



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MÉXICO**

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE SALUD  
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN  
Luis Guillermo Ibarra Ibarra  
ESPECIALIDAD EN:

***ORTOPEDIA***

IMPLANTE DE CÉLULAS TRONCALES AUTÓLOGAS DIFERENCIADAS PARA LA  
REPARACIÓN ARTROSCÓPICA DE LESIONES DE CARTÍLAGO ARTICULAR EN  
RODILLA

T E S I S

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE  
MÉDICO ESPECIALISTA EN:

***ORTOPEDIA***

**P R E S E N T A:**  
*ALFONSO MIGOYA NUÑO*

PROFESOR TITULAR  
*JUAN ANTONIO MADINAVEITIA VILLANUEVA*

ASESORES  
*DR. JOSÉ CLEMENTE IBARRA PONCE DE LEÓN*  
*DRA. ANELL OLIVOS MEZA*  
*DR. CARLOS LANDA SOLÍS*



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.

**ÍNDICE**

Introducción	3
Justificación	10
Objetivos	11
Metodología	12
Resultados	23
Discusión	36
Conclusión	38
Bibliografía	39

## INTRODUCCIÓN

Uno de los rasgos más importantes en la evolución del ser humano ha sido su capacidad para la bipedestación; consiguiendo una marcha bipodálica convirtiéndolo en una especie única y altamente funcional, capaz de formar sociedades muy activas; en la actualidad seguimos dependiendo de nuestra capacidad motora la cual está en estrecha relación con nuestro estado de salud. Un tema de interés para la ortopedia es la salud del sistema musculoesquelético, que tiene una repercusión directa en el desempeño físico de los individuos. Una parte fundamental del sistema musculoesquelético son las articulaciones, las cuales son consideradas un sistema dinámico que ayuda a los individuos a desarrollar diferentes actividades. Las articulaciones constan de un componente fundamental que es el cartílago articular también denominado cartílago hialino, el cual es un tejido especializado que recubre las superficies y que se encarga de distribuir las cargas y reducir la fricción de los componentes de la articulación. En el adulto, el cartílago hialino está constituido por una población dispersa de condrocitos (2%) embebidos dentro de una matriz extracelular compuesta principalmente por dos tipos de macromoléculas: colágeno (II, IX y XI) y proteoglicanos (agrecano).<sup>1,2</sup> Los condrocitos son los responsables de la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular (MEC), mientras que ésta última determina las cualidades funcionales y biomecánicas del tejido. Estas células expresan y mantienen las características fenotípicas de la línea condral bajo el control de diversas señales moleculares.<sup>2,5</sup>

A pesar de que el cartílago articular es un tejido con un elevado metabolismo celular, cuando sufre una lesión traumática, factores como el carente aporte sanguíneo y la baja celularidad que posee contribuyen a su limitada capacidad regenerativa.<sup>3, 4</sup>

Las lesiones traumáticas del cartílago son frecuentemente relacionadas con actividades deportivas y pueden desencadenar cambios físico-químicos en la articulación condicionando un proceso de osteoartritis (OA) temprana. Dichas lesiones han sido encontradas hasta en un 63% de los pacientes sometidos a artroscopias de rodilla.<sup>2</sup> En pacientes jóvenes las lesiones condrales ocasionan un grado de incapacidad equiparable a la de los pacientes con osteoartritis avanzada, lo cual se traduce en dependencia dentro de su círculo familiar y entorno social, sin mencionar la derrama económica invertida en analgésicos, terapia física, consultas y en etapas más avanzadas, la necesidad de una artroscopia paliativa o incluso reemplazo articular, además de las pérdidas por ausencias laborales.<sup>6</sup>

El tratamiento de las lesiones condrales focales de rodilla es quirúrgico, existiendo muchas técnicas, las cuales buscan cumplir con dos objetivos los cuales resultan fundamentales para obtener una mejoría clínica; estos objetivos son: llenar el defecto con tejido que tenga propiedades biomecánicas equiparables a las del cartílago articular nativo (regeneración) y promover una integración exitosa al tejido nativo adyacente.<sup>7</sup> Las microfracturas, el trasplante osteocondral autólogo y el implante autólogo de condrocitos (ACI y MACI) son los principales procedimientos de restauración del cartílago articular que han sido evaluados para la aplicación clínica.<sup>8</sup>

La técnica de microfracturas descrita por Steadman y colaboradores es considerada como la primera opción de tratamiento para las lesiones condrales de espesor total debido a su naturaleza mínima invasiva, limitada morbilidad y bajo costo. La técnica

consiste en hacer perforaciones en el hueso subcondral para ocasionar sangrado en la medula ósea que libere las células troncales mesenquimales y los factores de crecimiento apropiados para la reparación a través de la formación de un coágulo. Las células troncales indiferenciadas maduran y forman fibrocartílago con un porcentaje inferior de colágeno tipo II que proporciona menor resistencia biomecánica que el cartílago hialino, por lo que la reparación resulta ser deficiente. Más aún, es frecuente que el tejido de reparación no se integre en la zona adyacente del cartílago normal debido a las propiedades antiadhesivas de la matriz extracelular del cartílago.<sup>8,9</sup> Steadman y cols. reportaron que el 80% de 71 rodillas en pacientes con edad menor a 45 años, con lesiones aisladas postraumáticas tuvieron mejoría clínica en un seguimiento hasta de 7 años. Sin embargo, una revisión sistemática de 28 estudios recientes que involucraron 3,122 pacientes han reportado mejoría funcional a los 2 años de tratamiento, pero con durabilidad inconclusa más allá de los 24 meses de seguimiento.<sup>10</sup>

La mosaicoplastia también conocida como trasplante osteocondral autólogo (OATS por sus siglas en inglés), descrito por Hangody y cols., tiene como principio llenar la lesión condral de espesor total con múltiples taquetes osteocondrales tomados de la rodilla ipsilateral de una zona de “no carga” de los cóndilos femorales.<sup>10, 11</sup> Hangody y Füles estudiaron una serie de 831 pacientes con un seguimiento a 10 años reportando resultados buenos a excelentes en 92% de las lesiones en cóndilos femorales, 87% de los tratados en lesiones tibiales, 79% de las lesiones en patela y 94% de las lesiones de tobillo. Las desventajas de esta técnica incluyen una limitada disponibilidad del tejido donador (1-4cm<sup>2</sup>), indicaciones precisas (lesiones focales pequeñas y medianas) y

edad límite de 50 años como máximo de los pacientes que sean sometidos a esta técnica.<sup>11</sup>

En 1994, Britberg y cols. describieron el Implante Autólogo de Condrocitos (ACI por sus siglas en inglés).<sup>11</sup> Esta técnica involucra el cultivo de condrocitos posterior a la toma de una biopsia de aproximadamente 200 a 300mg de tejido osteocondral de una zona de “no carga” de la rodilla, la subsecuente expansión *in-vitro* y la implantación en la zona de lesión bajo un parche periostico o membrana de colágeno. La técnica se realiza de forma artroscópica con la desventaja de requerir dos procedimientos quirúrgicos (toma de biopsia e implante de condrocitos). Con el reducido número de condrocitos disponibles en el total del volumen del cartílago articular y el limitado tamaño de la biopsia, solamente es posible obtener un pequeño número de células para ser implantadas al paciente. Se requiere en promedio un mínimo de 2 millones de células por cada cm<sup>2</sup> de área para poder reparar una lesión condral. Tomando en cuenta esto, para el tratamiento restaurativo de una superficie articular completa de 120cm<sup>2</sup> (4cm x 3cm) serían necesarias 240 millones de células. Se calcula que es posible obtener 2 millones de condrocitos por cada gramo de cartílago tomado. Por tal motivo, para obtener un número adecuado para la re-implantación, los condrocitos deben ser expandidos *in vitro*, en un proceso de varios subcultivos denominados “Pases”, durante los cuales las células se desdiferencian y pierden la capacidad de formar cartílago hialino tras la re-implantación. El tejido de reparación obtenido a través de esta técnica contiene componentes similares a los del cartílago hialino normal, pero aún con características biomecánicas inferiores.

Los resultados reportados del ACI han sido de buenos a excelentes en 51 de 61 pacientes con una media de seguimiento de 7.4 años.

Una alternativa a este tratamiento es la generación *in vitro* de tejido condral autólogo por medio de técnicas de cultivo e ingeniería de tejidos; Implante de Condrocitos Autólogos Cultivados en una Matriz (MACI por sus siglas en inglés). Los condrocitos se cultivan en una membrana de colágeno de aplicación clínica y se ha demostrado que expresan marcadores extracelulares de matriz y otros marcadores encontrados en el cartílago articular normal.<sup>11</sup> La ventaja de esta técnica es el implante del constructo vía artroscópica, lo que ofrece un procedimiento quirúrgico menos invasivo al paciente, menor dolor y pronta reincorporación a sus actividades en corto tiempo.

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario de investigación que combina conocimientos multidisciplinarios con biología celular y molecular, pudiendo desarrollar una alternativa eficaz para la generación de constructos que se utilicen en la reparación de las lesiones condrales, con el objetivo de restaurar la estructura completa y las propiedades del cartílago nativo a través del cultivo de células con potencial condrogénico.<sup>5</sup>

Las células troncales mesenquimales (CTM) son una de las alternativas utilizadas en ingeniería de tejidos con potencial condrogénico; son un tipo de células aisladas de individuos adultos que han sido identificadas en la médula ósea, sangre periférica, tejido adiposo y tejido conectivo. Estas células son fáciles de aislar, cultivar, manipular *in vitro* para dirigir el metabolismo y generar células especializadas como el condrocito; por estas razones han llegado a considerarse como una herramienta importante y alternativa para la reparación del cartílago articular, dado que es posible obtener células autólogas con potencial condrogénico para generar un tejido condral *in vitro*.

Diversas fuentes de CTM han sido utilizadas por la ingeniería de tejidos para la reparación del cartílago: tejido adiposo, médula ósea, periostio y sinovial. Los criterios

establecidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular para definir a las CTM son 3: la habilidad para adherirse al plástico en condiciones de cultivo estándar y formación de colonias, la caracterización fenotípica basada en la ausencia de antígenos de superficie hematopoyéticos (CD45, CD34 y CD14) y presencia de marcadores CD105, CD90, CD73 y capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia linajes mesenquimales: osteogénico, condrogénico, adipogénico y muscular. La combinación de estos criterios es la que debe aplicarse para tener la certeza de aislar una población de CTM “pura” que sea útil en la generación de tejidos especializados.

Las CTM son relativamente fáciles de obtener de la médula ósea por medio de punción de cresta iliaca, con el inconveniente de tratarse de un procedimiento invasivo y sumamente doloroso para el paciente; con lo que se requieren dos procedimientos quirúrgicos (toma de biopsia e implante). Otra opción de obtener este tipo de células de una forma menos invasiva es el reclutamiento de células troncales de sangre periférica a través de la administración previa de factor estimulante de colonias de granulocitos (Filgrastim) o citocinas, este proceso es denominado “movilización”. Esta técnica simula la liberación fisiológica de las células troncales y progenitoras del reservorio de la médula ósea a sangre periférica, en respuesta a señales de estrés durante la lesión o inflamación. Una vez obtenidas, las CTM pueden ser congeladas hasta su utilización o bien ser cultivadas para su expansión y uso en la generación de tejidos especializados.

En años recientes la regeneración de cartílago se ha convertido en uno de los “objetivos primordiales” para la bioingeniería de tejidos. El uso de CTM como alternativa celular es una alternativa prometedora para la regeneración del cartílago articular debido a que estas células pueden funcionar estimulando la condrogénesis mediante dos vías: produciendo citocinas mediadoras de la respuesta inflamatoria, lo cual reduce la

formación de tejido fibroso y en segundo lugar, las CTM poseen la facultad de generar células condrales capaces de producir matriz condral al promover la regeneración de la superficie articular generando un tejido con propiedades biomecánicas equiparables a las del cartílago articular nativo.

En el Instituto Nacional de Rehabilitación Luis Guillermo Ibarra Ibarra (INRLGII), una de las principales líneas de investigación es la de tratar las lesiones condrales mediante técnicas de regeneración para evitar el deterioro articular y la subsecuente osteoartritis.

EL tratamiento de las lesiones condrales de la rodilla en pacientes jóvenes empleando condrocitos autólogos se ha convertido en una alternativa de tratamiento segura y beneficiosa en algunos países de Europa, Asia y Estados Unidos desde la década de los 90s. En el INR-LGII la técnica de Implante de Condrocitos Autólogos se encuentra bien estandarizada y se han tratado alrededor de 50 pacientes con resultados satisfactorios a mediano y largo plazo. Sin embargo, esta técnica requiere dos procedimientos quirúrgicos. El primero, para la obtención de una biopsia de cartílago articular y el segundo, seis semanas después para implantar los condrocitos expandidos en cultivo; procedimiento que incrementa riesgos quirúrgicos y costos. Por tal motivo, se han buscado nuevas fuentes celulares para facilitar el implante, que permitan reducir costos y riesgos para el paciente por lo que en este proyecto se utilizaron CTM aisladas de médula ósea y sembradas sobre un polímero comercial ya probado para la reparación de la superficie articular para generar un constructo de tejido condral *in vitro* y realizar una sola artroscopía para la implantación del mismo; reduciendo así el riesgo y el costo del tratamiento al mismo tiempo que se promueve la regeneración del cartílago articular.

La movilización de CTM de sangre periférica es un procedimiento que ha demostrado ser viable en estudios animales realizados como lo demuestran los estudios realizados por el Dr. Landa en el laboratorio de biotecnología del INRLGII, así como la literatura internacional. (referencia estudios), sin embargo no existe en la literatura estudios que reporten el uso de células troncales mesenquimales derivadas de sangre periférica para la reparación de lesiones condrales focales de rodilla en humanos; Los únicos estudios que involucran la utilización de CTM derivadas de sangre periférica para la reparación condral en humanos son los realizados por el Dr. Saw Ky, donde utiliza CTM como adyuvante a la técnica de microfracturas para la reparación condral, en su estudio realiza una técnica de microfracturas asociada a movilización de CTM de sangre periférica mediante la aplicación de 300mcg de Filgastrim durante el 4, 5 y 6 día postoperatorio para obtener al 7 día postoperatorio una cosecha de CTM la cual recolecta mediante aféresis a través de un acceso venoso central (vena femoral), obteniendo 8 ml de alícuota para su posterior inyección intrarticular. Las CTM restantes del procedimiento son conservadas en una solución al 10% dimetilsulfoxido a una temperatura de -196°C para posteriormente aplicarlas mediante una inyección intrarticular de 8ml durante las 4 semanas subsecuentes; este estudio reporta una mejoría: clínica por escala de IKDC e, Imagenológica por IRM y por biopsia durante una segunda vista artroscópica a los 24 meses.

## **JUSTIFICACIÓN**

Las lesiones de cartílago en la rodilla son lesiones progresivas que afectan entre el 10 y 12% de la población general (Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ. Chondral injuries. Curr Opin Rheumatol. 2002;14:134–141.), 63% de los pacientes que se someten a una

artroscopia presentan como hallazgo una lesión condral y se encuentran entre la 3ª y 4ª década de la vida. En un estudio de 4,600 artroscopias de rodilla en el INR se encontró una incidencia similar de lesiones condrales en pacientes jóvenes a la reportada en la literatura mundial. Esta bien descrito que la evolución natural de las lesiones condrales no tratadas es el establecimiento de la Osteoartritis temprana. Sin embargo, cuando la lesión se trata a tiempo, se reduce el riesgo en un 50% de someterse a una cirugía de reemplazo articular por OA secundaria a la lesión condral. El tratamiento de las lesiones condrales es diverso, sin embargo la técnica que mejores resultados a largo plazo ha ofrecido es el Implante de Condrocitos Autólogos con la desventaja de requerir dos procedimientos quirúrgicos. Con el Implante de CTM se busca reducir costos, tiempo y morbilidad para el paciente. No existen reportes en la literatura acerca de la utilización de células troncales movilizadas de sangre periférica prediferenciadas a línea condral para el tratamiento de lesiones de cartílago en rodilla.

## **OBJETIVO GENERAL**

Comparar la evolución clínica y por resonancia magnética de los pacientes con lesiones de cartílago en rodilla tratados con implante de CTM movilizadas de sangre periférica.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.-Estandarizar de una técnica de ingeniería de tejidos para la formación *in-vitro* de un constructo de células troncales mesenquimales movilizadas de sangre periférica sembradas sobre un polímero comercial que sea estable a la manipulación artroscópica.

2. Estandarizar un procedimiento quirúrgico para el Implante de Células Troncales movilizadas de sangre periférica para el tratamiento de las lesiones de cartílago en cóndilos femorales, troclea y patela.
3. Detectar las fallas de los implantes colocados y posibles efectos adversos de la movilización celular.
4. Evaluación del tejido de reparación con 2ª vista artroscópica a los 12 meses de post-operados.

## METODOLOGÍA

Se estudiaron 13 pacientes provenientes de la consulta externa de ortopedia del deporte y artroscopia del INRLGII, con edad entre 18-50 años, ambos géneros, que presentaron lesiones condrales de entre 1-4 cm<sup>2</sup> de diámetro en cualquier zona de la superficie articular de carga de cóndilos femorales o patela diagnosticados por resonancia magnética de 1.5 teslas con técnica cartigram<sup>R</sup> (Mapeo T2), pudiendo estar asociado o no a lesiones meniscales o ligamentarias reparables por cirugía artroscópica y que aceptaron participar en este estudio firmando el correspondiente consentimiento informado; Se excluyeron todos aquellos pacientes que presentaran deformidades angulares de rodilla, artrosis generalizada, enfermedad reumática o metabólica con afección articular, artropatía por cristales, antecedente de enfermedades o deficiencias hematopoyéticas.

A los 13 paciente incluidos se les realizó resonancia magnética de 1.5 teslas de la rodilla afectada con técnica de cartigram<sup>R</sup> de manera pre-operatoria, a los 3, 6, 9 y 12 meses, también se realizaron las escalas funcionales de rodilla: KOOS, Tegner, Lysholm, IKDC objetivo y subjetivo, previo a la cirugía, a los tres, seis, nueve y doce

meses así como procedimiento artroscópico de segunda vista a los 12 meses de la primera cirugía.

### **Procedimiento de movilización.**

#### Obtención de sobrenadante enriquecido.

A los 13 pacientes de manera ambulatoria se les tomo 1 paquete de plasma que fue centrifugado e inactivado a 56°C por 30 minutos, se realizó la filtración (0.22um) del cual se obtuvo suero el cual fue separado en alícuotas de 50 ml y se almacenó a -22°C; Se obtuvieron 6 muestras de cartílago cadavérico fresco a través del laboratorio de tejidos de Biograft, estas muestras de cartílago se sometieron a digestión enzimática a 37° por 4 horas, para obtener únicamente los condrocitos los cuales se colocaron en una monocapa y se les agregó el suero de los pacientes 10% previamente colectado + DMEM-F12 + antibiótico y antimicótico y se cultivó durante 4 semanas hasta obtener un sobrenadante enriquecido.

#### Extracción de células troncales autólogas.

Los 13 pacientes seleccionados fueron sometidos al procedimiento de movilización de células troncales mesenquimales y aislamiento (ITESM). La técnica de extracción consistió en la toma de un paquete globular (280 a 380 ml) después de la aplicación de 300 mcg de factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF) vía subcutánea en la región deltoidea cada 24 horas durante 3 días consecutivos. Antes de la primera aplicación y después de cada día de aplicación, se les realizó una biometría hemática hasta que los valores de granulocitos se normalizaron. Después de la última aplicación (día 4) se obtuvo el paquete globular con la finalidad de obtener un pool de granulocitos.

### Toma de Buffy Coat

En el banco de sangre del INRLGII se procesó inicialmente el remanente de la separación de los paquetes globulares, denominado “Buffy coat” que es la fracción de una muestra de sangre anticoagulada que contiene la mayoría de los glóbulos blancos y plaquetas después de la centrifugación por gradiente de densidad de la sangre.

En la unidad de biotecnología se estableció su volumen y dentro de la campana de flujo laminar con técnica estéril se procedió a la preparación para el montaje del buffy coat en el kit CS-900.2; El cual sirve para realizar la separación de las células mononucleares de sangre periférica con el dispositivo Sepax 2 de Biosafe, el cual se trata de un separador de células, completamente automático, de ciclo cerrado y estéril, que permite una separación completa y eficiente de la sangre del cordón umbilical, sangre periférica y médula ósea por centrifugación y posterior división de los componentes de la sangre a través de sensores ópticos.

Previa obtención del “buffy coat” (Figura 1) en el banco de sangre del INR se realizó el montaje del buffy coat en el kit CS-900.2 (Figura 2)

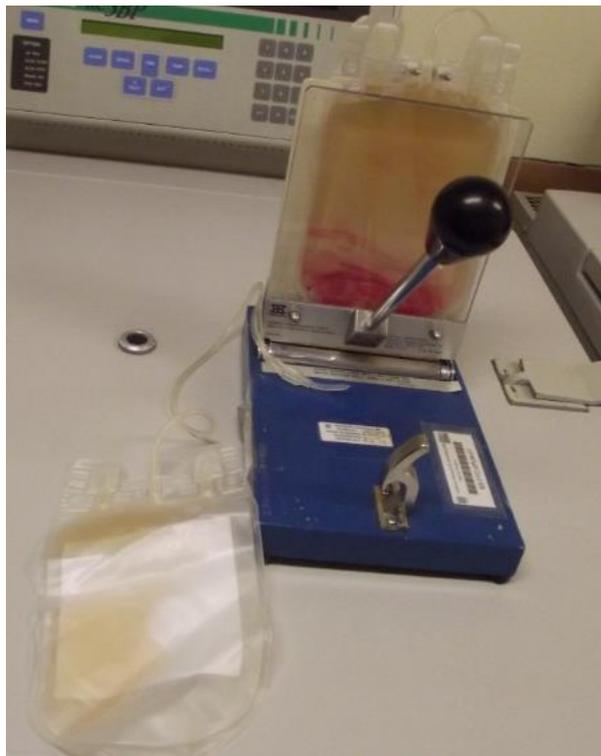


Figura 1: Buffy Coat

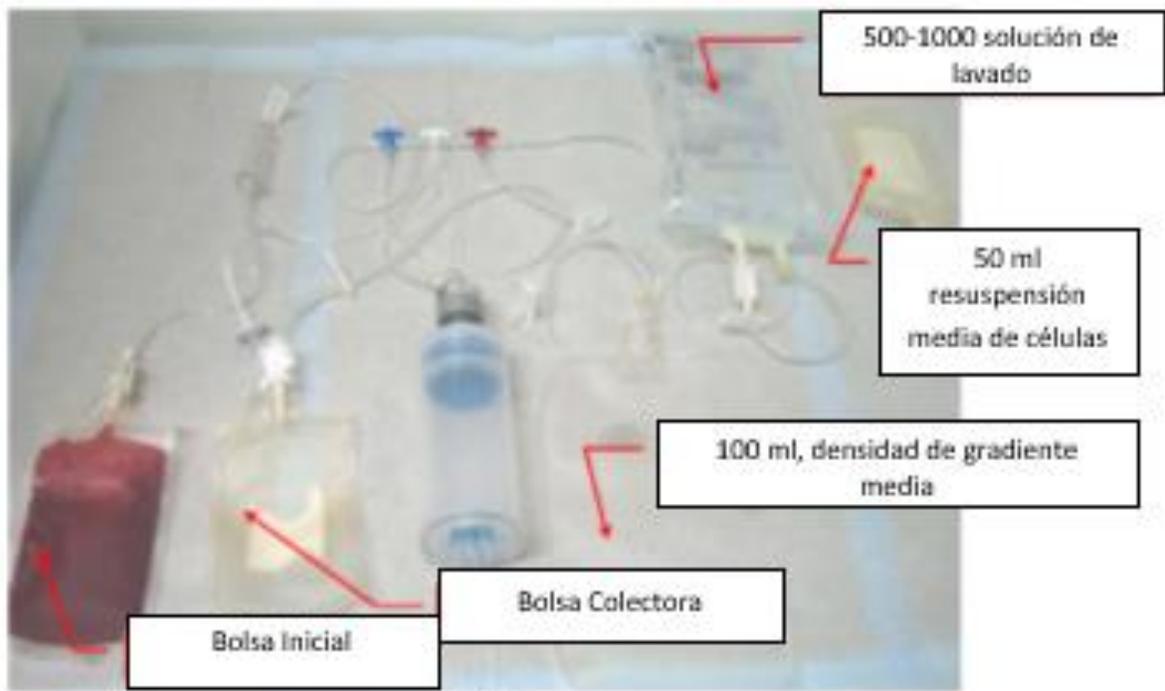


Fig. 4

Figura 2: kit CS-900.2

El kit ensamblado se instala en el dispositivo Sepax 2 (Imagen 3), realizó la cuenta celular total del producto final bajo condiciones estériles. Transfiriendo el contenido de la bolsa colectora a un tubo de 50 mL y este se centrifugó por 10 min a 300g para iniciar el proceso de conteo de las células mononucleares.



Figura 3. Dispositivo Sepax 2

El procedimiento de obtención de la subpoblación celular CD90+ a partir de las células mononucleares obtenidas del buffy coat se realiza posterior a la centrifugación, en seguida se toman 10 $\mu$ L los cuales se mezclan en un tubo de 1mL con 990  $\mu$ L de solución de marcado y se procedió a realizar la lectura en el contador celular automatizado Scepter™ de la marca millipore. (Figura 4)

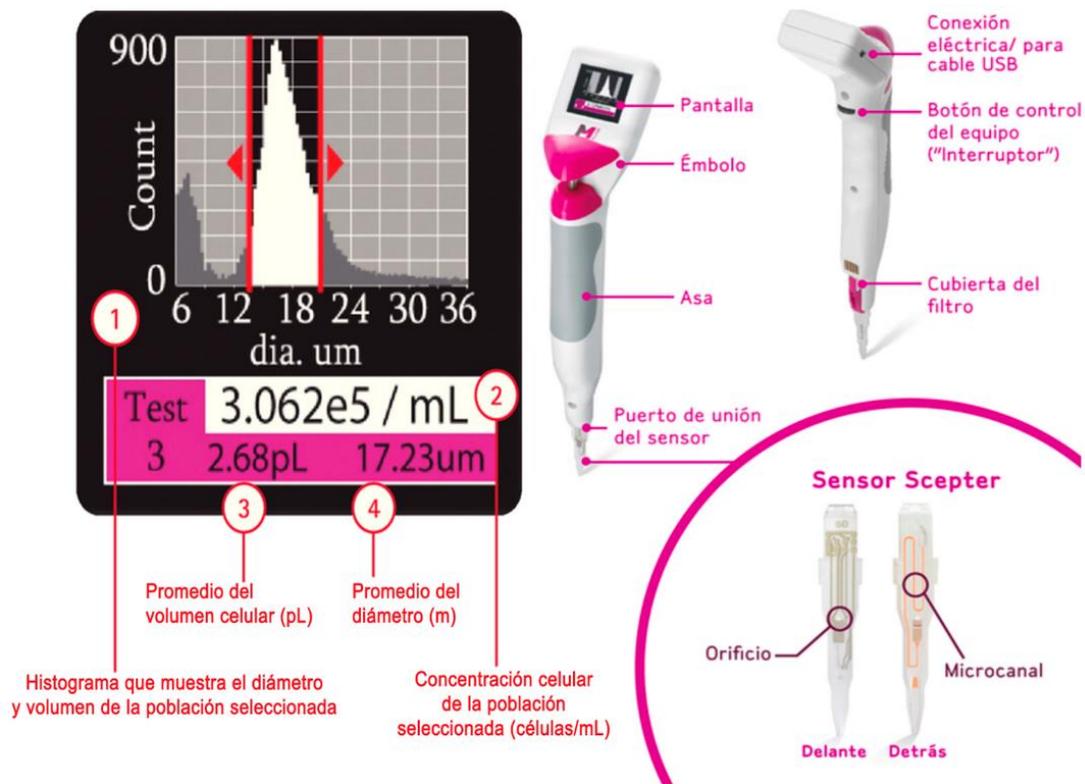


Figura 4. Contador celular automatizado Scepter™ marca millipore.

Establecido el número de células mononucleares, se procedió a repartir el contenido en tres tubos de 15 mL, a los cuales se les agregó por tubo 300 $\mu$ L del anticuerpo anti-CD90 (Miltenyi).

Los tres tubos de 15mL se incubaron por 20 min a 4°C en agitación orbital empleado el agitador orbital The MACSmix™ Tube Rotator. (figura 5)

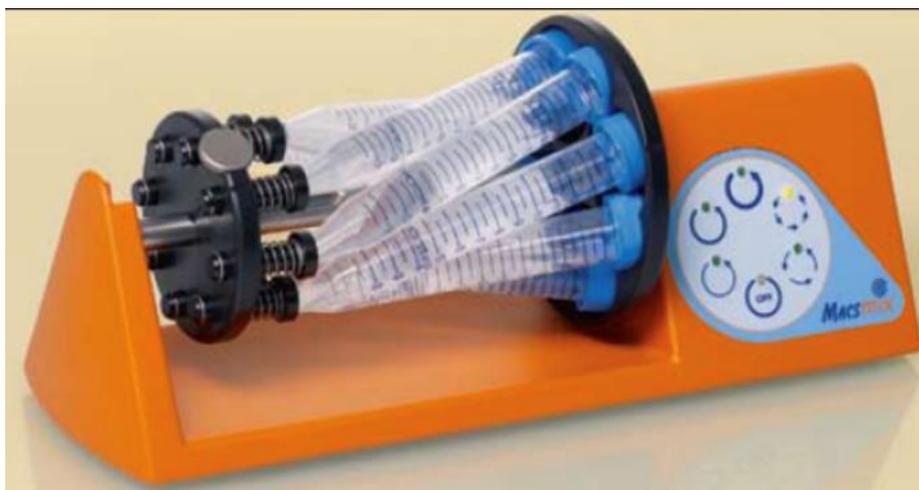


Figura 5: agitador orbital The MACSmix™ Tube Rotator

Transcurrido el tiempo de incubación de se procedió a montar el kit de separación manual de células (Miltenyi) dentro de la campana de flujo laminar y se colocaron las columnas de separación celular LS (Miltenyi).

Posteriormente se colocaron los 15 mL de la mezcla de las células y el anticuerpo y se hacen pasar por la columna como de observa (Figuras 6,7 y 8)

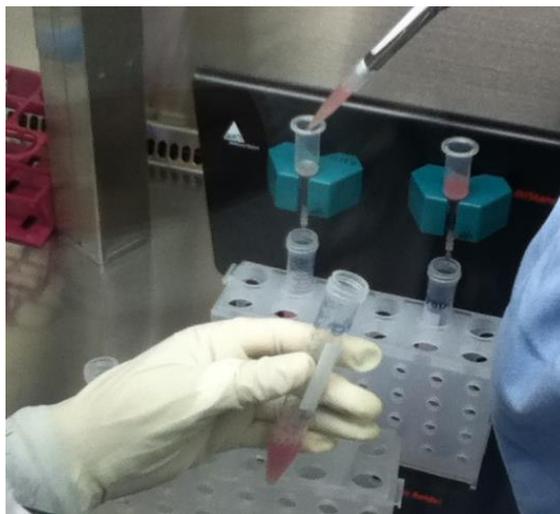


Figura 6. Los 15 ml de células mezcladas pasán a través del kit de separación manual de células (Miltenyi), separando las células CD 90 +

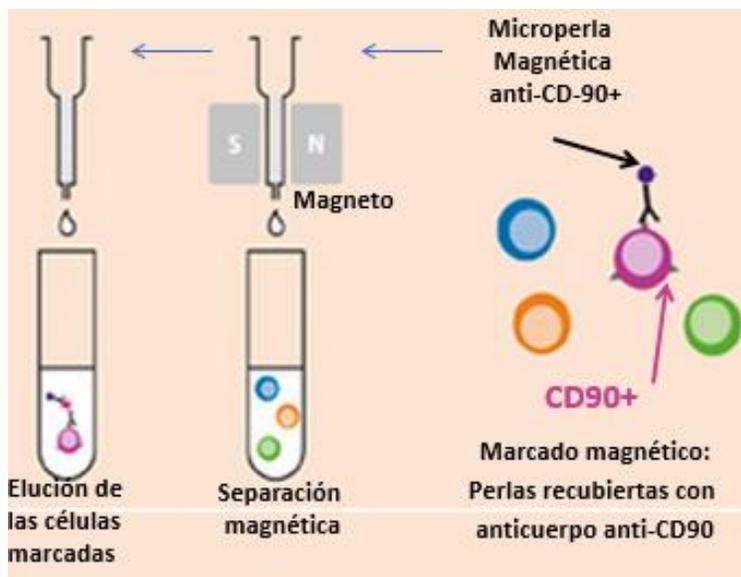


Figura 7. Esquema representativo de la separación de las Células CD 90+

Al término de pasar la muestra a través de la columna, esta columna se desmonta del sistema de separación y se coloca sobre un tubo de 15 mL. Este se centrifuga por 10 min a 300 g. Posteriormente se toma una alícuota de 10  $\mu$ L y se repite el proceso de conteo celular con el contador automatizado Scepter™ de la marca millipore.

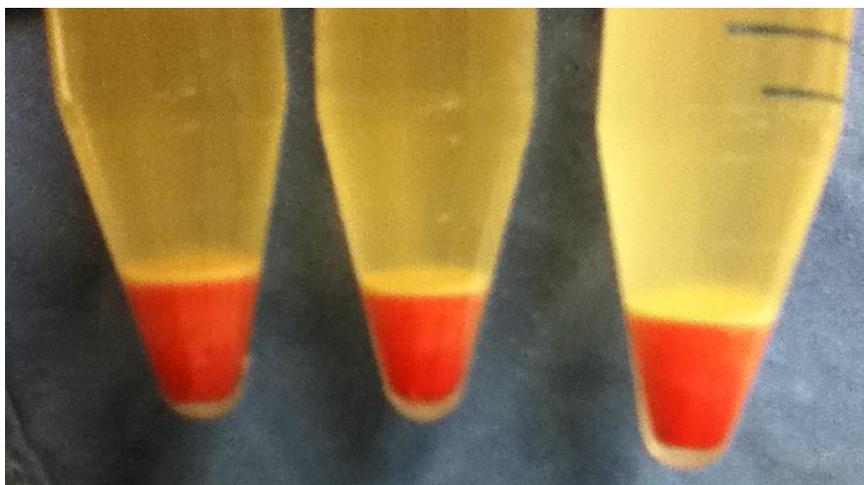


Figura 8. Resultado final de la separación de las células CD 90

Una vez purificada la población se realizó el análisis de la misma por citometría de flujo, así mismo se evaluó la presencia de marcadores de células troncales por inmunofluorescencia (BD).

### Generación de constructo *in vitro*.

Con el procedimiento de aislamiento de células troncales mesenquimales (ITESM) se obtuvo un purificado de células troncales autólogas de los 13 pacientes seleccionados, estas células se sembraron sobre el polímero de ácido poliglicólico a una concentración de 2 millones de células por  $1 \text{ cm}^2$ . Los constructos se generaron en número según el tamaño de la lesión (1 constructo por cada centímetro cuadrado de lesión condral) y fueron cultivados con sobrenadante de condrocitos cadavéricos (consistente con lo reportado por Yilin Cao en 2012 y Kandel en el mismo año) enriquecido con suero autólogo en una concentración (40/60). Posterior a 2 semanas de cultivo (Yilin Cao 2012) se programó el procedimiento de implante para la colocación de cada constructo en la zona de lesión.

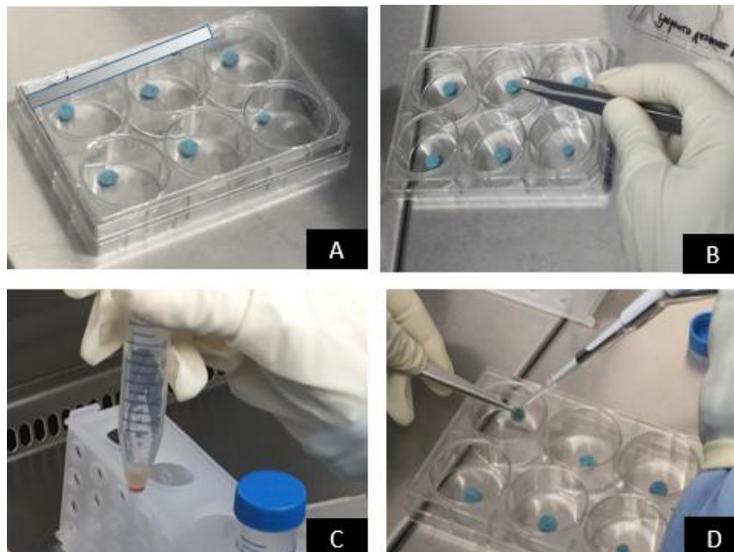


Figura 9 Generación del constructo In-Vitro  
 A) Polímero de ácido poliglicólico. B) Sembrado de células troncales mesenquimales a concentración de 2 millones por  $1 \text{ cm}^2$ .  
 C). Cultivo de constructos en medio condral cadavérico (coocultivo indirecto) D) Constructo posterior a cultivo de 4 semanas.

### Implante de Constructo en cóndilo femoral y troclea

Se realizó la artroscopia de la rodilla afectada por técnica artroscópica convencional para rodilla, mediante portales anterolateral y anteromedial; se realizó la artroscopia diagnóstica corroborando las lesiones diagnosticadas por IRM clasificándolas de acuerdo a la ICRS, de igual manera se diagnosticaron lesiones agregadas de meniscos y ligamento cruzado anterior; en los casos que se presentaron estas lesiones se realizó la reparación artroscópica previa reparación condral. La lesión condral se desbridó hasta dejar bordes libres pudiendo observar bordes de cartílago de características normales. Mediante la introducción de una cánula transparente con sello a través del portal artroscópico más accesible a la lesión, se procedió a la colocación de una mini-ancla bioabsorbible de 1.3 mm (Minilok anchor, Mitek DePuy) en el hueso subcondral, justo en el centro de cada centímetro de lesión. A través de la sutura PDS derivada del ancla, se deslizó el implante y se fijó con nudos artroscópicos para posteriormente verificar su estabilidad. El número de implantes utilizados para cada lesión dependió del tamaño de la misma. Se realizarán evaluaciones para determinar los grados de flexo-extensión en los que se encontraba estable y libre de compresión el implante.

### Manejo Post-operatorio

Los cuidados postoperatorios inmediatos consistieron en crioterapia por 20 minutos cada 6 horas, movilizador pasivo continuo de 0 a 60°, terapia analgésica, antiinflamatoria y antibioticoterapia profiláctica durante su hospitalización. Después de la cirugía, los pacientes se incluyeron en un programa de rehabilitación basado en las fases de cicatrización del constructo.

Fase 0, Intrahospitalaria; control de dolor, inflamación, crioterapia, movilidad pasiva continua de 0 a 60°. Fase 1, Protección temprana (semana 0-8); No apoyo, movilidad pasiva continua progresiva de 0 a 120° de la semana 0 a 6, rodillera mecánica bloqueada en forma progresiva de 0 a 120° de la semana 0 a 6. Fase 2, fase de Transición (sem. 8 a 16); Reeducación de la marcha y recuperación de arco de movilidad. Fase 3, remodelación (sem. 16-x); Programa de fortalecimiento muscular de flexores y extensores de rodilla, con evaluación isocinéticas a los 12 meses, reincorporación a las actividades de la vida diaria, incluidas las laborales y deportivas.

### Evaluación Clínica

Se realizó la evaluación clínica subjetiva y objetiva mediante los cuestionarios validados del International Knee Documentation Committee (IKDC) subjetivo y objetivo, Lysholm, Tegner y Knee Injury and Osteoarthritis Score (KOOS) antes de la cirugía, a los 3, 6, 9 y 12 meses.

### Evaluación de la calidad del tejido de reparación: Mapeo-T2

Se realizó la evaluación imagenológica por resonancia magnética nuclear de la zona de reparación del defecto con un software para cartílago (Cartigram), a los 3, 6, 9 y 12 meses de post-operados; se realizó un mapa para las lesiones y se comparó la zona reparada contra una zona de cartílago sano en zona de carga, misma región de la rodilla afectada. De tal forma que se evaluaron 2 áreas de 2 cm<sup>2</sup> y una de 4 cm<sup>2</sup> del sitio de lesión reparado contra áreas de mismas características en una zona de cartílago sano

## Segunda vista artroscópica

Los pacientes fueron sometidos al procedimiento artroscópica de segunda vista a los 12 meses del implante en donde se evaluó macroscópicamente la calidad del tejido y la integración al cartílago adyacente

### Análisis de los resultados

De acuerdo con el objetivo general y la presencia de variables que implican muestras paramétricas, se aplicó la prueba estadística ANOVA de dos vías; considerándose que esta prueba estadística es de las más potentes. Teniendo así como factor uno los grupos (control y experimental) y factor dos, las variables (fenotipo y expansión celular). Se tomaron como significativos los valores de  $p$  menores a 0.5 ( $p < 0.5$ ). Para el caso de la determinación de la capacidad condrogénica de los grupos en los que se consideró solo el porcentaje de tejido, siendo considerados éstos datos como No Paramétricos.

## **RESULTADOS**

Se incluyeron 14 pacientes al inicio del estudio de los cuales 13 continúan en seguimiento; se eliminó un paciente al presentar artrosis generalizada de la articulación al momento de la artroscopia; de los 13 pacientes incluidos, 10 han finalizado el seguimiento a 12 meses, los 3 restantes se encuentran en seguimiento a 9 meses por lo que se reportan resultados por intención a tratar.

El universo de estudio estuvo conformado por 13 pacientes; 8 masculinos, 5 femeninos, edad promedio de 33.6 +/- 8.9 de desviación estándar en el intervalo de los

23 a los 57 años, los lados intervenidos fueron: 6 del izquierdo y 7 del derecho. La lesión correspondió en mayor proporción al cóndilo lateral (38.5%) (Gráfico 2), 30.8% sin lesiones asociadas y 30.8% sin procedimientos asociados; en 7 casos había 1-2 lesiones y en 6 de 3-4 lesiones. Por número de implantes: 46.2% recibió 1-2 y 53.8% de 3-5. En 4 casos el tamaño de la lesión estaba entre 1.0 a 2.0 cm<sup>2</sup> y en los 9 restantes entre 2.25 a 6.0 cm<sup>2</sup>.

Las reacciones adversas a la aplicación de filgastrim se reportaron en un 100% como reacciones adversas leves y son las siguientes: Día 1: malestar general 3, coxalgia leve 1, coxalgia moderada 3, coxalgia + lumbalgia 2, lumbalgia leve 3, lumbalgia + cefalea 1. Día 2: coxalgia leve 3, coxalgia+ lumbalgia 4, lumbalgia leve 3, lumbalgia moderada 1, sin reacción 2, Día 3: malestar general 3, coxalgia leve 2, sin reacción 8 (Gráfico 1)

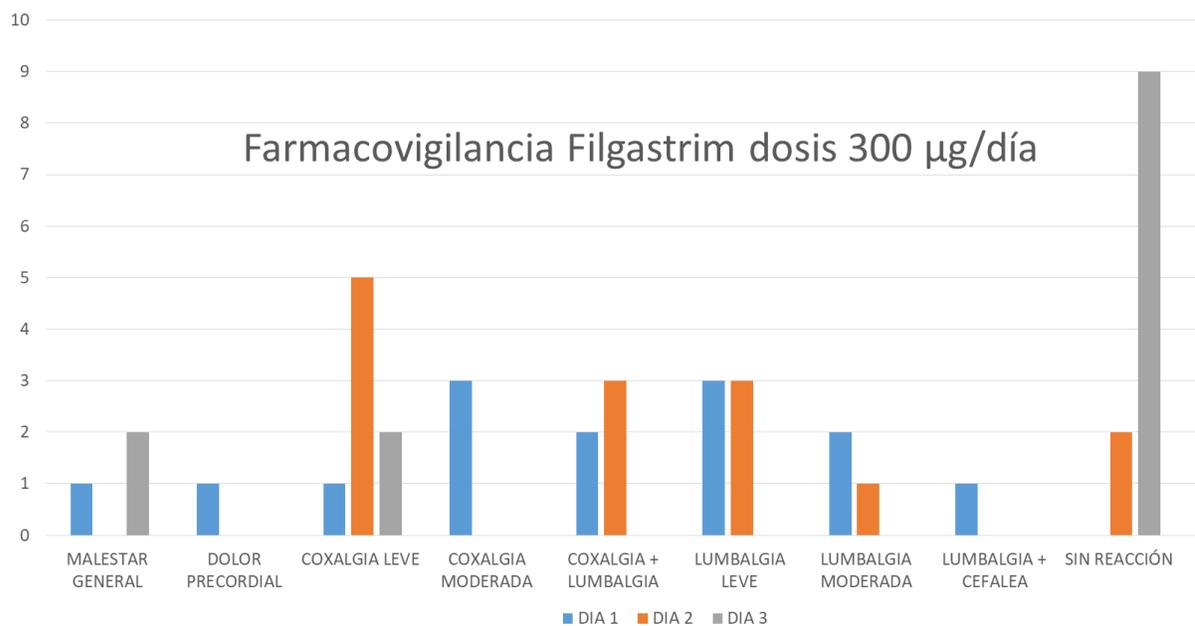


Gráfico 1: reacciones adversas a la aplicación de Filgastrim

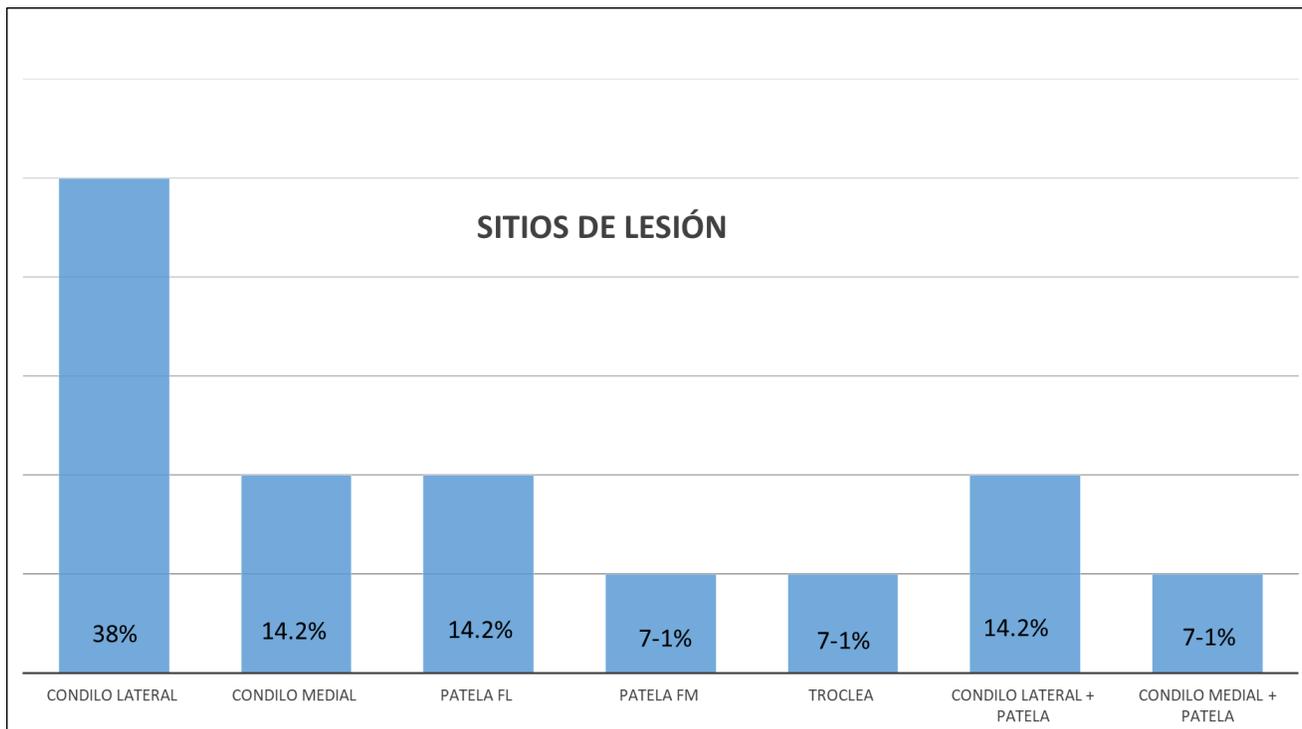


Gráfico 2: distribución de lesiones por sitio afectado.

Con excepción del test IKDC-S ( $p = 0.24$ ), no obstante un incremento de +19.0% en el puntaje basal hacia el año de seguimiento, en todos los demás se observó un cambio significativo de la medición pre-operatoria hasta los 12 meses de seguimiento; obsérvese (tabla 1) que el porcentaje de cambio del nivel basal pre-operatorio hacia los 12 meses de seguimiento del test IKDC-O aunque sólo disminuyó -13.3% dicho cambio fue significativo a la baja; en todos los demás test los cambios fueron significativos hacia el incremento de las puntuaciones basales.

**Tabla 1. Evolución durante el seguimiento en los test aplicados: media (Desviación estándar)**

Test	Seguimiento						p
	Pre-operatoria	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	Cambio basal-año	
Tegner	2.6 (1.6)	2.3 (0.7)	3.1 (0.8)	2.7 (0.7)	4.1 (1.7)	+57.6%	0.007
Lysholm	55.6 (18.0)	54.4 (16.1)	72.8 (20.7)	74.2 (18.3)	75.0 (19.8)	+34.8%	0.01
IKDC-S	44.6 (13.2)	41.1 (11.6)	49.3 (8.1)	53.7 (16.2)	53.1 (9.8)	+19.0%	0.24
IKDC-O	2.54 (0.7)	2.69 (0.9)	2.08 (0.4)	1.75 (0.4)	2.20 (0.4)	-13.3%	0.02
Koos-S	59.3 (17.7)	62.3 (15.4)	79.2 (14.4)	79.9 (13.2)	81.0 (16.8)	+36.5%	0.01
Koos-D	58.0 (16.1)	64.4 (15.7)	79.0 (15.2)	78.4 (18.0)	80.8 (13.3)	+39.3%	0.009
Koos-A	66.7 (16.7)	69.6 (15.2)	83.1 (13.9)	85.1 (14.7)	85.6 (11.2)	+28.3%	0.02
Koos-AD	31.5 (26.5)	32.6 (16.2)	45.7 (22.8)	54.3 (25.5)	56.0 (21.5)	+77.7%	0.006
Koos-C	24.0 (13.7)	25.0 (13.7)	36.0 (16.7)	41.4 (19.1)	46.6 (13.5)	+94.1%	0.008
Kujala	50.6 (18.8)	54.3 (12.5)	63.1 (15.4)	70.5 (14.8)	70.3 (15.4)	+38.9%	0.01

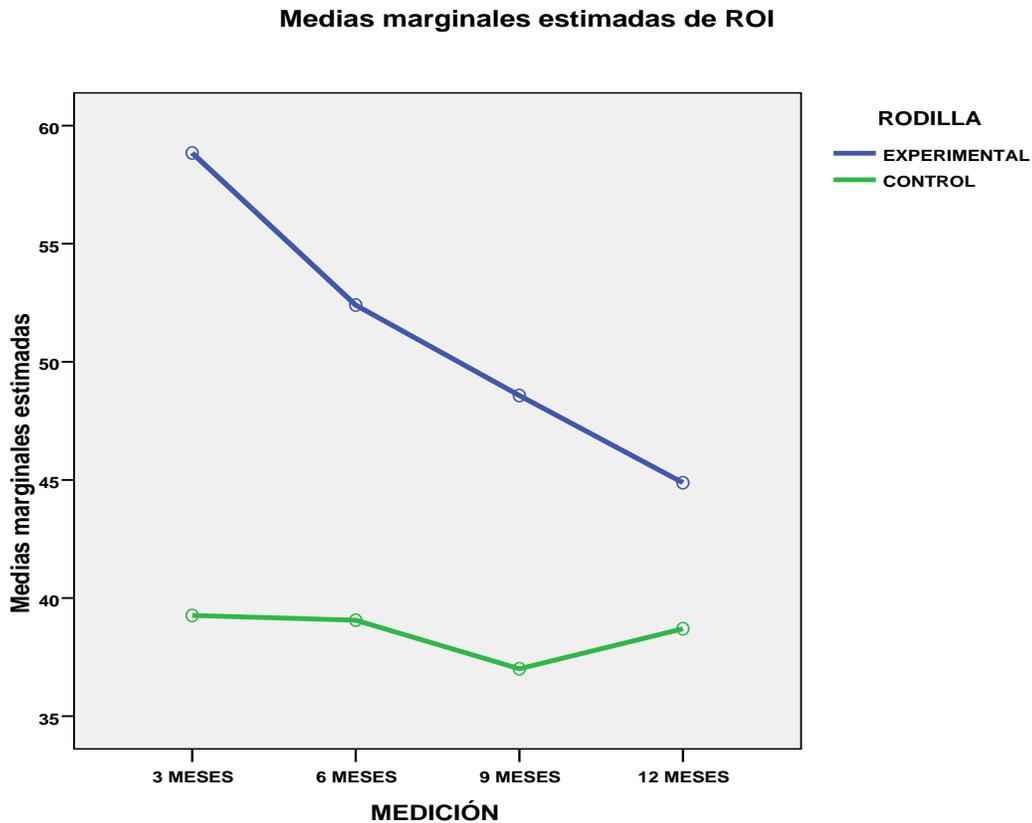
En el mapeo T2 de la rodilla lesionada, comparada con la control sana, se observó una disminución significativa del tiempo de relajación medido en milisegundos (ms); obsérvese (tabla 2, gráfico 1) que a los 3 meses el promedio fue de 58.8 +/- 2.1 ms el cual disminuyó hasta los 44.8 +/- 2.0 a los 12 meses lo cual equivale a un porcentaje de cambio de - 23.2% (p = 0.0001); en contraste, en las rodillas controles, el cambio fue de 39.2 +/- 2.1 a los 3 meses hacia 38.7 ms a los 12 meses, es decir, apenas -1.2% (p = 0.76). Comparativamente, a los 3 meses los promedios de los ms del tiempo de relajación estaban muy alejados entre la rodilla experimental y la control (58.8 vs 39.2: p = 0.0001); pero a los 6 meses la distancias se redujo con 52.4 vs 39.0 (p = 0.001), a los 9 meses las medias respectivas fueron 48.5 vs 37.0 (p = 0.001) pero a los 12 meses las medias tendieron a juntarse con 44.8 vs 38.7 con p apenas significativa de 0.04.

**Tabla 2. Promedios de los tiempos de relajación (ms) del mapeo T2, comparación del sitio de lesión reparado con sitio de cartílago nativo en zona de carga de la misma rodilla.**

RODILLA	Medida	Media	Error típ.	Intervalo de confianza al 95%.	
				Límite inferior	Límite superior
EXPERIMENTAL	3 M	58.844	2.188	54.247	63.440
	6 M	52.402	2.423	47.312	57.492
	9 M	48.574	1.972	44.432	52.717
	12 M	44.880	2.002	40.674	49.086
CONTROL	3 M	39.263	2.188	34.666	43.859
	6 M	39.062	2.423	33.972	44.152
	9 M	37.008	1.972	32.865	41.150
	12 M	38.700	2.002	34.494	42.906

Prueba de esfericidad de W de Mauchly 0.70,  $X^2 = 5.73$ , gl 5,  $p = 0.33$  homogeneidad de varianzas.

**Gráfico 1. Promedios de los tiempos de relajación (ms) del mapeo T2, comparación de las rodillas experimentales versus las controles sanas.**



Del total de covariables incluidas en el estudio, el género no tuvo influencia significativa en ninguno de los desenlaces tanto de los test como del mapeo T2; sin embargo, a los 12 meses de seguimiento el promedio del IKDC subjetivo (IKDC-S) de los pacientes operados de la rodilla izquierda (46.0 +/- 2.3 puntos) fue significativamente menor al promedio de los operados de la rodilla derecha cuya puntuación fue de 58.8 +/- 2.0 (ANCOVA tomó 42.9 como valor de la covariable IKDC-S preoperatoria,  $p = 0.007$  para

la comparación de promedios a los 12 meses). Contrástese este resultado con el correspondiente al IKDC-S de la tabla 1 cuya  $p = 0.24$  no fue significativa, ello indica que el lado operado es una variable confusora pues para que el cambio sea o no significativo depende de la rodilla operada siendo mejor el resultado para las derechas. El lado operado también influyó sobre los test Koos-C y Koos-D a los 3 meses y Koos-S a los 9 meses; véase (tabla 3) que excepto en Koos-C-3 en la que las rodillas derechas tuvieron un menor promedio que las izquierdas, en las otras mediciones de los test invariablemente las derechas tuvieron promedios muy superiores a las izquierdas.

**Tabla 3. Test influidos diferencialmente por el lado operado.**

**Estadísticos de grupo**

LADO	N	Media	Desviación típ.	p	
KOOS-D-3	IZQUIERDO	5	54.45	15.160	0.03
	DERECHO	7	73.73	11.288	
KOOS-C-3	IZQUIERDO	5	35.00	9.479	0.05
	DERECHO	7	20.54	12.350	
IKDC-S-9	IZQUIERDO	5	45.12	13.923	0.04
	DERECHO	3	68.03	6.872	
KOOS-S-9	IZQUIERDO	5	72.86	8.587	0.03
	DERECHO	3	91.67	11.482	

Ahora bien, el número de lesiones, el tamaño de la lesión y el número de implantes también fueron variables intervinientes en la modulación de los efectos. Así, el número de lesiones está correlacionado con coeficientes negativos con Koos-C a los 6 meses ( $r$

-0.652,  $p = 0.02$ ) y con los tiempos de relajación T2 a los 6, 9 y 12 meses con coeficientes -0.730 ( $p = 0.007$ ), - 0.677 ( $p = 0.015$ ) y - 0.656 ( $p = 0.05$ ) respectivamente; esto indica que a mayor número de lesiones menor fue la puntuación en Koos-C a los 6 meses y menores los tiempos de relajación de T2 a los 6,9 y 12 meses de seguimiento (véase panel con gráficos 3-6).

Gráfico 3. Correlación Koos-C 6 meses con número de lesiones.

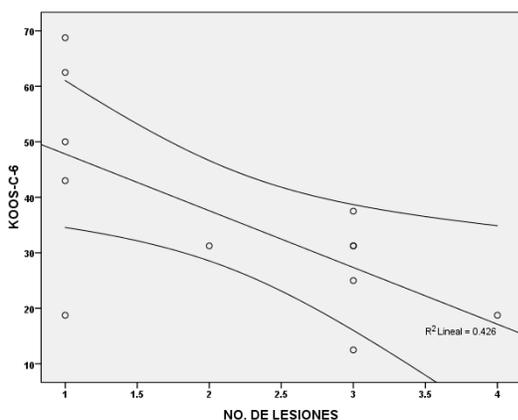


Gráfico 4. Correlación T2 6 meses con número de lesiones.

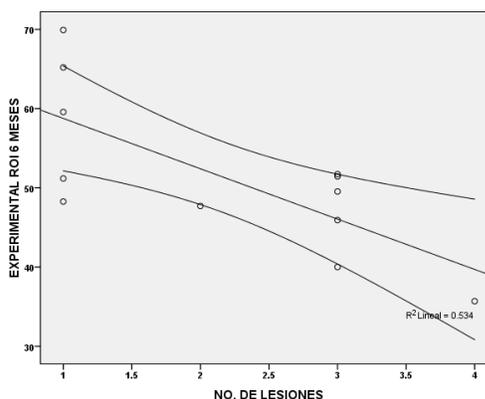


Gráfico 5. Correlación T2 a 9 meses con número de lesiones.

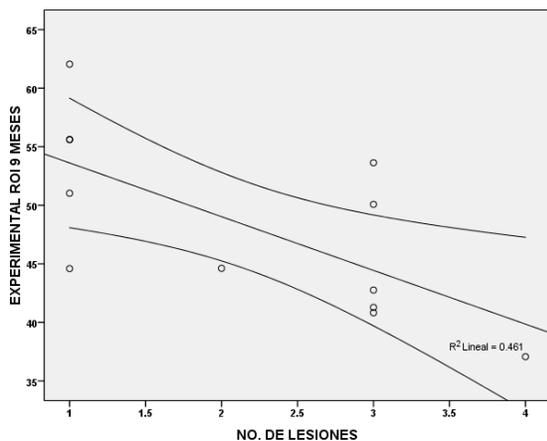
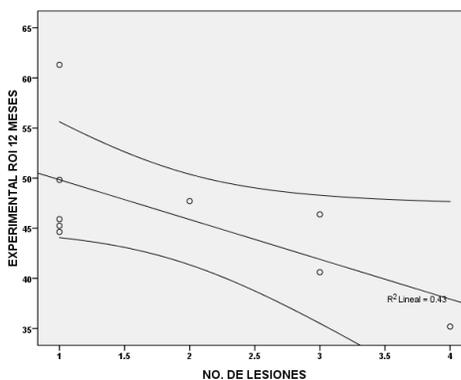


Gráfico 6. Correlación T2 a 12 meses con número de lesiones.



El tamaño de la lesión correlacionó con un coeficiente positivo con IKDC-O preoperatorio  $r = 0.606$  ( $p = 0.03$ ) y con coeficientes negativos con Koos-D preoperatorio  $r = -0.646$  ( $p = 0.02$ ), Koos-AD preoperatorio  $r = -0.616$  ( $p = 0.03$ ), Kujala preoperatorio  $r = -0.588$  ( $p = 0.04$ ), Koos- AD 6 meses  $r = -0.569$  ( $p = 0.05$ ), Koos-C 6 meses  $r = -0.583$  ( $p = 0.04$ ) así como con los T2 a los 3 y 12 meses siendo  $r = -0.640$  ( $p = 0.02$ ) y  $r = -0.751$  ( $p = 0.02$ ) respectivamente. Nótese que las correlaciones más intensas del tamaño de la lesión corresponden a los T2 a 3 y 12 meses de seguimiento. Cabe destacar que no se observa correlación significativa entre número de lesiones y el tamaño de la lesión  $r = 0.351$  ( $p = 0.26$ ).

Con lo pequeño que aún es la muestra de 13 pacientes la regresión múltiple a través de el número de lesiones y el tamaño de la lesión para predecir el tiempo T2 a los 12 meses de seguimiento arroja un coeficiente de correlación múltiple de 0.82 ( $p = 0.03$ ) pero la ecuación predictiva: ROI 12 meses = 57.628 – 2.518 (tamaño de la lesión) – 2.287 (no. de lesiones) no alcanzan aún la  $p$  significativas para cada pendiente de las variables; no obstante, el modelo indica que se tienen elementos para plantear la hipótesis que ambas variables serán las mejores predictoras de T2 a 12 meses de seguimiento:

### Coeficientes<sup>a</sup>

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	57.628	3.580		16.098	.000
	Tamaño de la lesión (cm2)	-2.518	1.192	-.566	-2.112	.079
	NO. DE LESIONES	-2.287	1.623	-.378	-1.409	.208

**Coefficientes<sup>a</sup>**

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	57.628	3.580		16.098	.000
	Tamaño de la lesión (cm2)	-2.518	1.192	-.566	-2.112	.079
	NO. DE LESIONES	-2.287	1.623	-.378	-1.409	.208

a. Variable dependiente: EXPERIMENTAL ROI 12 MESES

Si se deja sólo la variable tamaño de la lesión la predicción de T2 a 12 meses es:

55.599 – 3.343 (tamaño de la lesión) con una  $p = 0.02$ :

**Coefficientes<sup>a</sup>**

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	55.599	3.501		15.882	.000
	Tamaño de la lesión (cm2)	-3.343	1.109	-.751	-3.013	.020

a. Variable dependiente: EXPERIMENTAL ROI 12 MESES

Finalmente, el número de implantes correlacionó con:

Variables	Coefficiente r	P
Koos-D pre	-0.594	0.04
Tegner 6 meses	-0.563	0.05
IKDC-O 9 meses	-0.707	0.05
Koos-A 12 meses	-0.748	0.01

### Aislamiento y movilización de Celulas troncales mesenquimales derivadas de sangre periférica.

El promedio de cosecha de células CD90+ en sangre periférica movilizada fue de 144.5 millones. Lo que es aproximadamente el 17.07% de CD90+ del total de las células mononucleares aisladas.

El promedio de las celulas sembradas en los constructos por paciente fue de 77.2 millones (Tabla 7), en la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran los datos de todos los pacientes que participaron en el estudio.

Registro	Biometría			Manejo en biotecnología		Total de células sembradas en los andamios
	Tota de Leucocitos k/uL	Monocitos k/uL	Linficitos k/uL	Total células mononucleares	CD90	
1	30.3	1.5	4.5	1,073,000,000.00	164,752,500.00	106,360,000.00
2	33.3	1.3	4.3	407,416,196.00	12,426,464.00	12,426,464.00
3	18.8	0.7	2.4	660,869,286.33	60,336,000.00	60,000,000.00
4	24.4	0.9	3.9	419,000,000.00	109,000,000.00	45,300,000.00
5	25.4	1.3	3.2	683,635,452.69	140,125,215.50	28,000,000.00
6	27.4	1.4	5.6	483,000,000.00	22,870,000.00	22,500,000.00
7	32.4	1	4.2	535,936,435.13	14,120,000.00	14,000,000.00
8	26.3	0.9	3.3	210,900,000.00	187,584,000.00	218,348,000.00
9	26.275	1.12	3.85	1,028,000,000.00	372,200,000.00	372,000,000.00
10	21.3	1	3.4	815,227,253.44	305,000,000.00	300,000,000.00
11	20.2	0.7	3.7	703,000,000.00	142,631,400.00	28,111,000.00
12	24.4	1.5	2.9	1,054,400,000.00	241,000,000.00	216,900,000.00
13	31.1	1.2	4.8	2,934,000,000.00	107,508,000.00	28,000,000.00
PROMEDIO	26.275	1.12	3.85	846,798,817.20	144,581,044.58	111,688,112.62

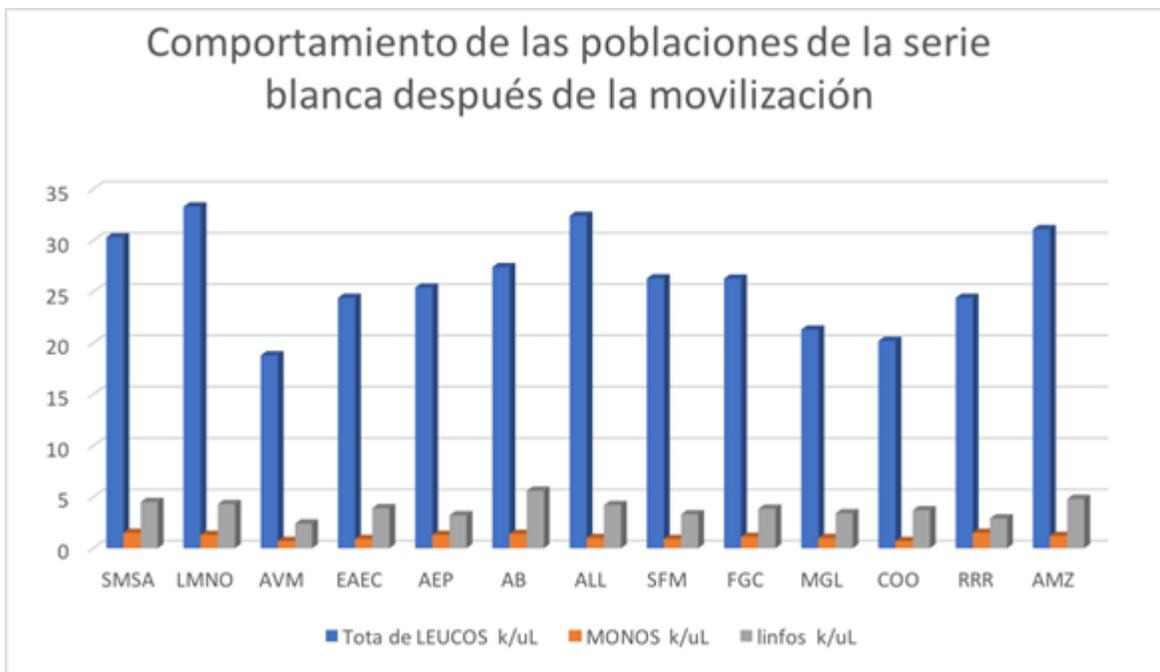
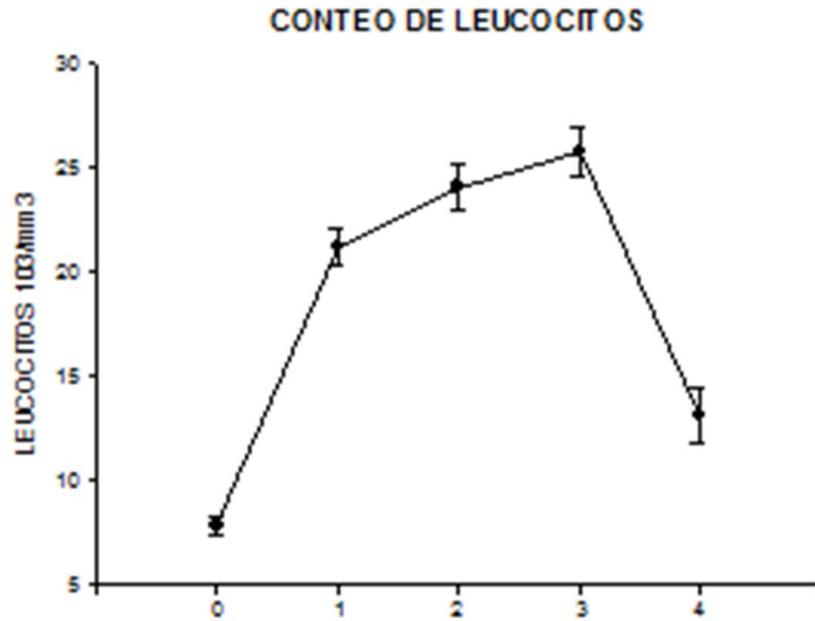


Gráfico 7 y Tabla 5: La elevación de la serie blanca fue estadísticamente significativa en todos los pacientes, alcanzando su punto máximo al 3 día, media

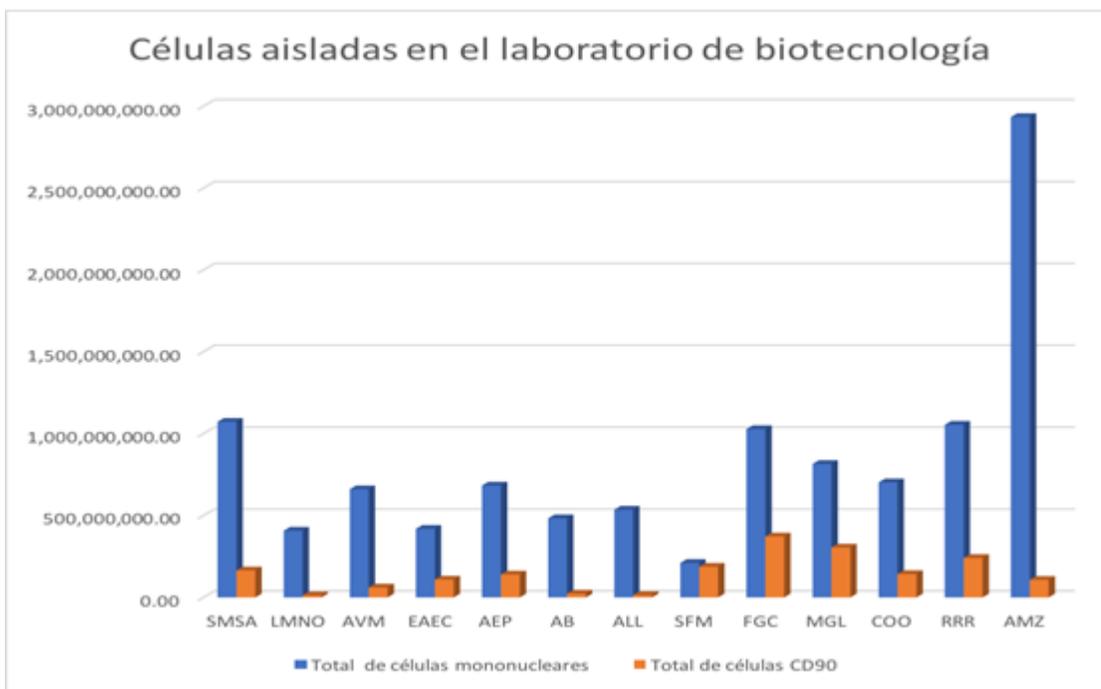
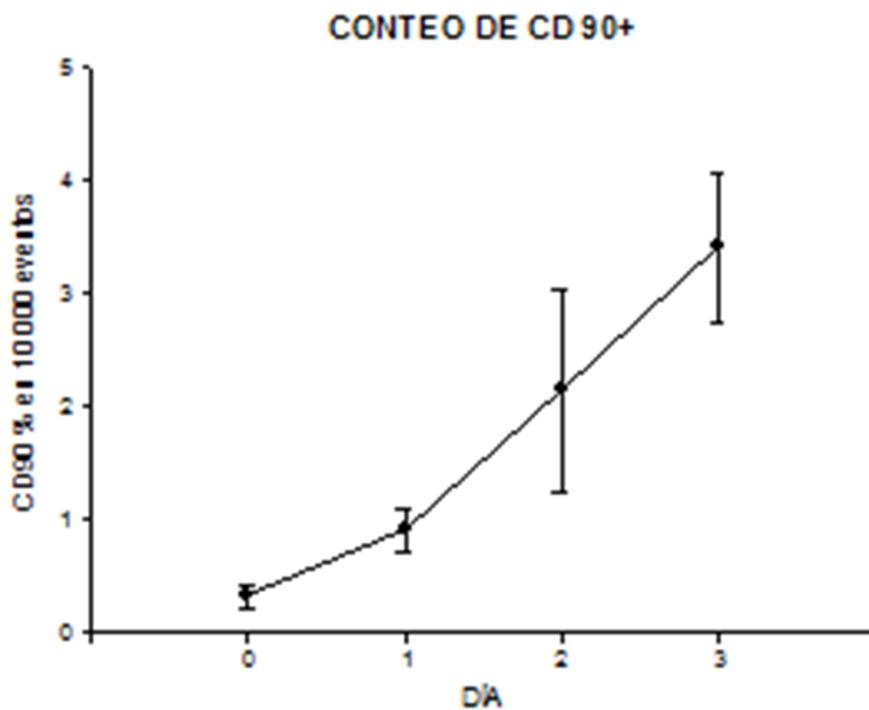


Gráfico 8. Elevación de células CD 90 en respuesta a la aplicación de filgrastim.  
Tabla 6. Células CD 90 aisladas posterior a la cosecha.

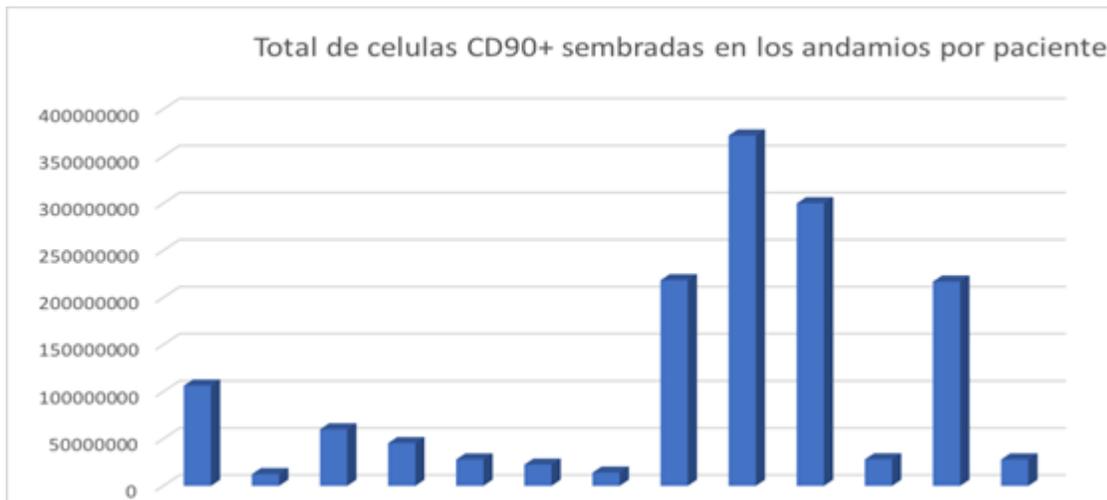


Tabla 7. El promedio de las células sembradas en los constructos por paciente fue de 77.2 millones

## DISCUSIÓN

Dentro de las lesiones articulares de rodilla en los pacientes de edad productiva, las lesiones condrales representan uno de los mayores retos terapéuticos ya que a pesar de los grandes avances en las técnicas quirúrgicas y una mayor comprensión de la anatomía y fisiología del cartílago articular, no existe a la fecha ninguna técnica de reparación condral que restablezca por completo la biomecánica normal de la articulación; sin embargo los avances en ingeniería de tejidos nos han permitido desarrollar técnicas de reparación condral que asemejan en gran medida al cartílago nativo como lo son las células troncales una vez diferenciadas hacia línea condral, lo

que permite a corto y mediano plazo el retorno de los pacientes a su estado funcional previo; sin embargo estas técnicas están confinadas a un sector pequeño de la sociedad ya que resultan procedimientos costosos que se realizan únicamente en centros altamente especializados además de requerir 2 intervenciones artroscópicas; por lo que si bien aún no parece posible generar idéntico al nativo; es de vital importancia apostar por técnicas que faciliten la reparación condral haciendo este procedimiento menos costoso, más simple y seguro de tal como se ha hecho en este trabajo en el cual se logra un gran avance al ser el primero en lograr la reparación condral a través de células troncales mesenquimales derivadas de sangre periférica.

Los resultados aportados por este trabajo muestran que el tiempo de relajación al año de seguimiento es de 35 milisegundos para el cartílago nativo y 45 milisegundos para el sitio reparado, sin embargo tendencia muestra una mejoría al disminuir el rango de diferencia entre el cartílago nativo y el sitio de reparación a lo largo del tiempo, por lo que habrá que continuar el seguimiento para observar el comportamiento a través del tiempo y evaluar la tendencia de los tiempos de relajación hasta que estos alcancen una meseta en la gráfica y por cuanto tiempo esta gráfica se mantiene, por otro lado los tiempos de relajación alcanzados a un año son similares a los reportados en los estudios previos realizados en el INRLGII tanto para microfracturas como implante autólogo de condrocitos con lo cual se demuestra que el tratamiento a corto plazo puede considerarse exitoso y habrá que esperar la evolución del tiempo para determinar el comportamiento a largo plazo.

Las células troncales mesenquimales son sin duda una excelente opción para el tratamiento de las lesiones condrales; en este trabajo se presenta el único estudio a la fecha que utilice células troncales mesenquimales movilizadas de sangre periférica para la reparación condral, demostrando que esta técnica es viable al permitir la diferenciación condral in vitro, segura al reportarse únicamente efectos adversos menores y menos costosa al evitar un segundo tiempo quirúrgico; sin embargo se requiere de una mayor seguimiento para poder establecer que los buenos resultados se mantienen a mediano y largo plazo.

## **CONCLUSIÓN.**

Es viable obtener células troncales mesenquimales derivadas de sangre periférica para su diferenciación hacia línea condral.

Los estudios a 12 meses muestran buenos resultados clínicos y de imagen.

La tendencia en los resultados preliminares muestra mejoría clínica progresiva clínica alcanzando niveles funcionales similares a los previos a la lesión, sin embargo los.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Ahmed N, Gan L, Nagy A, Zheng J, Wang Ch. Cartilage Tissue Formation Using Redifferentiated Passaged Chondrocytes *In Vitro*. *Tissue Engineering* 2009; 15 (3): 665-674.
2. Poole R, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M and Lavery S. Cartilage Biology. Composition and Structure of Articular Cartilage. A Template for Tissue Repair. *Clin Orthop and Rel Res* 2001; 391S: S26-S33.
3. Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH. The Chondrocyte: Biology and Clinical Application. *Tissue Engineering* 2006; 12(7): 1972-86.
4. Freyria AM, Mallen-Gerin F. Chondrocytes in adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Int J. Care Injured* 2011; 5(35): 1-7.
5. Ibarra C, Garcíadiego D, Martínez V, Velasquillo C. Ingeniería de Tejidos y Osteoartritis. *Reumatol Clin* 2007; 3(3): 19-22.
6. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J of Orthopedic Research* 2005; 23: 425-432.
7. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials* 2005; 9: 23-32.
8. Darling EM, Pritchett PE, Evans BA, Superfine R and Zauscher S. Mechanical properties and gene expression of chondrocyte on micropatterned substrates following dedifferentiation in monolayer. *Cell Mol Bioeng* 2009; 2(3): 395-404.

9. Dehne T, Schenk R, Perka C, Morawietz L, Pruss A, Sittinger M et al. Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene* 2010; 462: 8-17.
  
10. Safran MR, Seiber K. The Evidence for Surgical Repair of Articular Cartilage in the Knee. *JAAOS* 2010; 18(5): 259-266.
  
11. Brittberg M. Cell Carriers as the Next Generation of Cell Therapy for Cartilage Repair: A Review of the Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation Procedure. *Am J Sports Med* 2009; 38: 1259-1271.