante. Cinco días después del reimplante, se aislaron los cartílagos. La viabilidad de los condrocitos al momento de la colocación en el andamio fue de 90%, y la de las células periósticas cultivadas en suero autólogo fue de 79%. Se observó una disminución de la viabilidad después de la implantación (78.7 ± 8.8 vs. 119.9 ± 1.9 , $p < 0.001$). La expansión de los condrocitos no fue afectada por cultivo en suero bovino fetal o autólogo. Cuando se administró AH, el número de células periósticas sobrevivientes aumentó significativamente (44.2 ± 16.6 vs $19.8 \pm 11.9\%$ $p < 0.05$). Se postula que las células periósticas expresan el receptor CD44 para

hialuronato, lo que los puede proteger a la muerte celular en presencia de este compuesto. Los autores postulan que la adición de AH, en combinación con la inducción o diferenciación condrogénica de células progenitoras, antes de la implantación, puede aumentar la viabilidad del hueso y cartílago con fines de ingeniería tisular. Esta hipótesis amerita mayor investigación.

En cuanto al andamio utilizado para la reinserción de los condrocitos, se han utilizado diferentes abordajes, que incluyen polímeros plásticos, como polietileno y ácido poliláctico, hidrogeles, colágena y fibrina. El gel de fibrina y el AH se encuentran aprobados para uso clínico, comercializándose con el nombre de Beriplast y Restylane respectivamente (Entre otras marcas comerciales). La fibrina tiene indicación en cierre de meninges, cirugía vascular, cardíaca entre otros. El AH se usa como relleno absorbible para defectos cutáneos como cicatrices y arrugas. El uso de gel de fibrina ha sido utilizado por diversos grupos como andamio para la ingeniería tisular del cartílago (31, 36, 37). Lottman y cols. demostraron que el sembrado de condrocitos en gel de fibrina permite una expansión de 4 a 8 veces de número de células, similar al cultivo en alginato. La cantidad de GAGs fue 50% mayor con el cultivo en fibrina que en monocapa ($p < 0.01$), y que en alginato ($p < 0.5$) cuando la concentración de fibrina fue una dilución $\frac{1}{2}$ de Tyseel (fibrinógeno 1X=75-115 mg/ml, aprotinina 1X=3000 KIU/ml, trombina 1X=500 IU/ml) reportando una mayor eficiencia en la retención de GAGs en el andamio (37). Westreich y cols (Westreich, 2004) validó un modelo de cartílago autólogo inyectable utilizando un andamio de fibrina utilizando condrocitos tomados de cartílago auricular de conejos (36). El uso de Restylane® con fibroblastos autólogos cultivados se ha utilizado clínicamente para aumentar el tiempo de reabsorción del relleno (45). Los autores demostraron una mínima reabsorción con seguimiento mayor a un año. Recientemente, utilizando cartílago de concha auricular, Yanaga y cols(32) expandieron el cartílago mediante cultivo con suero autólogo, lo que aumentó la proliferación. Los condrocitos fueron subcultivados en forma de gel, este cultivo

junto con suero autólogo fue inyectado subcutáneamente en el periosteo y en bolsillo subcutáneo. Las lesiones cambiaron de forma de gel blando a cartílago duro en 2 a 3 semanas y se estabilizaron. No se apreció ninguna reabsorción en el seguimiento hasta de 34 meses. La biopsia de los tejidos de neoformación demostró que el tejido era cartílago elástico derivado del tejido original.

Recientemente la ingeniería tisular de cartílago ha alcanzado fases clínicas, sin embargo, aún quedan por definirse las mejores estrategias para la diferenciación cartilaginosa, el tejido donador ideal y el método de inserción, con o sin andamio. Es importante desarrollar nuevas técnicas que conjunten la ingeniería tisular con aplicaciones clínicas utilizando para el cultivo tisular, materiales y medios aprobados para uso clínico.

junto con suero autólogo fue inyectado subcutáneamente en el periosteo y en bolsillo subcutáneo. Las lesiones cambiaron de forma de gel blando a cartílago duro en 2 a 3 semanas y se estabilizaron. No se apreció ninguna reabsorción en el seguimiento hasta de 34 meses. La biopsia de los tejidos de neoformación demostró que el tejido era cartílago elástico derivado del tejido original.

Recientemente la ingeniería tisular de cartílago ha alcanzado fases clínicas, sin embargo, aún quedan por definirse las mejores estrategias para la diferenciación cartilaginosa, el tejido donador ideal y el método de inserción, con o sin andamio. Es importante desarrollar nuevas técnicas que conjunten la ingeniería tisular con aplicaciones clínicas utilizando para el cultivo tisular, materiales y medios aprobados para uso clínico.

JUSTIFICACIÓN.

El cartílago tiene aplicaciones para la reconstrucción de tejidos blandos, especialmente en el área craneofacial; el cartílago ideal es autólogo, sin embargo las zonas donadoras son escasas y causan morbilidad en el área donadora. La articular es una patología frecuente y un problema de salud pública, asimismo, el cartílago tiene poca capacidad de recuperación. Las características histológicas y bioquímicas de los diferentes tipos de cartílago determinan su función. Es importante obtener fuentes de cartílago ideales para reconstrucción de los cartílagos intraarticulares y del área craneofacial, la nariz, el tarso, tórax y el pabellón auricular, con las características biomecánicas para cada zona particular.

HIPÓTESIS.

¿Existen diferencias estadísticamente significativas en las características morfológicas, histológicas y la composición del cartílago obtenido mediante:

A) El método de inducción condrogénica de células madre de tejido graso.

B) El método de extracción y expansión de condrocitos; colocados en andamios similares y reimplantados de manera autóloga, en un modelo de rata. La utilización de AH en el andamio de gel de fibrina altera las características.?

OBJETIVO GENERAL:

- Obtener tejido cartilaginoso con formas definidas por andamios biológicos aprobados actualmente para uso clínico, a partir de tejido graso y de biopsia de cartílago, y comparar sus características.

OBJETIVO ESPECIFICO:

- Caracterizar el cultivo celular obtenido de dos estirpes donadoras diferentes, de un modelo animal.
- Crear un andamio con células condrogénicas, para implante autólogo en modelo animal.
- Realizar el seguimiento evaluando las características de celularidad, inflamación, composición bioquímica y reabsorción.
- Determinar si existen diferencias en la celularidad, inflamación, composición bioquímica y reabsorción en el tejido cartilaginoso implantado asociado al origen celular y tipo de andamio.
- Determinar si el uso de AH en el andamio de gel de fibrina, cambia las propiedades del tejido cartilaginoso obtenido.

MATERIALES Y MÉTODO.

DISEÑO.

Comparativo, Ciego, Experimental, Prospectivo, Transversal, no Aleatorizado.

Universo de estudio.

Se utilizaron 25 ratas Wistar de 12 semanas de edad promedio

Tamaño de la muestra.

En cada una de las ratas se implantaron 10 diferentes conformaciones de implantes y 2 controles. Se analizaron las diferencias entre las diferentes conformaciones.

Definición de variables

Independientes.		Dependientes.	
Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)	Variable	Escala (intervalo, ordinal, nominal)
Método de obtención del tejido (grasa vs cartílago)	Nominal	# de condrocitos viables (Por Campo)	Intervalo
Utilización de AH en andamio (si, no)	Nominal	Presencia de condrocitos viables (si, no)	Nominal
		Tinción de PGs con Azul Alcian (1-10)	Nominal

	<p>Apariencia histológica de cartilago (si, no)</p> <p>Nominal</p> <p>Consistencia después del Implante</p> <p>5.- Mayor a la del cartilago</p> <p>4.- Similar a la del cartilago</p> <p>3.- Ligeramente inferior a la del cartilago, similar a cera para hueso</p> <p>Ordinal</p> <p>2.- Inferior a la del cartilago, similar al lóbulo de la oreja</p> <p>1.- Mucho menor a la del cartilago, gelatinoso</p> <p>* Se tomó en</p>
--	---

	<p>consideración la consistencia del cartílago del pabellón auricular de un humano adulto</p> <p>Consistencia antes de implante</p>	Ordinal
--	---	---------

Criterios de inclusión

Se incluyeron ratas Wistar de 12 semanas de edad promedio proporcionadas por el bioterio del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”. Se incluyeron en el estudio los implantes obtenidos de todas las ratas.

Criterios de no inclusión

Se excluyeron a las ratas de las que no se pudo aislar y/o cultivarse tejido graso y/o cartilaginoso y reimplantarse en andamios enriquecidos con células. Se excluyeron los implantes que sufrieron daño por causas ajenas al protocolo como infección no controlada, lesión externa y otras. Se sustituyeron los casos 1:1 con ratas similares.

Criterios de exclusión.

Se eliminaron a las ratas que murieron antes de completar el tiempo determinado para el implante, por causas no relacionadas con el estudio. Se sustituyeron los casos 1:1 con ratas similares.

DESCRIPCIÓN DE PROCEDIMIENTOS

Obtención de tejidos

- a. Manejo de animales de laboratorio. Se utilizaron ratas Wistar de 12 semanas de edad con peso entre 250 a 300 g. Se manejaron y prepararon bajo los lineamientos del Departamento de Bioterio del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, y fueron proporcionados por el mismo. Se alojaron individualmente en jaulas de policarbonato con alimentación a libre acceso (Lab. Rodent Diet) y agua potable a libre demanda. Se eliminaron endoparásitos y ectoparásitos. La analgesia y anestesia para los eventos quirúrgicos 1 y 2, se realizo mediante Hidrocloruro de Xilazina (5-10 mg/kg) + Clorhidrato de ketamina (44 mg/kg). La eutanasia (evento quirúrgico 3) se realizo mediante sobredosis de barbitúricos intraperitoneal (pentobarbital sódico 120-210 mg/kg). Como analgesia posoperatoria se utilizo meglumina de flunixin 2.5-5 mg/kg SC. En caso de detectarse infección en el posoperatorio se utilizo cefalexina 15 mg/kg SC, de lo contrario no se utilizaron antibióticos.
 - b. Extracción de tejido. Se extrajeron mediante incisiones inguinales los colchones de grasa inguinal bilateralmente. Se extrajo el cartílago auricular bilateral completamente mediante incisiones retroauriculares. Se cerraron las incisiones de manera habitual.
2. Procesado de grasa inguinal [Huang y Zuk] (20,19)
 - a. Cultivo celular y expansión. Se trituraron finamente los colchones grasos y se incubaron en platos de 100 mm² (Beckton Dickinson, EUA), con medio: Dulbbeco modificado por Eagle (DMEM) con plasma rico en plaquetas humano inactivado (suero), 10%, antibiótico/antimicótico 30% y 0.5 mg. de gentamicina por una hora. El tejido se enjuago por tres ocasiones en salina-búfer fosfato por 5 minutos, seguido de digestión con 0.075% de colagenasa con agitación por 40 min. a 37°C. A continuación se agrego un volumen de DMEM con suero 10% para neutralizar la colagenasa. Se retiraron los fragmentos grandes sin digerir manualmente y se permitió a las células su contención en tubos cónicos de 50 cc. Se realizo centrifugación a 1300 rpm (260g) por 5 minutos y resuspensión en DMEM con suero 10%. Las células

madre se colocaron en concentraciones de 10^5 células por caja de cultivo de 100 mm^2 .

b. Inducción condrogénica. El cultivo al tercer recambio se tripsiniza y resuspende en medio de control en concentración de 1×10^7 céls/ml. Las células suspendidas y concentradas (10^5 céls / 10 microlitros) se dejan adherir por 2 h en $37^\circ\text{C}/5\% \text{ CO}_2$ en el centro de cada pozo, gentilmente cubiertas con medio control e incubadas una noche. Se colocaron en una concentración de 1×10^7 /ml. El medio se reemplazo con medio condrogénico y las pastillas se indujeron por 6 días. Se añadió ácido ascórbico-2-fosfato (50 microgramos/ml) al sexto día y se mantuvo hasta completar la inducción por 14 días.

c. Medio condrogénico: DMEM, 1% suero, $6.25 \mu\text{g/ml}$ insulina, 10 ng/ml TGF- β_1 , 50 nM ascorbato-2-fosfato, $0.2 \mu\text{M}$ dexametasona 1% antibiótico/antimicótico

3. Procesado de cartílago auricular [Yanaga] (32)

a. Cultivo celular y expansión. Aproximadamente 1 cm^2 de cartílago se trituro finamente y se lavo con salina con búfer fosfato, suplementada con antibiótico/antimicótico. Se digirió una noche en colagenasa 0.3% en medio de cultivo a 4°C , se homogenizo con trituradora por 4 horas a 37°C , y se filtro en nylon de poro de $100 \mu\text{m}$ para aislar los condrocitos. Los condrocitos se sembraron en platos a 0.5 a 1×10^4 células por plato. En los cultivos subsecuentes se sembraron a 1×10^6 células / 175 cm^2 . Finalmente los condrocitos obtenidos por el subcultivo, se sembraron en una densidad de 1×10^4 células / cm^2 dos o tres veces sobre las células previamente sembradas obteniéndose condrocitos en estado de gel.

b. Medio de cultivo: Mezcla de F-12 y DMEM 1:1 v/v con 10% de suero, antibiótico penicilina G (50 U/ml) y estreptomina sulfato (0.1mg/ml).

4. Confirmación de condrogénesis. (Zuk 2001, Huang 2002, Yanaga 2006).

a. Se tiñe el tejido con Azul Alcian en pH ácido. Se fijan los cultivos en paraformaldehído 4% por 15 min. a temperatura ambiente y se lava con PBS. Se incuba 30 min. con 1% (wt/vl) en azul alcian en HCl 0.1 N (pH 1.0) y se lava con HCl 0.1 N por 5 min. para remover el exceso de tinción. Esto tiñe las matrices con PGs sulfatados características de la matriz del cartílago. Para la

colocación en parafina se lavan con PBS dos veces, se fijan con paraformaldehído 4% por una hora, y se colocan en parafina. Se seccionan los nódulos a grosor de 5 micras.

b. La tinción estándar de Hematoxilina-Eosina muestra una histomorfología característica de cartílago (células en una sustancia de fondo basofílica).

5. Colocación en andamio (Westreich 2004, Han 2006)

a. El pegamento de fibrina comercialmente disponible y aprobado para uso clínico (Beriplast®, CSL Behring Alemania), se prepara de manera estándar de acuerdo a las instrucciones del paquete. Las preparaciones comerciales son mezcla de fibrinógeno (75-115 mg/ml de fibrinógeno y 3000 KIU/ml de aprotinina) y trombina (500 UI/ml) Debido a la rápida polimerización se selecciona el sistema duplijet.

b. El AH de uso clínico (Restylane®, Q med, Suecia) contiene 10 mg/ml.

c. Los condrocitos se suspendieron en 0.5cc. de medio de cultivo, posteriormente se añadió 0.5 cc de ácido hialurónico y/o fibrina, con las diferentes concentraciones señaladas en el inciso e, (vide Infra). La concentración final de células fue de 10 a 40 X 10⁹ células / 0.5 ml., en una mezcla uniforme.

d. Se realizó el mezclado y polimerización en moldes de acrílico en forma circular.

e. Colocación en bolsillo

a. Se introdujeron los moldes en bolsillos subcutáneos del dorso de la rata en una cuadrícula de 2 x 2cm, con las condiciones quirúrgicas antes mencionadas (método 1), de manera autóloga con las siguientes configuraciones: (Fig. 1)

- i. Control A. Andamio de fibrina sin células
- ii. Control B. Andamio de AH sin células
- iii. Células derivadas de grasa (CDG) + AH 100%
- iv. Células derivadas de cartílago (CDC) + AH 100%
- v. Andamio de fibrina 25% + AH 75% + CDG
- vi. Andamio de fibrina 25% + AH 75% + CDC

- vii. Andamio de fibrina 50% + AH 50% + CDG
- viii. Andamio de fibrina 50% + AH 50% + CDC
- ix. Andamio de fibrina 75% + AH 25% + CDG
- x. Andamio de fibrina 75% + AH 25% + CDC
- xi. Andamio de fibrina 100% + CDG
- xii. Andamio de fibrina 100% + CDC

- f. Se sacrificaron las ratas a las 5 semanas después de la inoculación de las muestras. Se introdujeron todas las configuraciones de cartílago (i a xii) en todas las ratas.
- g. Análisis de los moldes
 - a. Todas las muestras fueron examinadas histológicamente a 10x, 20x y 40x, con las tinciones para cartílago, examinando la apariencia general. Se tomaron muestras a lo largo de todo el molde para determinar la presencia de homogeneidad en los moldes. Se tomó como control la tinción de cartílago humano para todas las tinciones.
 - b. Se analizó subjetivamente por dos observadores la presencia de PGs y GAGs sulfatados mediante la tinción de azul alcian y Von Kosa respectivamente, midiendo como variable nominal dicotómica si no, dependiendo si existe o no tinción positiva. Se utilizó un control de cartílago humano normal asignando si no a la ausencia de tinción.
 - c. Se observaron las características macroscópicas, color, forma y consistencia de los moldes. Se fotografiaron. Se determinó la consistencia del cartílago mediante la observación por dos observadores por separado, comparado con el cartílago auricular de humano adulto. Se consignó si la consistencia fue 5.- Mayor a la del cartílago, 4.- Similar a la del cartílago, 3.- Ligeramente inferior a la del cartílago, similar a cera para hueso, 2.- Inferior a la del cartílago, similar al lóbulo de la oreja, 1.- Mucho menor a la del cartílago, gelatinoso

- d. Esta observación se realizó antes y después del implante en el modelo animal.
- e. Todas las observaciones las realizaron observadores calificados, de manera ciega respecto a las condiciones del tejido de origen y andamio.

VALIDACIÓN DE DATOS.

Por tener dos o más muestras, se utilizó estadística inferencial. Se analizaron estadísticamente las variables de cada tipo de implante y sus controles. El cálculo de la muestra se realizó con el software Primer of biostatistics. V 3.01 (Glantz SA. 1999, McGraw Hill.). Se utilizó el mismo para sugerir las pruebas estadísticas.

- a. Para las variables ordinales estudiadas al mismo tiempo de implantación (Firmeza al tacto), se utilizó la prueba de Friedman
- b. Para las variables nominales estudiadas al mismo tiempo (presencia de cartílago, Tinción de PGs y GAGs, y presencia de condrocitos viables) se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis
- c. El nivel de significancia para rechazar la hipótesis nula (H_0) fue de $p < 0.05$.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

Se sometió el presente protocolo a escrutinio por: A) Comité de Ética Para la Investigación Clínica y Básica, y B) Comité para el Manejo y Cuidado Para la Experimentación con Animales de Laboratorio; Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

Todos los procedimientos están de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título séptimo. De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Capítulo único. Artículos 121-126, así como con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.*

Todos los procedimientos están de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título séptimo. De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación. Capítulo único. Artículos 121-126, así como con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*.

RESULTADOS

En este estudio se incluyeron un total de 25 ratas Wistar con un peso de 250 a 300 gramos, 15 hembras y 10 machos, con edad promedio de 12 semanas de edad.

En las 12 regiones de estudio en el dorso de las ratas, en la columna de la derecha se sembraron condrocitos cultivados obtenidos a partir de cartílago auricular autólogo. En la columna de la izquierda se sembraron condrocitos cultivados obtenidos de tejido graso inguinal.

Las concentraciones más altas de AH correspondieron a las regiones de estudio vecinas a la región cefálica, y las más bajas vecinas a la región caudal. Por el contrario las concentraciones de fibrina más altas fueron las concentraciones vecinas a la región caudal y las más bajas a las cercanas a la región cefálica. Las 2 cuadrículas de control, la de fibrina y la de AH sin células fueron las 2 regiones de estudio inmediatas a la región caudal, como se puede observar esquemáticamente en la (Fig. 1). En donde se observa cada una de las concentraciones de fibrina y AH, mezcladas con los condrocitos.

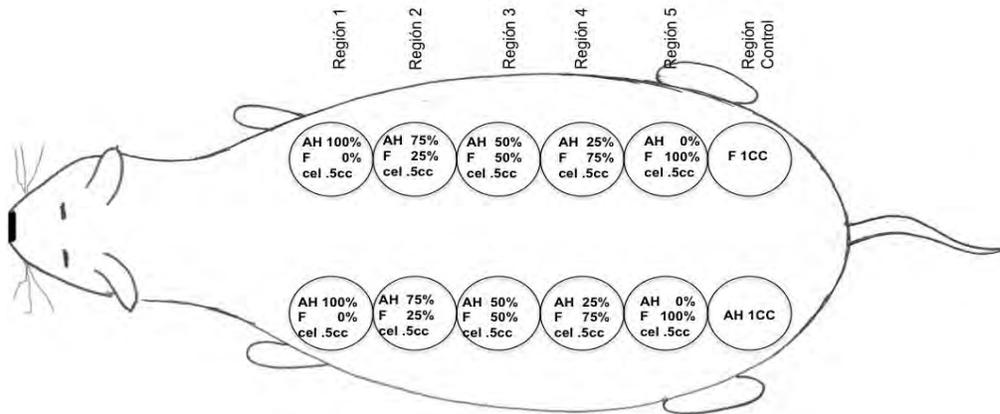


Figura 1.- Esquema de cuadrícula de las 12 regiones en donde se inocularon los cultivos celulares (cel), con sus diferentes concentraciones de Acido Hialurónico (AH) y de Fibrina (F), siendo los de la columna derecha de cartílago auricular y los de la izquierda de grasa Inguinal.

A la palpación bidigital la consistencia de los implantes que se colocaron en las regiones 4 y 5 era en su mayoría similar a la del lóbulo de la oreja (media 2.08). En cambio la consistencia de los implantes de las regiones 1 y 2 (media 1.16) a la palpación bidigital fue gelatinosa. Posterior a la colocación de los implantes se suturaron las heridas con nylon (Fig. 2).



Figura 2.- Imagen del dorso de la rata en donde se observa la distribución de las regiones en estudio, en donde mediante mínimas incisiones se introdujeron los cultivos celulares mezclados con las diferentes concentraciones de fibrina y Acido Hialuronico.

A las 5 semanas se sacrificaron las ratas y se obtuvo el tejido en bloque, incluyendo la piel los diferentes bloques de tejido para estudio histológico.

Al examen macroscópico se encontró que en la región caudal, (4 y 5) derecha e izquierda, las zonas en donde se colocaron los implantes fueron más voluminosas y de mayor consistencia al compararlas con lo obtenido en las regiones 1 y 2. A la palpación bidigital la consistencia del implante obtenido en las regiones 4 y 5 (media 3.72) era en su mayoría similar a la del cartílago o a la de cera para hueso, y se palpaba una estructura bien definida. En cambio la consistencia de las regiones 1 y 2(media 2.2) a la palpación bidigital fue blanda similar al lóbulo de la oreja en su mayoría.

Con las tinciones de Hematoxilina y Eosina, en las regiones de estudio 1 y 2 se observaron aislados nichos celulares, con núcleos poco definidos, esparcidos en grandes espacios de matriz extracelular teñida de rosa. No se encontraron diferencias entre las siembras de condrocitos derivados de grasa o de cartílago.

En las regiones 4 y 5, especialmente la 5 se encontraron a 20x, diversos nichos celulares, coloreados intensamente de violeta. Los núcleos de estas células eran bien definidos e intensamente coloreados. Los nichos se distribuyeron uniformemente en una matriz extracelular con colágena. En los aumentos de 40x, se observan nichos celulares de condrocitos bien estructurados, con núcleos definidos e intensamente teñidos. (Fig. 3). Los condrocitos se encuentran separados distribuidos en lagunas e inmersos en una gran cantidad de colágeno similar al tejido conectivo denso. Estos hallazgos corresponden a características histológicas del fibrocartílago humano.

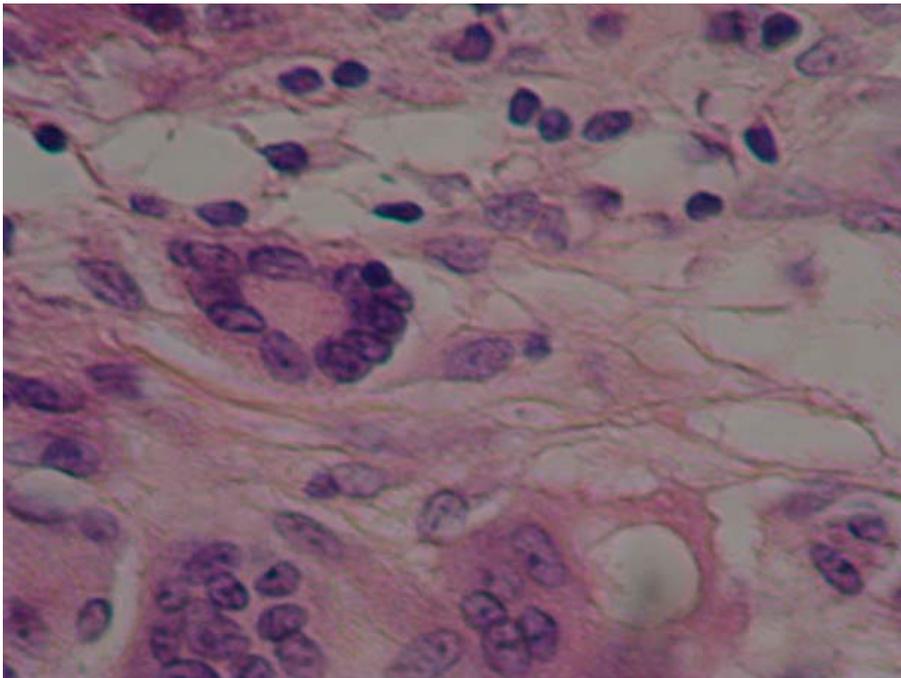


Figura 3.- Tinción de Hematoxilina y Eosina (HE) 40x. Se observan nichos celulares de condrocitos bien estructurados, con núcleos definidos e intensamente teñidos.

En estas tinciones el número de células y de nichos celulares se encontró discretamente mayor en la columna de la derecha, que corresponde a los

cultivos de condrocitos obtenidos a partir de cartílago auricular, sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa $p>0.05$.

Con las tinciones especializadas para identificar elementos más finos en la estructura cartilaginosa encontramos. Con el azul alcian a un aumento de 20x, los mismos nichos celulares rodeados de una matriz teñida de azul, lo que se identifica como PGs. Lo que implica una activa producción de matriz extracelular cartilaginosa y por ende viabilidad histológica. Al aumento de 40x, se identifican los núcleos celulares en tinte rosado (Fig. 4). Estos se encuentran distribuidos en lagunas e inmersos en una matriz cartilaginosa teñida característicamente de azul. Estos hallazgos corroboran la presencia de cartílago.

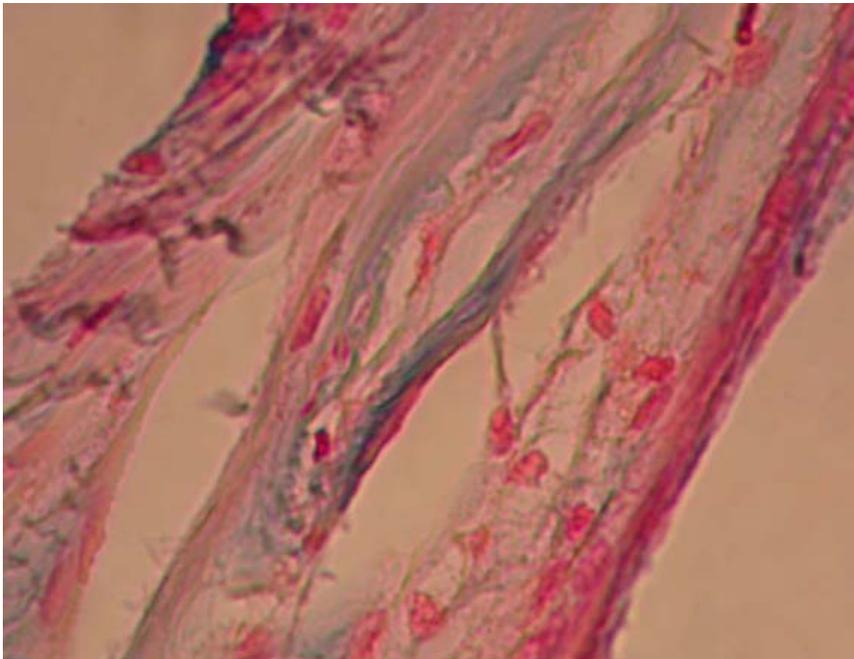


Figura 4.- Tinción de Azul Alcian 40x. Se tiñen de color rosa los núcleos celulares, con una matriz extracelular teñida de azul.

Hallazgos similares en número de células, distribución en nichos y esparcidos en matriz cartilaginosa, similar al tejido conectivo denso, se obtuvieron con la tinción de Von Kosa con 10x y 20x (Fig. 5).

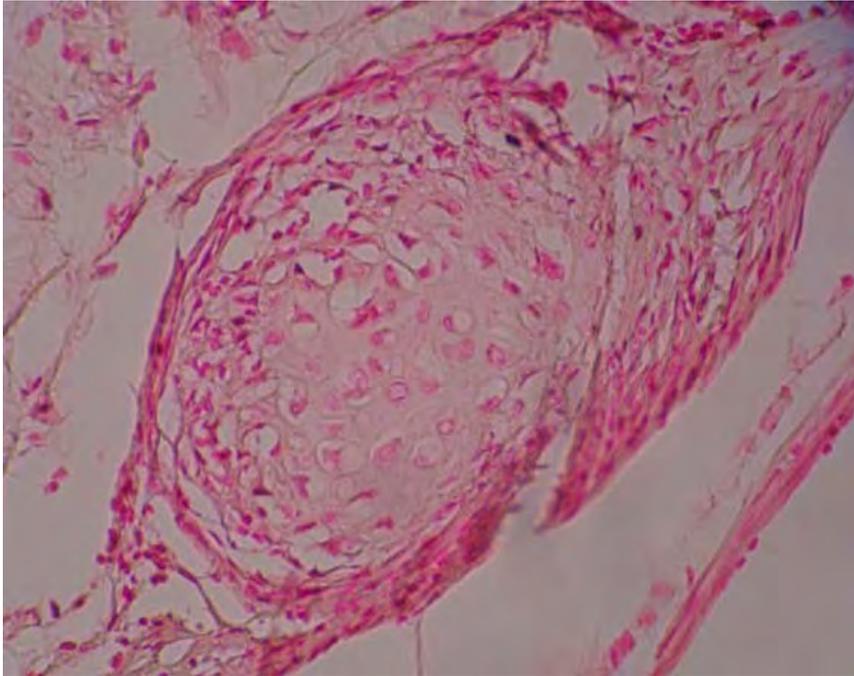


Figura 5.- Tinción de Von Kosa 20x. Núcleos teñidos de color rosa, esparcidos en la matriz cartilaginosa.

Con la tinción especial para fibras elásticas se demostró la presencia de elastina en el andamio enriquecido como consecuencia de su producción en el mismo. (Fig. 6)



Figura 6.- Tinción de fibras elásticas 40x, se observa la presencia de elastina demostrada por un color pardo.

Con técnicas de inmunohistoquímica se identificó la Proteína Morfogénica de Hueso (BMP) en estos cultivos, este es otro marcador inespecífico de condrocitos que no se expresa en la piel su tejido subcutáneo ni músculo circundante a donde se colocaron los implantes, este hallazgo apoya aun más la viabilidad del tejido cartilaginoso (Fig. 7). Los cortes histológicos a 20x muestran los nichos celulares esparcidos entre fibras teñidas de color violáceo. En el aumento de 40x los nichos celulares se identifican fácilmente, mostrando células maduras con su núcleo central. También se observan algunas células aisladas. Todas se encuentran esparcidas en una matriz cartilaginosa teñida de color violáceo, con fibras orientadas en diversas direcciones, característico de la colágena tipo 1.

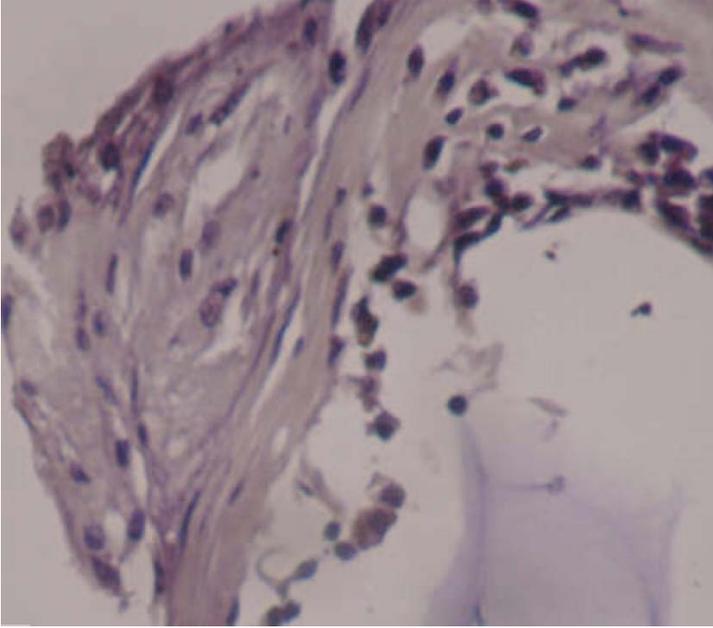


Figura 7.- Técnica de inmunohistoquímica se identificó la Proteína Morfogenética de Hueso (BMP)

A la palpación se encontraron diferencias en la consistencia de los andamios enriquecidos con células en relación a la proporción de ácido hialurónico y fibrina, aumentando la consistencia en relación directa a la proporción de fibrina e indirectamente a la proporción de AH. Utilizando la escala descrita previamente, al momento del implante, los grupos control de AH y las regiones 1 y 2 que corresponden a AH 100% y 75% tuvieron una menor consistencia (media 1.16) y las regiones 4 y 5 y el control de fibrina tuvieron una mayor consistencia (media 2.08) con un nivel de significancia estadística $p < 0.05$. Después de las 5 semanas de implantación, la consistencia aumentó en las regiones 4 y 5 (media 3.72) y en las regiones 1 y 2 (media 2.2). Esta diferencia fue significativa para ambos grupos antes y después del implante ($p < 0.01$) y entre las regiones 4 y 5 comparadas con las 1 y 2 ($p < 0.05$). Podemos especular que el aumento en la consistencia después de 5 semanas de la implantación se debe a la producción in situ de elementos de matriz extracelular, por las células implantadas.

La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para las variables nominales: A) Presencia de condrocitos viables, B) apariencia histológica de cartílago y C) producción de PGs demostrada mediante la tinción con azul alcian. Al comparar los andamios enriquecidos con células contra los controles respectivos acelulares (AH y Fibrina) la diferencia fue significativa para las células obtenidas de grasa y de cartílago auricular, con una significancia estadística de $p < 0.05$ para ambas líneas celulares.

La prueba de Kruskal-Wallis se utilizó para las variables nominales: A) Presencia de condrocitos viables, B) apariencia histológica de cartílago y C) producción de PGs demostrada mediante la tinción con azul alcian. Al comparar los andamios enriquecidos con células contra los controles respectivos acelulares (AH y Fibrina) la diferencia fue significativa para las células obtenidas de grasa y de cartílago auricular, con una significancia estadística de $p < 0.05$ para ambas líneas celulares.

DISCUSIÓN

El cartílago lesionado tiene una capacidad muy limitada para curar. Los defectos de superficie conjuntos tienen como resultado con frecuencia una cicatriz fibrosa con propiedades biomecánicas inferiores, las soluciones quirúrgicas para defectos articulares de cartílago incluyen legrado, perforación del hueso subcondral para permitir que las células pluripotenciales de la medula invadan el espacio y reparen la lesión y por último el trasplante de tejido cartilaginoso. Aunque todos estos enfoques pueden tener algún beneficio, ninguno es el óptimo para lograr la reparación del cartílago.

En 1994, por primera vez, Brittberg y colaboradores (42) completaron exitosamente un trasplante articular con condrocitos autólogos para la reparación de una rodilla. Ellos utilizaron un pedazo de cartílago de un cojinete de la articulación de la rodilla, aislaron los condrocitos, los cultivaron y posteriormente inyectaron de 50-100 microlitros de la suspensión cultivada de condrocitos en un área de defecto y lo colocaron por debajo de un colgajo de periostio suturando por encima del área.

Una característica del cartílago articular es su dureza y durabilidad para poder soportar la carga de peso. En contraste los condrocitos auriculares poseen de elasticidad y flexibilidad, por estas razones son utilizados ampliamente en la reconstrucción de formas complicadas de la cara.

Continuando con los esfuerzos hacia la aplicación clínica del cultivo de cartílago autólogo para la reconstrucción de deformidades principalmente en el área craneofacial. Hiroko Yanaga y colaboradores en el 2006 (32) reportaron la utilización de cartílago auricular en donde tomaron 1 cm² de la concha auricular, aislaron y cultivaron los condrocitos con suero autólogo, lo cual acelera la proliferación celular, las células fueron subcultivadas y formaron una masa en forma de gel. Este gel fue inyectado de forma subperiosteal y subcutánea. Obteniendo un cambio en la dureza pasando de un estado en gel a un estado sólido en 2-3 semanas y estabilizándose. Ningún paciente presentó reabsorción de los condrocitos cultivados.

Algunos de los abordajes para la reconstrucción tisular y la reparación del cartílago es el uso de la ingeniería tisular para generar nuevo tejido cartilaginoso. La investigación en células madre mesenquimatosas de médula ósea que se pueden manipular para diferenciarse en diferentes líneas celulares tales como las condrogénicas, osteogénicas, neurogénicas y otras; así como el uso de células progenitoras multilineaje obtenidas de tejido graso lipoaspirado son algunas de las rutas prometedoras para poder obtener cartílago con menor morbilidad en el sitio donador que el uso de cartílago autólogo.

Actualmente diversos grupos han logrado aislar células madre mesenquimatosas de tejido lipoaspirado procesado y diferenciarlas a estructuras cartilaginosas.

Otro de los elementos críticos para la ingeniería tisular del cartílago es encontrar un andamio adecuado que permita o acelere la formación de nueva matriz extracelular. El uso de polímeros, naturales y sintéticos que se reabsorba controladamente, puede ser favorable in vivo e in vitro. Diversos andamios han sido probados en modelos animales para la ingeniería de cartílago, entre ellos se encuentran esponjas de colágena, AH, hidrogeles como la fibrina, y andamios sintéticos poliméricos como ácido poliláctico, polietileno, polipropileno y polivinilo. El gel de fibrina y el AH se encuentran aprobados para uso clínico. La

fibrina tiene indicación en cierre de meninges, cirugía vascular, cardíaca entre otros. El AH se usa como relleno absorbible para defectos cutáneos como cicatrices y arrugas.

En la actualidad la ingeniería tisular de tejido cartilaginosa ha evolucionado de forma dramática, pero aun queda mucho por desarrollar en este campo, requiriéndose nuevas técnicas y materiales para poder explotar esto en aplicaciones clínicas.

En este estudio experimental se logra obtener cartílago cultivado, utilizando condrocitos a partir de grasa de las regiones inguinales y de cartílago auricular autólogo de ratas wistar. En las diferentes tinciones de acuerdo a la distribución celular y a las características de la matriz extracelular presente, el cartílago cultivado corresponde a fibrocartílago. Con esto se busca su aplicación clínica en el tratamiento de diversas patologías, principalmente enfocada en el área de reconstructiva craneofacial pudiendo utilizarse en la reconstrucción del tarso y nariz entre otros.

Dentro de las ventajas de este estudio se encuentran que a diferencia de otros trabajos, en este estudio se obtienen condrocitos autólogos derivados ya sea de cartílago o de grasa, con esto evitando la reacción de cuerpo extraño, con escasa morbilidad del área donadora y con abundantes sitios donadores en el caso de la grasa, pudiendo cultivar suficiente volumen de condrocitos para su utilización clínica, además podemos determinar la dureza del cartílago cultivado ya sea proveniente de grasa inguinal o de cartilago auricular, debido a que se utilizaron diferentes concentraciones de los andamios de ácido hialurónico y fibrina, obteniendo diferentes durezas y concentraciones de condrocitos.

De esta manera es posible determinar la dureza del cartílago según sea el área en donde se planea utilizar pudiendo utilizar la mas apropiada según la región anatómica a reconstruir, por ejemplo en la reconstrucción de discos intervertebrales y carillas articulares de las extremidades superior e inferior en donde se requiere de una mayor dureza debido a las cargas que soportan y la

fuerza que ejercen o en la reconstrucción del tarso en los párpados y algunas áreas nasales que usualmente se requiere de menor dureza y mayor elasticidad y flexibilidad, para poder proporcionar mejores resultados cosméticos.

El fibrocartílago se encuentra principalmente en los discos intervertebrales, la sínfisis del pubis, algunos ligamentos y en las carillas de las superficies articulares como el codo, muñeca y la articulación temporo mandibular. El cartílago hialino se encuentra principalmente en la nariz, partes del aparato respiratorio y en las costillas. El cartílago elástico se encuentra en el oído externo, las paredes del canal auditivo, la trompa de Eustaquio, la epiglotis y la laringe.

Al analizar la calidad y cantidad de cartílago obtenido en las diferentes regiones de estudio en el dorso de las ratas, se observó que las células crecieron mejor en las regiones 4 y 5 en donde la concentración de ácido hialurónico era menor y la concentración de fibrina era mayor. Este hecho explica que al añadir más fibrina al andamio de ácido hialurónico, se favorece una mejor distribución espacial de los condrocitos cultivadas en el andamio ya sea diferenciados de grasa o derivados de cartílago auricular, lo que se reproduce en una mayor producción de nichos celulares en el tejido final al momento de su obtención.

En las regiones 1 y 2 en donde la concentración de fibrina fue menor y la de ácido hialurónico mayor, el crecimiento de los condrocitos se observó sobre la periferia del andamio (Fig. 8). Este hecho hace pensar en una futura línea de investigación en la que utilizando estas concentraciones de células, de ácido hialurónico y de fibrina, sea posible la producción de láminas de cartílago de diferentes espesores, que podrían utilizarse clínicamente en el tratamiento reconstructivo de diferentes elementos anatómicos, tales como el tarso en los párpados por secuelas de trauma facial o las finas estructuras cartilaginosas de la nariz como los cartílagos alares y laterales.

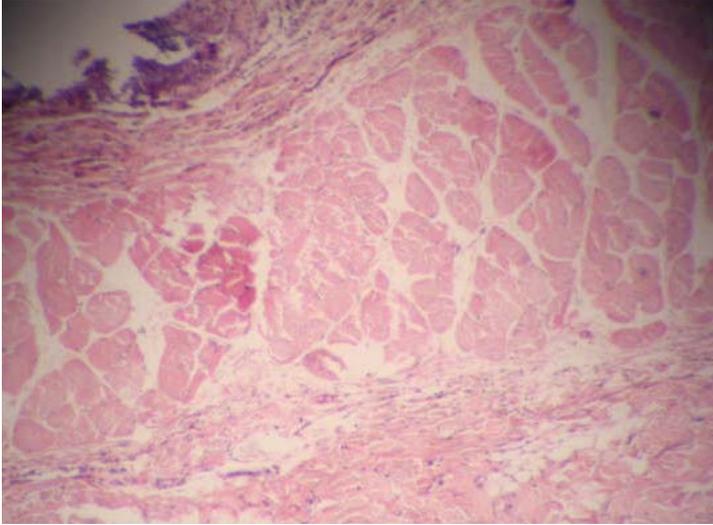


Figura 8.- Tinción de HE de las regiones 1 y 2. Se observa crecimiento de células cartilaginosas, distribuidas en forma laminar en la periferia del andamio de AH.

También serán necesarios realizar futuros ensayos de inmunohistoquímica y bioingeniería tisular que puedan identificar colágeno tipo 2 y otras, con la finalidad de inducir mediante el uso de diferentes concentraciones de células, de AH y fibrina como andamio, así como la búsqueda de nuevos andamios para poder lograr la obtención de diferentes calidades de cartílago, que sean de diferente consistencia y que en un futuro sean útiles para la reconstrucción de las diferentes áreas anatómicas del cuerpo humano.

CONCLUSIONES

Mediante la siembra de células cartilaginosas, obtenidas a partir de grasa o de cartílago auricular de las ratas, incluidas en andamios de ácido hialurónico y/o fibrina a diferentes concentraciones, se obtiene cartílago. El cartílago obtenido es histológicamente similar al fibrocartílago humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. De Ugarte DA, Ashjian PH, Elbarbary A, Hedrick MH. Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Ann Plast Surg* 2003;50:215–219
2. Randolph MA, Yaremchuk MJ. Repair, grafting and engineering of cartilage, en *Plastic Surgery*. 2da edición. Elsevier Inc. Philadelphia, EUA. 2006.
3. Silver FH, Glasgold AI. Cartilage wound healing: an overview. *Otolaryngol Clin North Am* 1995;28:847-64.
4. Brent B. The versatile cartilage autograft: current trends in clinical transplantation. *Clin Plast Surg* 1979;6:163
5. Hangody L, Kish G, Karpati Z, et al. Mosaicplasty for the treatment of articular cartilage defects: applications in clinical practice. *Orthopedics* 1998;21:751-756.
6. Cervelli V Bottini J, Gentile P , et al. Reconstruction of the Nasal Dorsum With Autologous Rib Cartilage *Ann Plast Surg* 2006;56: 256–262
7. Ohara K, Nakamura K Ohta E. Chest wall deformities and thoracic scoliosis after costal cartilage graft harvesting. *Plast Reconstr Surg* 1997;99:1030-1036
8. Thomson HG, Kim TY, Ein S. Residual problems in chest donor sites after microtia reconstruction: A long term study. *Plast Reconstr Surg* 1995;95:961-968
9. Brenner KA, McConnell MP, Evans GR, Calvert JW. Survival of diced cartilage grafts: An experimental study. *Plast. Reconstr. Surg.* 2006;117:105-115
10. Calvert JW, Brenner K, DaCosta-Iyer M et al. Histological analysis of human diced cartilage grafts. *Plast Reconstr Surg* 2006;118:230-236
11. Guerrerosantos J, Trabaninos C, Guerrerosantos F. Multifragmented cartilage wrapped with fascia in augmentation rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2006;117:804-903
12. Hagerty RF, Braid HL, Bonner WM et al. Viable and nonviable cartilage homografts. *Surg Gynecol Obstet* 1967;125:485
13. Gibson T, Davis WB. The fate of preserved bovine cartilage in man. *Br J Plast Surg* 1953;6:4

14. Bujia J, Pitzke P, Wilmes E, et al. A critical analysis of human immunodeficiency virus transmission using cartilage allografts. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250:129-133
15. Centers for Disease Control: Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: case report and public health recommendations. *Morb Mortl Wkly Rep* 1988;37:597-99
16. Vacanti CA, Upton J. Tissue-engineered morphogenesis of cartilage and bone by means of cell transplantation using synthetic biodegradable polymer matrices (review). *Clin Plast Surg* 1994;21:445-462
17. Ashjian PH, De Ugarte DA, Katz AJ, Hedrick MH. Lipoplasty: from body contouring to tissue engineering. *Aesthetic Surg J* 2002;22:121-127
18. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization (Review). *Int J Biochem Cel Biol* 2004;36:568-84
19. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-228
20. Huang JI, Beanes SR, Zhu M et al. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconst Surg* 2002;19:1033-1041
21. Huang JI, Zuk PA, Jones NF et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconst Surg* 2004;113:585-594
22. Shi YY, Nacamuli RP, Salim A et al. The osteogenic potential of adipose derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconst Surg* 2005;116:1686-1696
23. Lorenz HP, Hedick MC, Chang J et al. The impact of biomolecular medicine and tissue engineering on plastic surgery in the 21st century. *Plast Reconst Surg* 2000;105:2467-2481
24. Kokai LE, Rubin P, Marra KC. The potential of adipose-derived adult stem cells as a source of neuronal progenitor cells. 2005;116:1453-1460
25. Oawa R, Mizuno H, Watanabe A et al. Adipogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice-including relationship of sex differences. *Biochem Biophys Res Com.* 2004;319:511-517

26. Planat-Bernard V, Silvestre JS, Cousin B et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells. Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109:r23-r30
27. Ryden M, Dicker A, Götherström C et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Comm* 2003;311:391-97
28. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;290:763-769
29. Moseley TA, Zhu M, Hedrick MH. Adipose-derived stem and progenitor cells as fillers in plastic and reconstructive surgery. 2006;118(Suppl):121S-128S
30. Isogai N, Asamura S, Higashi T et al. Tissue engineering of an auricular cartilage model utilizing cultured chondrocyte – poly (L-lactide- ϵ -caprolactone) scaffolds. *Tissue Eng*. 2004;10:673-687
31. Peretti G, Randolph M, Zaporozan V, et al. A biochemical analysis of an engineered cell-scaffold implant for cartilage repair. *Ann Plast Surg*. 2001;46:533-537
32. Yanaga H, Yanaga K, Koga M et al. Clinical application of cultured autologous human auricular chondrocytes with autologous serum for craniofacial or nasal augmentation and repair. *Plast Reconstr Surg*; 2006;117:2019-2030
33. Aigner J, Tegeler J, Hutzler P et al. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzil ester. *J Biomed Mater Res*. 1998;42:172-181
34. Mesa JM, Zaporozan V, Weinand C, et al. Tissue Engineering cartilage with aged articular chondrocytes in vivo. *Plast Reconstr Surg*. 2006;118:41-49
35. van Osch GJ, van der Veen SW, Verwoerd-Verhoef HL. In vitro redifferentiation of culture expanded rabbit and human auricular chondrocytes for cartilage reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2001; 107:433-440
36. Westreich R, Kaufman M, Gannon P, Lawson W. Validating the subcutaneous model of injectable autologous cartilage using a fibrin glue scaffold. *Laryngoscope*. 2004;114:2154-2160

37. Lottman SR, Schmidt TA, Mankarious S. Effects of fibrin glue components on chondrocyte growth and matrix formation. Poster #0721. 49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society.
38. Emans PJ, Pieper J, Hulsbosch MM et al. Differential cell viability of chondrocytes and progenitor cells in tissue-engineered constructs following implantation into osteochondral defects. *Tissue Eng.* 2006;12:1699-1709
39. Silverman RP, Bonasser L, Passaretti D et al. Adhesion of tissue-engineered cartilage to native cartilage. *Plast Reconst Surg.* 2000;105:1393-1398
40. Brun P, Abatangelo G, Radice M et al. Chondrocyte aggregation and reorganization into three-dimensional scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 1999;46:337-346
41. Gillogly SD, Voight M, Blackburn T. Treatment of articular cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte implantation. *J Orthopaedic Sport Physical Ther.* 1998;28:241-251
42. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Eng J Med.* 1994;331:889-895.
43. Aust L, Devlin SJ, Halvorsen K et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy.* 2004;6:17-14.
44. Rodríguez A, Cao YL, Ibarra C et al. Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconst Surg.* 1999;103:1111
45. Han SK, Shin SH, Kang HJ, Kim WK. Augmentation rhinoplasty using injectable tissue-engineered soft tissue. A pilot study. *Ann Plast Surg* 2006;56:251-55.