



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”

***TRASPLANTE ALOGÉNICO DE CONDROCITOS CON ANDAMIOS DE MATRIZ ÓSEA
DESMINERALIZADA PARA LA FORMACIÓN DE TEJIDO CONDRAL***

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA:
JONATAN DE JESÚS HERNÁNDEZ LEÓN**

**TUTOR PRINCIPAL
DRA. ANELL OLIVOS MEZA**
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”

**COMITÉ TUTOR
DR. CARLOS LANDA SOLIS**
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”

DRA. VERÓNICA F. MORÁN BARROSO
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO “DR. EDUARDO LICEAGA”

**RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA
DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO**
INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN “LUIS GUILLERMO IBARRA IBARRA”

CIUDAD DE MÉXICO, ENERO, 2022





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.

DRA. ANELL OLIVOS MEZA

TUTOR PRINCIPAL

ORTOPEDISTA – ARTROSCOPISTA – DOCTORA EN CIENCIAS, UNAM
ADSCRITA AL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO, UNAM
PROFESOR TITULAR DEL ALTA ESPECIALIDAD EN ARTROSCOPIA Y LESIONES
DEPORTIVAS, INR-UNAM
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE ORTOPEDIA DEL DEPORTE Y ARTROSCOPIA, INR
ENCARGADA DE LA SUBJEFATURA DEL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA, INR

DR. EN C. CARLOS LANDA SOLIS

COMITÉ TUTOR – ASESOR METODOLÓGICO

DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS, UNAM
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS "D",
UNIDAD DE INGENIERÍA DE TEJIDOS Y MEDICINA REGENERATIVA - INR

DRA. VERÓNICA F. MORÁN BARROSO

COMITÉ TUTOR

DRA. EN GENÉTICA, UNIVERSIDAD DE EDIMBURGO, ESCOCIA
INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS "C"
JEFE DEL SERVICIO DE GENÉTICA - HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO
DR. EDUARDO LICEAGA

MTRO. SAÚL RENÁN LEÓN HERNÁNDEZ
ASESOR METODOLÓGICO
EPIDEMIÓLOGO – MAESTRO EN MEDICINA SOCIAL, IPN
JEFE DE LA UNIDAD DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN, INR

DRA. EN C. MARÍA DEL ROCÍO AGUILAR GAYTÁN
ASESORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS, UNAM
AYUDANTE DE INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS "C",
UNIDAD DE INGENIERÍA DE TEJIDOS Y MEDICINA REGENERATIVA - INR

DR. ALBERTO HIDALGO BRAVO
RESPONSABLE DE LA ENTIDAD ACADÉMICA
GENETISTA – DOCTOR EN CIENCIAS, UNAM
ADSCRITO AL PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO, UNAM
PROFESOR DE LA ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA, INR-UNAM
MÉDICO ADSCRITO AL SERVICIO DE GENÉTICA Y MEDICINA GENÓMICA, INR

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy especial en nombre de los miembros de esta investigación a:

Dr. Gustavo Jesús Vázquez Zapien

*Jefe de la Sección de Laboratorios
Jefe de la Subsección de Embriología
Escuela Militar de Medicina - SEDENA*

Dra. Mónica Maribel Mata Miranda

*Jefa de la Sección de Investigación y Doctrina Militar
Jefa Subsección de Biología Celular y Tisular
Escuela Militar de Medicina - SEDENA*

Dr. Alejandro Camacho Ibarra

*Jefe del Bioterio
Escuela Militar de Medicina – SEDENA*

Dr. Raúl Pichardo Bahena

*Jefe del Laboratorio de Anatomía Patológica y Microscopía Electrónica
Instituto Nacional de Rehabilitación “LGII”*

Enrique Gómez Orozco

*Histotecnólogo del Laboratorio de Anatomía Patológica
Instituto Nacional de Rehabilitación “LGII”*

Dr. Víctor Hugo Cárdenas Soria

*Alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Médicas
Instituto Nacional de Rehabilitación “LGII”*

Quienes, sin su valorable aportación, esta investigación no se habría realizado.

¡Muchas gracias!

De la misma forma, agradezco a mi padre, Felipe Hernández, por enseñarme el poder de la perseverancia. A mi madre, Irma León, quien me ha enseñado la bondad, el amor y la compasión en su máximo esplendor. A mis abuelas Felipa Ceballos e Isabel Báez, de quienes he aprendido lo que es el amor incondicional hacia sus hijos y nietos. A Lizette Ortega Urbina, mi compañera incondicional quien me ha acompañado en las buenas y en las malas. Gracias por todo tu apoyo y amor.

A mis maestros, quienes han aportado día a día un granito de arena en mi proceso de formación profesional y personal. Gracias por todas sus enseñanzas.

Contenido

RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	7
MARCO TEÓRICO	9
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	12
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVO GENERAL	12
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
HIPÓTESIS	13
MATERIAL Y MÉTODOS	13
<i>Diseño del Estudio</i>	13
<i>Criterios de Selección de los Sujetos de Estudio</i>	13
<i>Tamaño de muestra</i>	13
<i>Adquisición de Sujetos de Estudio</i>	13
<i>Conejo Donador y Cultivo de Condrocitos</i>	14
<i>Preparación del Implante de MOD + Condrocitos</i>	16
<i>Cultivo in vivo en un modelo animal de conejo</i>	18
<i>Obtención de las muestras</i>	19
<i>Análisis Macroscópico</i>	20
<i>Análisis Microscópico</i>	20
<i>Inmunofluorescencia Indirecta</i>	20
<i>Aislamiento de RNA</i>	22
<i>Expresión génica por Reacción en Cadena de la Polimerasa</i>	24
<i>Análisis Estadístico</i>	26
RESULTADOS	27
<i>Valoración Macroscópica</i>	27
<i>Valoración Microscópica</i>	28
<i>Inmunofluorescencia Indirecta</i>	30
<i>Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final</i>	32
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	36
ANEXOS	38
BIBLIOGRAFÍA	41

1. RESUMEN

Trasplante alogénico de condrocitos con andamios de matriz ósea desmineralizada para la formación de tejido condral

Propósito: los andamios utilizados en el implante autólogo de condrocitos son de un costo muy elevado, por lo que no es una técnica completamente accesible para los países en vías de desarrollo. Algunos estudios han reportado la formación de cartílago hialino, así como la expresión de marcadores moleculares específicos de este tejido al sembrar células troncales mesenquimales o condrocitos en un andamio de Matriz Ósea Desmineralizada (MOD). Por lo cual evaluamos la calidad de este tejido condral neoformado, mediante histología y técnicas moleculares.

Material y Métodos: de un conejo donador se aislaron y cultivaron condrocitos; se sembraron *in vitro* en andamios de MOD más quitosán, que se cultivaron *in vivo* en lesiones condrales de rodillas de 5 conejos de estudio y un control durante 12 semanas. Posteriormente, se analizaron las muestras histológicamente con la escala de O'Driscoll modificada, mediante PCR de punto final y por inmunofluorescencia en busca de marcadores moleculares propios de cartílago hialino para valorar su potencial condrogénico.

Resultados: por medio de la escala ICRS-CRA, se encontró un tejido idéntico al cartílago hialino (tejido normal) en el 20 % de los sujetos y en el 80 % restante la formación de un tejido muy similar al cartílago hialino (casi normal); contrario a esto en el control se encontró un tejido con grietas, integrado parcialmente e irregular (anormal). Histológicamente se constató la presencia de glucosaminoglicanos en el tejido neoformado por medio de las tinciones de Safranina O y Azul Alciano. Con el O'Driscoll, se encontró un tejido muy similar al cartílago hialino, con una matriz extracelular organizada sobre la zona del defecto, con presencia de alta celularidad, ligeramente desorganizada, correspondiente a condrocitos, integrado la mayoría al cartílago nativo. 80 % de los conejos tuvieron un tejido similar a cartílago; en cambio, el control tuvo 0 puntos equivalente a tejido fibroso anormal. En la inmunofluorescencia encontramos en los sujetos con MOD + condrocitos, la expresión de Colágeno tipo II, Agrecano, Sox-9, muy similar al cartílago nativo. En el conejo sin tratamiento se expresaron principalmente Runx2 y Colágeno tipo I. Por RT-PCR de punto final se constató la presencia de los genes *Col1a2*, *Col2a1*, *Acan*, *Sox9* y *Gapdh* en todas las muestras.

Conclusiones: El andamio de MOD es una opción con suficiente potencial condrogénico para la formación de cartílago hialino, que puede volver al implante de condrocitos una técnica accesible a la población de países en vías de desarrollo.

2. INTRODUCCIÓN

Las lesiones condrales son un problema de salud muy frecuente y de gran relevancia, no solo por la incapacidad funcional que provocan en el momento, sino porque predisponen al desarrollo precoz de enfermedad articular degenerativa u osteoartrosis.^{1,2}

El cartílago que recubre las superficies articulares es de tipo hialino. La unidad celular funcional de este cartílago es el condrocito. Estos condrocitos corresponden al 2 % del peso total del cartílago articular; el resto está integrado por una matriz extracelular (MEC) compuesta de agua en un 75 %, fibras de colágeno en un 15 % y proteoglicanos en un 10 %. El origen embrionario del cartílago articular deriva del mesodermo, a partir del cual se forman todos los tejidos conectivos del sistema musculoesquelético (cartílago, hueso y músculo). Gran parte de la embriogénesis

recae en la diferenciación de las células troncales mesenquimales (CTM) residentes hacia el linaje celular requerido. La condrogénesis es un proceso de diferenciación coordinada en el cual las CTM se condensan y se diferencian a condrocitos. SOX-9 es el factor de transcripción clave en la diferenciación de los condrocitos que activa la expresión de diversos genes específicos como *COL2A1*, *ACAN* y *COMP*. Los condrocitos diferenciados expresan principalmente las proteínas COLÁGENO II, AGRECANO y PROTEÍNA OLIGOMÉRICA DE MATRIZ; componentes esenciales de la MEC del cartílago hialino, los cuales le confieren las propiedades biomecánicas características de este tejido.³ Los condrocitos son los únicos responsables del mantenimiento del cartílago articular a través de un equilibrio entre la síntesis y la degradación de las macromoléculas de la MEC.

Debido a la poca celularidad y las específicas propiedades bioquímicas del cartílago, el potencial de auto reparación de este tejido es muy limitado, volviéndose uno de los más frecuentes problemas encontrados en el área de la ortopedia⁴. Se han tenido que tratar las lesiones cartilaginosas con diversas técnicas estándar; sin embargo, ninguno de estos procedimientos actualmente disponibles provee de un tejido con las propiedades biomecánicas y bioquímicas del cartílago nativo.^{4,5}

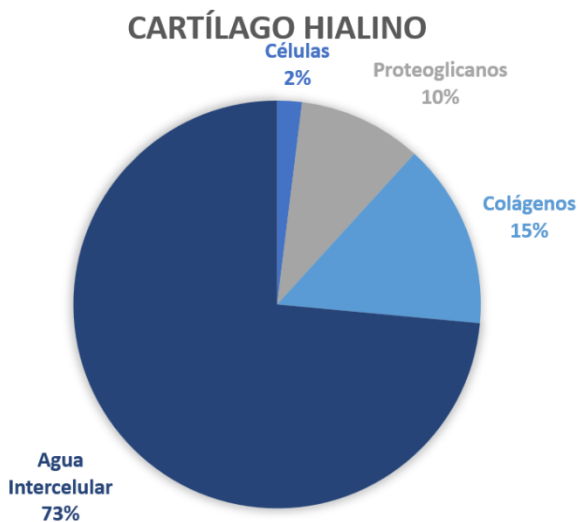


Figura 1: Composición molecular del Cartílago Hialino.

Por lo antes comentado, se han desarrollado técnicas en el campo de la ingeniería de tejidos, terapia celular y medicina regenerativa para intentar hacer una transición en el campo de la ortopedia, predominantemente de cirugía de remplazo y reconstrucción, hacia la bio-regeneración y la prevención.⁶ Ibarra y cols.⁷ en su artículo de revisión nos hablan sobre la evolución en el campo de la reparación del tejido articular: las técnicas de tratamiento incluyen la estimulación de la médula ósea (micro y nano fracturas), traslado osteocondral e implante de autólogo de condrocitos (ACI, por sus siglas en inglés). Esta última ha ido evolucionando y se ha dividido en diversas generaciones: la 1ª generación con uso de parche de periostio autólogo; en la 2da generación se implementa el uso de membranas sintéticas para cubrir el lecho de la lesión reduciendo con esto el riesgo de hipertrofia del tejido de reparación; mientras que en la 3era generación se utilizan andamios tridimensionales o matrices en donde los condrocitos son sembrados directamente, lo que promueve la preservación de la morfología celular y la síntesis de matriz característica del cartílago hialino.

En el contexto de la 3era generación, se han realizado múltiples estudios sobre el uso de andamios enriquecidos directamente con condrocitos⁸⁻¹¹ o CTM con el potencial de diferenciarse a condrocitos.^{5,6,12-14}

Recientemente se ha evaluado el uso de la matriz ósea desmineralizada (MOD), no solo su aplicación en la consolidación ósea,¹⁵⁻²⁶ sino también su aplicación como andamio para el desarrollo de otros tejidos como fibrocartílago o cartílago articular. Como andamio nos referimos a una estructura temporal, tridimensional que facilite la invasión de células para su diferenciación y expresión, lo cual permita obtener un tejido lo más similar al nativo.



Figura 2. Andamio de Matriz Ósea Desmineralizada Biosponge®.

Uno de los andamios de MOD disponible en México es Biosponge® (BioGraft®, Cd Mx, México) proveniente de donante cadavérico, el cual se somete a un proceso de desmineralización, liofilizado y radiación con lo cual se logra la eliminación de células, con la preservación de la microarquitectura formada por colágeno tipo I y II, así como de otras moléculas como las proteínas no colágenas y proteínas morfogénicas óseas (BMPs, por sus siglas en inglés). Se encuentra en presentaciones de 10x10 mm, 15x15 mm y 10x25 mm. Es un bioimplante compresible, con memoria plástica, que al absorber líquido se vuelve maleable, se adhiere al sitio quirúrgico y se ajusta a cualquier espacio. Tiene propiedades osteoinductoras, gracias a la

persistencia de BMPs que estimulan a las células troncales para diferenciarse a células óseas; y osteoconductoras por su estructura trabecular, la cual permite que sus poros sean invadidos por células y tejido neovascular, que estimula la proliferación y diferenciación celular. Dentro de sus aplicaciones encontramos: defectos óseos secundarios a fractura, osteomielitis o tumor, pérdida ósea en artroplastias de revisión, artrodesis, pseudoartrosis, osteotomías o como injerto en fracturas por compresión.²⁵

3. MARCO TEÓRICO

Chen y cols. en su artículo de revisión sobre los andamios de MOD, menciona la popularidad de éstos, ya que esta matriz extracelular puede proveer un apropiado microambiente celular para algunos tipos de células troncales,^{20,27} además de su falta de inmunogenicidad en el tejido hospedero.²⁸ La microarquitectura del hueso proporciona el soporte mecánico para facilitar la infiltración celular al interior del andamio. El descarte de las células y la extracción del DNA de la matriz ósea natural son fundamentales para prevenir las reacciones inmunitarias.^{20,29}

Se han llevado a cabo varios estudios sobre la aplicación de los andamios de MOD en la mejora de la curación de la interfaz tendón-hueso; más en específico, de la entesis del manguito rotador, del tendón patelar y en la reconstrucción de ligamento cruzado anterior,³⁰⁻³⁴ con resultados prometedores del uso de MOD como biomaterial, porque provee de un andamio de proteínas con su propio suministro de factores de crecimiento.

Más en específico se han realizado estudios que evalúan el potencial de los andamios de MOD, enriquecidos con células con potencial condrogénico, en la regeneración de cartílago articular.

Wang y cols.³⁵ cultivaron condrocitos de conejo en un andamio híbrido de MOD/fibrina *in vitro*, donde el tejido que creció fue caracterizado por histología, inmunohistoquímica, microscopía electrónica, pruebas bioquímicas y análisis de expresión de genes por PCR en tiempo real. Se observó en la tinción de Hematoxilina-Eosina una microarquitectura similar al tejido condral; la presencia de proteoglicanos fue confirmada con tinciones fuertemente positivas de Azul de Toluidina y Azul de Alciano; el Colágeno tipo II exhibió intensa inmunopositividad en la matriz pericelular; las propiedades condrogénicas fueron demostradas por la expresión de genes específicos de cartílago como *Col2a1* y *Acan*. Concluyen que los andamios de MOD/fibrina pueden servir como un potencial vehículo para la entrega celular y base estructural para la ingeniería de tejido condral.

Meng y cols.³⁶ construyeron un andamio compuesto de MOD modificada con péptido de afinidad E7 para CTM e hidrogel de quitosán (MOD-E7/HC) el cual es moldeable, con adecuadas propiedades biomecánicas y una porosidad que proporciona un microentorno 3D que admite la adhesión y proliferación celular. Tras la siembra de CTM, derivadas de médula ósea de ratón, la proliferación celular y el análisis de DNA indicaron que el andamio promovió una adecuada supervivencia de las CTM; aumentó la producción de MEC y mejoró la capacidad de diferenciación condrogénica de las CTM *in vitro*, lo cual se corroboró con la expresión de marcadores específicos de cartílago (expresión de los genes *Acan* y *Col2a1*). Además, después de 4 semanas de la implantación *in vivo* en ratones atímicos, el tejido formado mostró una buena estructura translúcida y cartilaginosa de forma macroscópica y al examen histológico, así como expresión en la inmunohistoquímica para Colágeno tipo 2. Ellos refieren que el andamio de MOD-E7/HC es una opción prometedora para reparar defectos irregulares de cartílago.

Man y cols.³⁷ en su estudio tuvieron como objetivo el trasplante de condrocitos alogénicos con un andamio híbrido de matriz ósea desmineralizada/hidrogel de quitosán (MOD/HC) para reparar una lesión condral de conejo con una intervención en un solo tiempo quirúrgico. El HC relleno los grandes poros de MOD lo que mejoró la distribución y adhesión de las células sembradas en el andamio, lo anterior se corroboró con ensayos vivo/muerto y cuantificando la cantidad de DNA y de MEC *in vitro*. Los condrocitos alogénicos en el andamio fueron trasplantados al conejo. Después de 24 semanas, se observó que se relleno con éxito el defecto condral como se demostró por resonancia magnética, dando una imagen isointensa al cartílago nativo; a la observación macroscópica presento un tejido semitransparente, con consistencia similar al cartílago hialino y sin bordes evidentes; el resultado histológico presento un grosor y apariencia similar al cartílago hialino; en la tinción inmunohistoquímica para Colágeno tipo II presento un grosor y tinción similar al cartílago adyacente; con respecto a sus propiedades biomecánicas se encontro un adecuado módulo de elasticidad y firmeza, determinado por nanoindentación; ninguna respuesta inflamatoria obvia fue observada; la expresión génica se evaluó por medio de micromatrices y PCR en tiempo real que mostraron la sobreexpresión de genes relacionados con la regeneración del cartílago como *Bmp-7*, *Hgf* e *Igf-1*. En consecuencia, concluyeron que el trasplante de condrocitos alogénicos con andamio HC/MOD reparó con éxito la lesión del cartílago de conejo en un solo tiempo.

Bo y cols.³⁸ evaluaron la MOD sembrada con condrocitos alogénicos de conejo. Aislaron condrocitos de un conejo macho Nueva Zelanda de un mes de edad para el cultivo primario.

Los condrocitos se sembraron en un andamio de MOD de conejo y se cultivaron *in vitro* 2 semanas. Se produjeron defectos osteocondrales de espesor total (3 mm de diámetro y profundidad) en los cóndilos femorales de 30 conejos Nueva Zelanda. Se tomaron muestras de tejido a los 1, 3 y 6 meses después de la implantación, para la observación macroscópica y el examen histológico, con azul de toluidina y tinción inmunohistoquímica para Colágeno tipo II. La MOD comenzó a degradarse alrededor de un mes después de la implantación y se absorbió totalmente a los 3 meses; a los 6 meses, los defectos se repararon mayormente con cartílago de tipo hialino, que estaba bien integrado al cartílago adyacente, sin límites claros y difíciles de reconocer. Ellos concluyen que la MOD es un buen material de andamiaje para la reparación de cartílago con ingeniería tisular y que la MOD sembrada con condrocitos cultivados puede reparar los defectos osteocondrales articulares al inducir la generación de cartílago hialino.

Zhao y cols.³⁹ estudiaron un andamio híbrido compuesto por microesferas de quitosán adicionadas con Proteína Morfogénica Ósea-2 (BMP-2) y Factor de Crecimiento Transformante beta-2 (TFG- β_2) sobre MOD, el cual fue adicionado con CTM periféricas en un modelo porcino. En la histología, inmunohistoquímica y con la escala de O'Driscoll encontraron que este andamio híbrido era superior en la formación de cartílago que usando estos componentes por separado.

Por su parte Olivos y cols.⁴⁰ observaron en experimentos *in vitro* que al sembrar CTM humanas en un andamio de MOD alogénico de cadáver se presentaron marcadores positivos para proteínas de cartílago hialino como: SOX-9, AGRECANO y COLÁGENO II. Además, la mayoría de las células analizadas con calceína eran viables y se unieron a la estructura de la MOD. Por lo que concluyen que el andamio de MOD promueve la diferenciación de las CTM hacia el linaje condral, con la expresión de proteínas propias de cartílago hialino, por lo que puede ser un andamio útil no solo para regenerar defectos óseos sino también para la ingeniería de tejido condral.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las lesiones de cartílago articular han sido reportadas en más del 60 % de los procedimientos artroscópicos de rodilla en pacientes jóvenes (20 - 40 años).⁴¹ Las lesiones al cartílago articular predisponen al desarrollo precoz de osteoartritis. La osteoartritis constituye, en la actualidad, un grave problema de salud pública con un costo económico y social elevado, siendo la segunda causa de discapacidad crónica, después de las enfermedades cardiovasculares.⁴²

A través de los años el implante autólogo de condrocitos se ha establecido como una técnica eficaz de tratamiento con durabilidad de efectividad promedio de 20 años, sin embargo, los andamios que se utilizan actualmente para estos procedimientos son de costo elevado al ser elaborados en el extranjero y solo por algunas empresas. Por lo anterior, no es una técnica totalmente accesible a nuestra población, haciendo necesaria la búsqueda de alternativas similares o mejores a las que podamos acceder con más facilidad.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la capacidad condrogénica de los andamios de Matriz Ósea Desmineralizada al implantarse con condrocitos alogénicos en lesiones osteocondrales en conejos a 12 semanas de seguimiento?

6. JUSTIFICACIÓN

El *gold standard* para el tratamiento de las lesiones condrales focalizadas en pacientes jóvenes a nivel mundial es el implante autólogo de condrocitos, en el cual se utilizan andamios sintéticos para crear un ambiente tridimensional, que contenga a los condrocitos y promover la formación de cartílago parecido al hialino; sin embargo, los costos de los andamios utilizados son elevados y poco accesibles en países en desarrollo. Los andamios de MOD han sido escasamente estudiados en la regeneración condral; sin embargo, se han encontrado resultados consistentes de su potencial condrogénico al enriquecerlos con células de linaje condral.³⁵⁻³⁹

En México, desde hace algunos años contamos con un andamio de MOD biocompatible, el cual se encuentra aprobado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y con un coste menor a los andamios comerciales extranjeros que se usan para la reparación condral. Estudios preliminares *in vitro* en nuestro instituto han reportado la expresión de marcadores de cartílago (SOX-9, AGRECANO y GOLÁGENO II) al sembrar CTM en un andamio de MOD (Biosponge®), pero se requiere realizar un análisis *in vivo* de este tipo de andamios enriquecidos con células de linaje condral, para así valorar su potencial condrogénico.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar en un modelo animal la calidad del tejido de reparación formado en lesiones osteocondrales tratadas con un andamio de MOD con condrocitos.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En el tejido neoformado de rodillas de conejos posterior a 12 semanas de tratamiento evaluaremos:

- El aspecto macroscópico del tejido con la escala de Evaluación de Reparación de Cartílago de la Sociedad Internacional de Regeneración de Cartílago (ICRS-CRA, por sus siglas en inglés)
- La expresión de genes de cartílago hialino (*Sox-9*, *Col2a1*, *Acan*) por medio de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de punto final e inmunofluorescencia indirecta.
- La calidad histológica mediante la Escala de O'Driscoll Modificada.

9. HIPÓTESIS

Los andamios de Matriz Ósea Desmineralizada poseen capacidad condrogénica al enriquecerse con condrocitos alogénicos e implantarse en lesiones osteocondrales en conejos a 12 semanas de seguimiento.

10. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1. *Diseño del Estudio*

Estudio experimental en un modelo animal. (Flujograma en Anexo 1)

10.2. *Criterios de Selección de los Sujetos de Estudio*

Conejos raza *Nueva Zelanda*, machos, de 4 - 6 meses de edad y peso aproximado de 2 - 3kg.

10.3. *Tamaño de muestra*

1 conejo donador, 5 sujetos de estudio y 1 sujeto control

10.4. *Adquisición de Sujetos de Estudio*

El protocolo fue autorizado por la Subdirección de Investigación Biotecnológica, Servicio de Bioterio y Cirugía Experimental del Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra" (INR-LGII), con número de registro EP-BIO-01-18.

El animal donador de condrocitos fue adquirido en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus FES Cuautitlán. Se dejó en cuarentena antes de su intervención en el Bioterio del INR-LGII.

10.5. Conejo Donador y Cultivo de Condrocitos

Al cumplir con su periodo de cuarentena, este conejo donador fue sacrificado en el bioterio por medio de una sobredosis de pentobarbital sódico, auxiliado por el personal veterinario y apegándose a la NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio). Se realizó un lavado quirúrgico antiséptico con solución yodada a ambas extremidades posteriores, seguido de preparación del sitio quirúrgico con campos estériles. Se procedió a realizar abordaje anterior de rodilla, sin abrir la cápsula articular; se disecó tejido celular subcutáneo hasta observar el tendón cuadrícepital y el rotuliano a los cuales se les realizó tenotomía; posteriormente con ayuda de una sierra eléctrica se realiza osteotomía a nivel femoral y tibial, para poder obtener la articulación de la rodilla completa y con su cápsula íntegra. Se cubrieron las piezas quirúrgicas con envolturas estériles y se transportaron al laboratorio para su procesamiento.

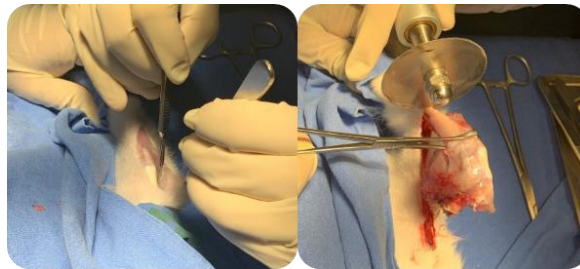


Figura 3. Abordaje anterior de rodilla y extracción completa de la articulación.

Se procesaron las rodillas donadoras dentro de la campana de flujo laminar; bajo condiciones estériles y con ayuda de bisturí, se realizó una capsulectomía para obtener por separado las tibias y los fémures. Se procedió a realizar la resección del cartílago hialino de las superficies articulares de los 4 huesos donadores, con ayuda de una hoja de bisturí, obteniéndose finas láminas de cartílago articular las cuales se fueron colocando en una caja de Petri; dentro de esta caja, se realizó una disgregación mecánica con ayuda de otra hoja de bisturí, obteniéndose una muestra de múltiples fragmentos de cartílago de aproximadamente 1 mm.



Figura 4. Capsulectomía y resección de cartílago de manera estéril.

A esta muestra se le realizó un proceso de lavado con búfer de fosfatos salino (PBS, por sus siglas en inglés) suplementado con 1 % de antibiótico/antimicótico (1000 unidades/ml de penicilina, 1000 µg/ml de estreptomicina y 2.5 µg/ml de anfotericina B; GIBCO Invitrogen®, Carlsbad, CA, EEUU), para luego realizar un cultivo por explante en cajas de cultivo de 12.5 cm² usando medio de cultivo completo (DMEM con alta glucosa [Dulbecco's modified Eagle's medium; GIBCO Invitrogen®, Carlsbad, CA, EEUU] + 10 % de suero humano heterólogo inactivado + 1 % de antibiótico/antimicótico); se mantuvieron en una incubadora a 37 °C, con 5 % de CO₂ y humedad al 5 %; se realizaron cambios de medio de cultivo cada 2 días hasta alcanzar el 90 % de confluencia en los cultivos, valorado por microscopia óptica de campo claro (1er paso).



Figura. 6. Cultivo de cartílago por explante.

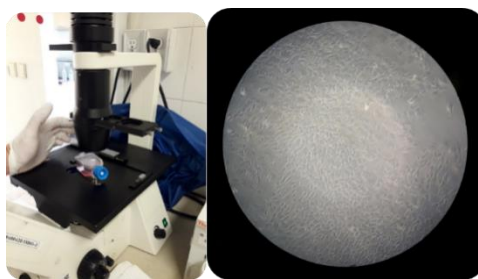


Figura 5. Confluencia del 90% en el cultivo.

A las 2 semanas se trasladaron a cajas de 165 cm², para lo cual se inició con el proceso de desprendimiento celular con tripsina-EDTA 0.25 % (GIBCO Invitrogen®, Carlsbad, CA, EEUU): se retiró el medio de cultivo, luego se lavó la caja con 2 ml de PBS y se retiró; se aplicó 1 ml de tripsina al 0.25 %, seguido del uso de agitador orbital a 37 °C durante 5 minutos; después de ese tiempo se agregaron 2 ml de medio de cultivo completo para neutralizar la tripsina; se tomó todo el contenido de la caja (3 ml) y se colocó en un tubo de 15 ml; se centrifugó a 1500 rpm para recuperar un “botón celular” y retirar la tripsina. Este botón celular se completó con 15 ml de medio de cultivo completo en las cajas de cultivo, siendo cultivadas en las mismas condiciones que el explante.

A las 3 semanas se decidió preparar un implante de MOD, para lo cual se inició nuevamente con el proceso de desprendimiento celular con tripsina-EDTA 0.25 % (tripsinización): se retiró el medio de cultivo, luego se lavó la caja con 10 ml de PBS y se retiró; se aplicaron 10 ml de tripsina al 0.25 %, seguido del uso de agitador orbital a 37 °C durante 5 minutos; se agregaron 20 ml de medio de cultivo completo para neutralizar la tripsina; se tomó el contenido de la caja y se colocó todo (30 ml) en un tubo de 50 ml; se tomaron 10 µl de la suspensión para conteo celular; se centrifugó a 1500 rpm para recuperar un botón celular

y retirar la tripsina. Este botón se completó en el tubo con 50 ml de medio de cultivo completo.

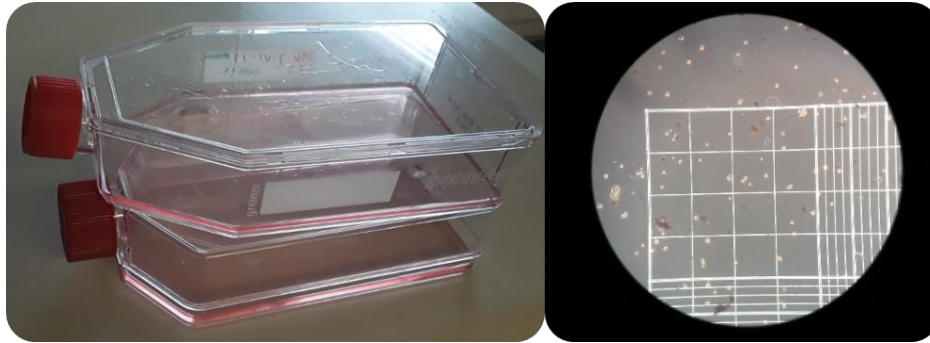


Figura 7. Tripsinización del cultivo y conteo celular en cámara de Neubauer.

La muestra de 10 μ l se tiñó con 10 μ l de azul tripán y se contabilizó el número celular en una cámara de Neubauer, obteniéndose una cuenta de 14,500,000 células, de las cuales se tomó una alícuota de aproximadamente 2,200,000 condrocitos para preparar un implante y hacer pruebas de viabilidad celular; a los 12 millones restantes se les procedió a criopreservar en alícuotas de 1 millón de células en crioviales de 2 ml suspendidos en suero fetal bovino inactivado suplementados con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), que posteriormente se guardaron en nitrógeno líquido.

10.6. Preparación del Implante de MOD + Condrocitos

La alícuota para preparar el implante de prueba se colocó en un tubo y se centrifugó a 1500 rpm durante 13 minutos; se decantó el medio y se agregaron 12 μ g de quitosán (para mejorar el manejo y la adherencia de las células al andamio); se homogenizaron en un agitador vórtex y se volvieron a centrifugar bajo las mismas condiciones. Posteriormente, se retiró el exceso de medio para dejar un botón de células y con una micropipeta de 1000 μ l se tomó el botón celular y se colocó sobre el andamio de MOD, previamente cortado con una medida final de 6 x 15 mm. El andamio con células se colocó en una placa de cultivo de 6 pozos. Con ayuda de una aguja estéril y la punta de la micropipeta se distendió el botón celular en la cara superior del andamio y se agregó 1 ml de medio de cultivo completo en el pozo, esperando 5 minutos a que los condrocitos se esparcieran en el andamio; luego se agregó otro mililitro, esperando 5 minutos a que el andamio absorbiera las células y el medio; finalmente, se llevó el medio de cultivo hasta el límite superior del andamio, se cerró la placa y se dejó cultivar en una incubadora de CO₂, bajo las mismas especificaciones previamente comentadas.

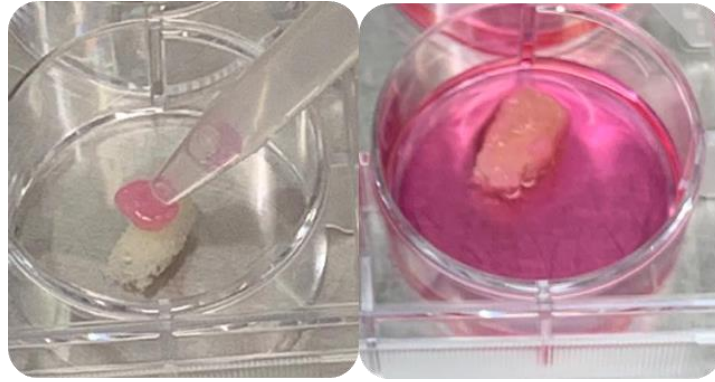


Figura 9. Preparación del andamio de MOD con implante de condrocitos.

Después de 2 días de cultivo de las células en el andamio, se procedió a realizar la prueba de viabilidad celular con calceína. La calceína se usa como agente de tinción celular. El derivado acetoximetilado, la calceína AM (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EEUU) que no es fluorescente, es absorbida por las células vivas siendo transportado a través de la membrana celular. La actividad de las enzimas esterasas transforma la calceína AM en calceína que sí es fuertemente fluorescente. Siendo las esterasas únicamente activas en las células vivas, el uso de la calceína AM permite la distinción del tejido vivo del muerto,⁴³ por medio de su observación con un microscopio de fluorescencia equipado con una lámpara de vapor de mercurio 100 W y un filtro óptico de fluoresceína de paso largo (488 nm). Se sacó la placa de la incubadora y se retiró el medio de cultivo; se colocaron 2 ml de medio de DMEM sin suplementar y se agregaron 2 μ l de calceína a una concentración de 1 mg/ml. Se dejó incubar el implante durante 40 min en la incubadora a 37 °C, después se retiró el medio y se adicionaron 2 ml de medio completo. Se procedió a hacer la evaluación en el microscopio de fluorescencia, observándose la presencia de múltiples células vivas adheridas a las trabéculas del andamio.

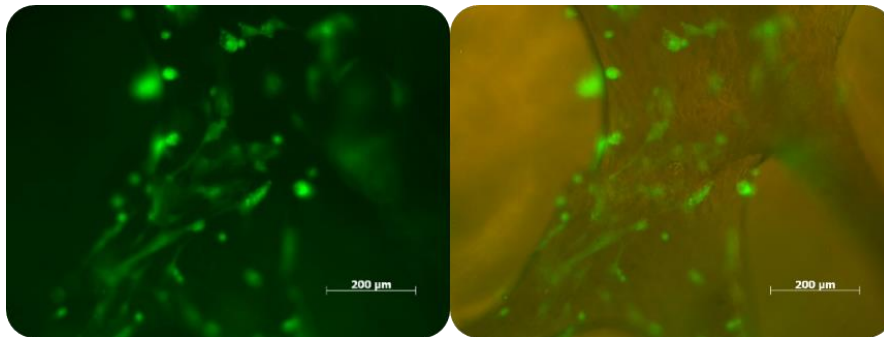


Figura 8. Pruebas de Viabilidad Celular y Adherencia con Calceína.

Posteriormente, se decidió preparar los andamios de MOD más chitosán, enriquecidos con condrocitos alogénicos de conejo, que se implantarían en los sujetos de estudio. Se obtuvieron condrocitos de las alícuotas criopreservadas, y por medio de la técnica ya descrita para el implante de prueba, se prepararon 6 andamios de MOD con 2.2 millones de condrocitos cada uno, los cuales se mantuvieron 2 días en incubación previo a su implantación en el modelo animal.

10.7. Cultivo *in vivo* en un modelo animal de conejo

El procedimiento quirúrgico a los 5 sujetos de estudio y al control, fue realizado bajo anestesia general, por medio de inducción anestésica con Butorfanol (0.1 mg/kg) y conducción con Ketamina-Xilacina (20-5 mg/kg) e Isoflurane (1% + O₂ a 2 L/min). Previo rasurado de los miembros pélvicos, se colocó el conejo en la mesa quirúrgica en decúbito supino, se realizó antisepsia y asepsia de ambas extremidades inferiores y se delimitaron



Figura 10. Realización de defecto osteocondral con ayuda de una sierra y osteotomo.

sitios quirúrgicos con campos estériles; se realizó abordaje anterior de rodilla derecha de 6 cm y se realizó capsulotomía parapatelar medial transvasto, con lo cual se evertió la patela hacia el lado lateral de la rodilla, obteniendo acceso total a los cóndilos femorales y tróclea. Luego, con la ayuda de una sierra eléctrica y osteotomos finos, se creó un defecto osteocondral de 5 mm de proximal a distal, abarcando todo el ancho de la tróclea y de una profundidad de 1 mm. Seguido, con ayuda de un perforador manual y una broca de 1.2 mm, se realizó un orificio en cada una de las esquinas del defecto para la posterior fijación del implante. Se obtuvo, bajo técnica estéril, uno de los andamios de MOD cultivados con condrocitos alogénicos de conejo; con ayuda de un bisturí se cortó al tamaño final dependiendo del tamaño del defecto y se colocó con ajuste a presión (*press fit*) dentro de éste; finalmente fue fijado con sutura vicryl 3-0 en las perforaciones previamente realizadas. Se redujo la patela y se suturó con vicryl a las partes blandas parapatelares mediales (cierre del aparato extensor); se corroboró adecuado recorrido patelar y se cerró la herida quirúrgica por planos. Se dejó el conejo a movilidad libre dentro de su jaula, con

Enrofloxacin (5 mg/kg cada 24 h) como antibiótico profiláctico y Butorfanol (0.5 mg/kg cada 8 h) más Meloxicam (0.1 mg/kg cada 24 h) como analgésicos durante 5 días. Se realizó el mismo procedimiento quirúrgico en el resto de los conejos de estudio. El conejo control, solamente se le realizó el defecto sin recibir tratamiento de reparación de la lesión condral.

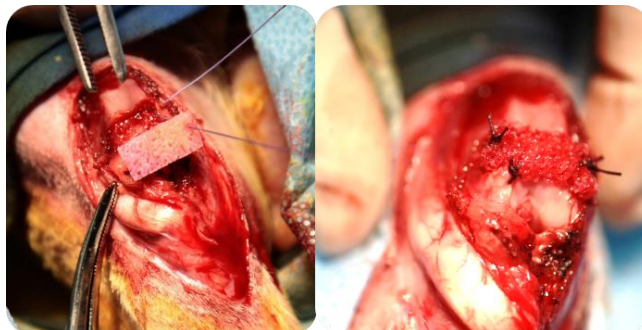


Figura 11. Colocación y fijación del implante.

Se mantuvieron los 6 conejos en observación durante 12 semanas, en jaulas especiales, con una vigilancia estrecha y un control adecuado de la temperatura ambiente, alimentación *ad libitum*, así como una evaluación clínica diaria de manera conjunta por parte del personal del bioterio y los médicos participantes en el protocolo.

10.8. Obtención de las muestras

Al cumplir las 12 semanas, se realizó el sacrificio de los animales de estudio de la misma forma que al conejo donador. De nuevo, en el quirófano de bioterio con el conejo en decúbito supino y con las medidas pertinentes de antisepsia y asepsia, se realiza el mismo abordaje de rodilla ya descrito, con eversión de la patela y exposición de los cóndilos. Observamos de manera macroscópica el tejido neoforado en la zona del defecto, el cual fue documentado con fotografía digital. Con ayuda de un bisturí, se obtuvo una pequeña muestra del tejido neoforado de uno de los cóndilos para su análisis por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Posteriormente, se realizó una osteotomía femoral para obtener el fémur distal completo y procesarlo para su análisis.

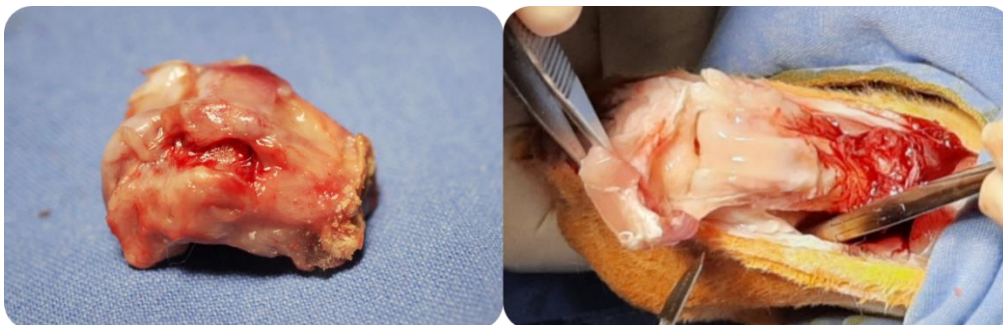


Figura 12. Obtención de muestras para análisis posterior a 12 semanas de cultivo *in vivo*.

10.9. Análisis Macroscópico

El análisis macroscópico fue realizado por 3 observadores independientes, ciegos a los resultados del resto de la investigación, por medio de la escala de Evaluación de Reparación de Cartílago de la Sociedad Internacional de Regeneración de Cartílago (ICRS-CRA, por sus siglas en inglés), la cual evalúa la altura del tejido neoformado, su integración a los bordes de cartílago nativo y su aspecto macroscópico. (Anexo 2)

10.10. Análisis Microscópico

Los cóndilos femorales fueron fijados en formol amortiguado al 10 % durante 48 h; se lavó con agua corriente y se dejaron 24 h en ácido clorhídrico al 20 % para su desmineralización y se lavaron en agua corriente con 10 g de detergente en polvo por 15 - 20 minutos. Las muestras fueron procesadas usando un equipo Histoquinete Microm STP 120 (Especialidades Médicas Myr, Tarragón, España), para los procesos de deshidratación e inclusión en parafina. Las condiciones fueron: formol al 10 % por 1 hora, alcohol al 50 % durante 1 hora, alcohol al 70 % por 1 hora, 3 pasos de alcohol del 96 % por 1 hora cada uno, 3 pasos de alcohol absoluto durante 1 hora cada paso. El aclaramiento se llevó a cabo por 2 pasos de xilol absoluto por 1 hora cada uno. La infiltración fue por medio de 2 pasos de parafina histológica a 56 °C por 1 hora cada paso. La inclusión se hizo en moldes para hacer los bloques. Se realizaron los cortes histológicos de 3 µm de espesor en un microtomo Leica RM2125 RTS (Leica Biosystems, Buffalo, IL, EEUU). Los cortes se extendieron en laminillas para su tinción con hematoxilina-eosina para valorar la morfología del tejido de reparación, así como azul alciano y safranina O para constatar la presencia de glicosaminoglicanos en el tejido y la observación de características específicas de cartílago hialino.

La valoración histológica se realizó por medio de la escala de O'Driscoll modificada,¹¹ (Anexo 3) la cual evalúa: morfología celular, intensidad de la tinción safranina O, hipocelularidad y posibilidad de identificar tejido similar al cartílago al microscopio. La puntuación más alta con esta escala es 14, que significa un tejido de reparación similar al cartílago; tejido con características más fibrosas tiene menor calificación, cercana al 0. A su vez, se confirmó la presencia de glicosaminoglicanos por medio de las tinciones de Safranina O y Azul Alciano.

10.11. Inmunofluorescencia Indirecta

Buscamos la presencia de marcadores específicos de cartílago hialino, fibrocartílago o hueso en el tejido de reparación por medio de inmunofluorescencia indirecta, para lo cual se realizaron cortes de los tejidos del bloque de parafina de 3 µm de espesor y se dejaron toda la noche en el horno a 37 °C. Los cortes se desparafinaron y rehidrataron mediante el

pasaje por xileno, graduaciones decrecientes de alcohol etílico y agua destilada; se realizó recuperación antigénica por calor a 92 °C durante 25 min en búfer citrato de sodio 0,01 M pH 6 en vaporera (10 min con EDTA-borato pH 9.0); se utilizó el kit BD Cytotfix/Cytoperm™ (Becton, Dickinson and Company BD Life Sciences-Biosciences, San Jose, CA, EEUU) para realizar la fijación y la permeabilización celular, aplicando 100 µl de la solución durante 20 minutos a 4 °C y posteriormente se hizo lavado con el búfer BD Perm/Wash™; se aplicó una solución de PBS + albúmina 1 % + tritón 0.3 % durante 20 minutos para bloquear sitios de unión inespecíficos, se lavó nuevamente y se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios a una concentración de 10:40 µL en búfer BD Perm/Wash™ a 4 °C durante la noche en una cámara húmeda en oscuridad usando los siguientes anticuerpos: anti-*Col1a1* monoclonal (Santa Cruz®, cat. sc-25974), anti-*Col2* policlonal (Abcam®, cat. ab34712), anti-*Sox9* policlonal (Santa Cruz®, cat. sc-20095), anti-*Runx2* monoclonal (Abcam®, cat. ab76956). Posteriormente, se lavaron 2 veces con búfer BD Perm/Wash™ y se incubaron ahora con los anticuerpos secundarios acoplados a isotiocianato de fluoresceína (FITC, por sus siglas en inglés) a una concentración de 1:50 µL a 37 °C durante 2 horas, usando los siguientes anticuerpos: anti-ratón IgG FITC (Thermo Scientific®, cat. F-2761), anti-conejo IgG FITC (Abcam®, cat. ab6717), anti-ratón IgG2a FITC (Abcam®, cat. ab97244); se lavó una vez más con búfer BD Perm/Wash™ para eliminar el exceso de anticuerpos secundarios. Finalmente, se montaron las laminillas con medio de montaje Vectashield® con DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol, Diclorhidrato) (Vector®, cat. H-1200) para su tinción nuclear. Las imágenes fueron capturadas en un microscopio Carl Zeiss® Axio Imager.A1 y procesadas para su análisis cuantitativo por el programa Image J® (NIH, National Institutes of Health, Bethesda, MD, EEUU).



Figura 13. Inmunofluorescencia Indirecta

10.12. **Aislamiento de RNA**

Durante el procedimiento quirúrgico de obtención de la pieza para análisis, se obtuvieron muestras del tejido neoformado fresco y de cartílago nativo sano, se congelaron en nitrógeno líquido y se procesaron inmediatamente para el aislamiento del RNA utilizando el método de TRIzol™ Reagent (tiocianato de guanidinio) (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EEUU) para su posterior análisis por PCR de punto final. El Trizol™ se utiliza durante el proceso de homogenización de muestras (células o tejidos) para desactivar las RNAsas por medio de la ruptura celular y la disolución de los componentes celulares con base en el método de aislamiento de RNA de un solo paso.⁴⁴ Se trabajaron todas las muestras obtenidas en una habitación con una temperatura entre 20 – 25 °C; bajo condiciones y técnica estériles.



Figura 14. Reactivo TRIzol™ y muestras en nitrógeno líquido

Las muestras de cartílago tuvieron un peso aproximado entre 50 - 100 mg y fueron trituradas con un mortero de porcelana previamente lavado con agua - DEPC y enfriado con nitrógeno líquido, en presencia de aproximadamente 1 ml de Trizol™. Las muestras que no se trituraron completamente fueron tratadas usando un homogenizador Polytron™ PT 2100 (Kinematica® Inc, Bohemia, NY, EEUU).



Figura 15. Homogenización de la muestra e inactivación de RNAsas con TRIzol™

Las muestras homogenizadas se colocaron en microtubos de 1.5 ml estériles y se dejaron incubar durante 5 minutos, para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas; pasado este tiempo se agregaron 0.2 ml de cloroformo (por cada ml de TRIzol™) y se cerró la tapa del microtubo para incubarse durante 2 - 3 minutos más, a temperatura ambiente; se centrifugó la muestra a 12,000 x g a 4 °C durante 15 minutos, con lo cual se obtuvieron diferentes fases: una inferior roja-orgánica (DNA), una interfase blanca (proteínas) y una superior acuosa (RNA).



Figura 16. Separación en Fases; Extracción/Precipitación del RNA; Resuspensión del RNA

Esta fase acuosa, conteniendo el RNA, se transfirió a un nuevo microtubo y se le agregó 0.5 ml de isopropanol (por cada ml de TRIzol™) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente; posteriormente se centrifugó a 12,000 x g a 4 °C durante 10 minutos y se formó un botón blanquecino-transparente por la precipitación del RNA; se descartó el sobrenadante con una micropipeta y se resuspendió el botón en 1 ml de etanol al 75 %-agua DEPC (por cada ml de TRIzol™). Se mezcló la muestra brevemente en un agitador vórtex y luego se centrifugó por 5 minutos a 7500 x g a 4 °C. Se descartó el sobrenadante con micropipeta; se secó al aire el sedimento de RNA durante 5 a 10 minutos y se resuspendió el botón en 20 - 50 µl de agua tratada con DEPC, pipeteando de arriba abajo muy suavemente; se incubó a una temperatura entre 55 – 60 °C durante 10 a 15 minutos, se dejó enfriar para su almacenamiento a -20 °C.

El RNA total extraído se cuantificó y se evaluó su pureza por medio del espectrofotómetro NanoDrop 2000™ (Thermo Fisher Scientific™, Wilmington, DE, EEUU), de acuerdo a la relación de absorbancia de 260/280 nm, lo que nos permitió escoger las muestras representativas con la mayor cantidad de RNA y con la mayor pureza de los sujetos de estudio y el control.



Figura 17. Espectrofotómetro NanoDrop 2000™

10.13. Expresión génica por Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se diseñaron los oligonucleótidos cebadores para conocer la expresión de los genes a estudiar en nuestras muestras (*Col1a2*, *Col2a1*, *Acan*, *Sox9* y *Gapdh* [gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa]), por medio de PCR de punto final, para la especie *Oryctolagus cuniculus* (conejo Nueva Zelanda). Con ayuda de la herramienta *Primer-Blast* del Centro Nacional para Información Biotecnológica de los EEUU (NCBI, por sus siglas en inglés), se diseñaron los oligonucleótidos para los genes de interés. Posteriormente, por medio del software *OligoAnalyzer™ Tool* (IDT, Integrated DNA Technologies, Inc.), se escogieron los cebadores más aceptables en secuencia y la temperatura idónea para disminuir la posibilidad de dimerización de estos. Finalmente, los cebadores fueron sintetizados por la empresa IDT con una pureza del 99%, quedando de la siguiente manera:

GEN	PRIMER	SECUENCIA	BASES	PRODUCTO DE PCR (PARES DE BASES)	T _m
<i>Col1a2</i>	Forward Primer	GCGAAAGAGGAGAAGGATTGA	21	434	54 °C
	Reverse Primer	AACCACACAACACAGAGGAG	20		
<i>Col2a1</i>	Forward Primer	CAACAGCAGGTTACCTATACC	22	410	55 °C
	Reverse Primer	GGA CT CAC ACC AG TT AG TT TCC	22		
<i>Acan</i>	Forward Primer	GCTCAGCATCCCCAGAAGTG	20	407	57 °C
	Reverse Primer	GTCACAGTACTCGCCAGTGT	20		
<i>Sox9</i>	Forward Primer	CCACCTCTCTTACCTCTCTCAT	22	459	55 °C
	Reverse Primer	AGGGCACACTGTTCAACTAC	20		
<i>Gapdh</i>	Forward Primer	CGACATCAAGAAGGTGGTGAA	21	372	55 °C
	Reverse Primer	CTGGGATGGAACTGTGAAGAG	22		

Tabla 1. Cebadores (primers) utilizados para la amplificación de los genes de interés.

Para conocer la expresión génica de nuestras muestras, se llevó a cabo la amplificación de los genes por la técnica de PCR de punto final. Se utilizó un kit RT-PCR SuperScript® III One-Step con ADN polimerasa Platinum® Taq (Invitrogen®, Carlsbad, CA, EEUU) lo cual nos ofreció una detección y análisis de punto final sensible y reproducible de moléculas de RNA mediante transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés), de las muestras de RNA previamente analizadas por espectrometría. Se seleccionó una muestra de cartílago sano, 2 de tejido neoformado en conejos tratados con el andamio de MOD con condrocitos y una del tejido formado en un conejo control al que solo se le hizo el defecto condral sin tratamiento.



Figura 18. Termociclador GeneAmp™ PCR System 9700

Se utilizó un termociclador GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, EEUU) en el cual se cargaron reacciones de 25 μ l para amplificar los genes *Col1a2*, *Col2a1*, *Acan*, *Sox9* y *Gapdh* (como gen constitutivo) para las muestras previamente comentadas. Cada reacción incluyó:

RNA total	1 μ l (100 ng)
Oligonucleótidos sentidos	1 μ l (5 pM)
Oligonucleótidos antisentido	1 μ l (5 pM)
Buffer 2x	12.6 μ l
Enzimas RT y Taq	0.5 μ l
H₂O DEPC	9 μ l
Total	25 μl

Las reacciones se “corrieron” bajo las siguientes condiciones:

RT	65 °C – 10 min
	55 °C – 30 min
PCR (40 ciclos)	94 °C – 5 min
	94 °C – 15 seg
	Tm* – 30 seg
Finalizar	72 °C – 30 seg
	72 °C – 10 min
	4 °C – ∞

* Esta temperatura varía según los oligonucleótidos usados. Ver Tabla 1.

Los genes amplificados se cargaron, junto con un marcador de peso molecular, en un gel de agarosa con bromuro de etidio, como agente fluorescente, para su caracterización y análisis en una cámara de electroforesis horizontal Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA, EEUU), para luego analizar las diferentes amplificaciones en un analizador de imágenes usando un transiluminador con luz ultravioleta y capturado por fotografía digital con un sistema de análisis de gel por luz Blanca/UV Alphamager 2200® (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, EEUU).



Figura 19. Electroforesis en Gel de Agarosa y revelado con luz ultravioleta

10.14. Análisis Estadístico

La información recolectada fue analizada con el software IBM SPSS Statistics® versión 22.0 (IBM®, Armonk, NY, EU). Las variables cuantitativas se describieron como medias, mientras que las variables cualitativas se describieron como porcentajes. Para analizar en qué medida se ajustan los datos observados a una distribución teórica se realizó la prueba de bondad de ajuste de chi cuadrada. Para el cálculo del coeficiente de correlación se utilizó rho de Spearman.

11. RESULTADOS

11.1. Valoración Macroscópica

Por medio de la escala ICRS-CRA se evaluaron los 5 sujetos de estudio y el sujeto control. Se encontró, en un conejo experimental (20 %) un tejido idéntico al cartílago hialino (tejido normal) y en los otros 4 restantes (80 %) la formación de un tejido muy similar al cartílago hialino (casi normal), caracterizado por un tejido de reparación de aspecto liso y suave, al mismo nivel que el cartílago nativo y con una adecuada integración a este mismo; contrario a esto en el conejo control se encontró un tejido con grietas, integrado solo parcialmente e irregular en su profundidad de reparación (anormal), como podemos observar en la Tabla 2.

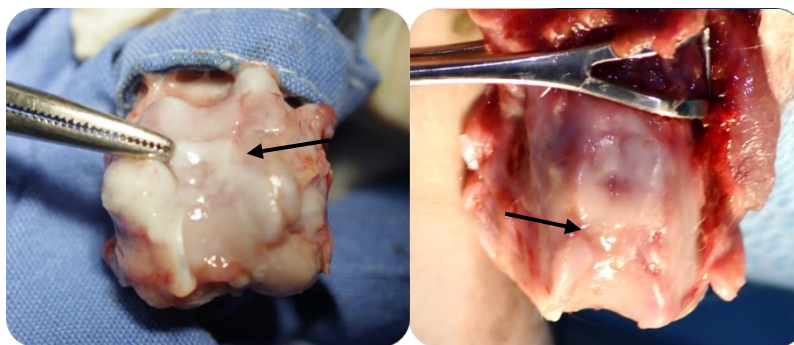


Figura 20. Izquierda: Cartílago neoformado (flecha) en rodilla a la que se realizó implante de condrocitos con MOD. Derecha: Reparación parcial (flecha) en rodilla a la que solo se realizó el defecto condral sin tratamiento.

Tabla 2. Evaluación Macroscópica con la Escala ICRS - CRA

	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	Promedio Grupo Estudio	Conejo Control
Grado de Reparación	2.6	2.3	3	3.6	3.6	3	2.3
Integración Bordes	3	3.3	1	3.6	4	2.9	1.6
Apariencia	4	4	4	4	4	4	3
Evaluación Final	10 (Casi Normal)	10 (Casi Normal)	8 (Casi Normal)	11 (Casi Normal)	12 (Normal)	10 (Casi Normal)	7 (Anormal)

Grado I (12 pts): Tejido Normal, **Grado II** (11-8 pts): Casi normal, **Grado III** (7-4 pts): Anormal, **Grado IV** (3-1 pts): Muy anormal.

Si en los 5 conejos experimentales el resultado hipotético esperado fuera grado I (tejido normal) y para el conejo control fuera grado III (tejido anormal), la prueba de bondad de

ajuste de chi cuadrada arroja un valor de 8.444 con una p asintótica de 0.015, siendo estadísticamente significativo (Tabla 3).

ICRS-CRA	N observado	N esperado	Residual	Valor de la prueba	p
Tejido Normal	1	1.2	-.2		
Tejido Casi Normal	4	1.2	2.8	8.444	0.015
Anormal	1	3.6	-2.6		
Total	6				

Tabla 3. Prueba de bondad de ajuste de chi cuadrada, confirmando una relación entre las variables y su distribución.

11.2. Valoración Microscópica

Se realizó una valoración histológica por un médico anatomopatólogo experto en tejido musculoesquelético, el cual por medio de las tinciones de Safranina O y Azul Alciano constató la presencia de glucosaminoglicanos en el tejido neoformado.

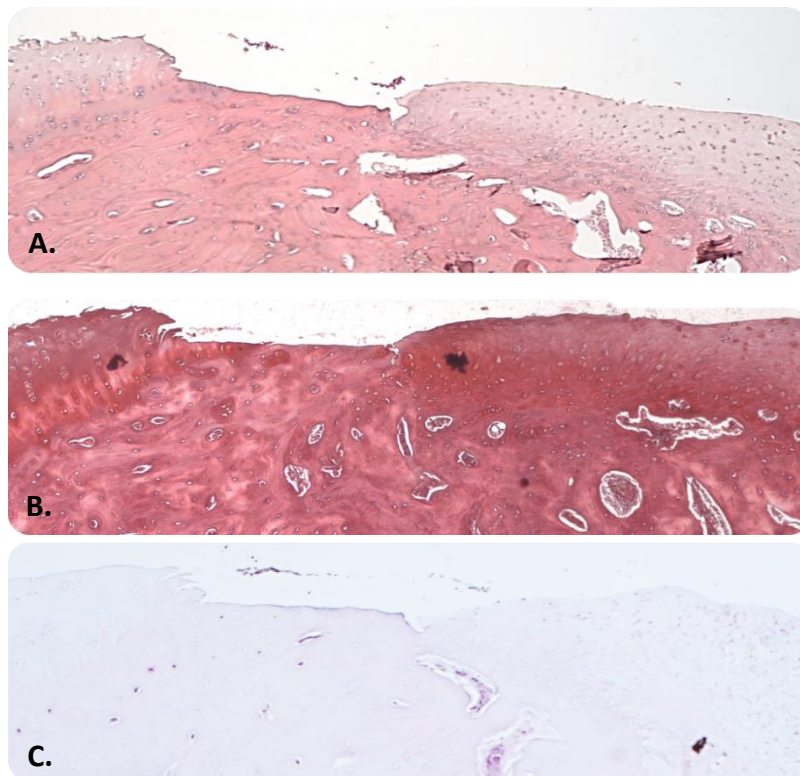


Figura 21. Tinción histológica del tejido neoformado por el implante de MOD + Condrocitos. **A.** Tinción de Hematoxilina - Eosina con cartílago neoformado muy similar al cartílago hialino, con celularidad normal ligeramente desorganizada, con presencia de matriz extracelular constatada por tinción de **B.** Safranina O y **C.** Azul Alciano.

Posteriormente evaluó las laminillas por medio de la Escala de O'Driscoll, encontrando en la mayor parte de los casos un tejido fácil de caracterizar al microscopio, de aspecto muy similar al cartílago hialino, con una matriz extracelular bien organizada sobre la zona del defecto y con presencia de una alta celularidad, ligeramente desorganizada, correspondiente a condrocitos. Este cartílago regenerativo se integró, la mayoría de las veces, de manera adecuada al cartílago nativo, siendo a veces difícil identificar su zona de transición (Tabla 4).

Tabla 4. Evaluación Histológica con la Escala de O'Driscoll modificada

	Conejo 1	Conejo 2	Conejo 3	Conejo 4	Conejo 5	Conejo Control
Morfología Celular	4	2	4	4	4	0
Tinción de Safranina O	3	1	3	3	3	0
Celularidad	3	2	3	3	3	0
Identificación al microscopio	4	3	4	4	4	0
Evaluación Final	14	8	14	14	14	0

14 pts: Tejido similar a Cartílago Normal; **0 pts:** Tejido Fibroso, Anormal

Sólo el segundo conejo experimental tuvo un valor de 8 puntos de 14 posibles para considerar que el tejido es similar a cartílago normal; los cuatro conejos restantes tuvieron 14 puntos, lo cual es equivalente a decir que 80 % de los conejos experimentales tuvieron un tejido similar a cartílago; en cambio, el conejo control tuvo 0 puntos equivalente a tejido fibroso anormal. En este caso, esperando que los conejos experimentales tuvieran todos 14 puntos y el control 0 puntos, la prueba de bondad de ajuste de chi cuadrada arroja un valor de 46.5 ($p = 0.0001$), lo que se considera estadísticamente significativo.

La correlación con rho de Spearman entre ambas escalas arroja un coeficiente de -0.70 ($p = 0.12$); es decir que cuando la evaluación macroscópica analizada por la escala ICRS-CRA corresponde a un tejido anormal (grado III), las características histológicas observadas en la escala de O'Driscoll modificada son de menor calidad (tejido fibroso anormal), (Gráfico 1).

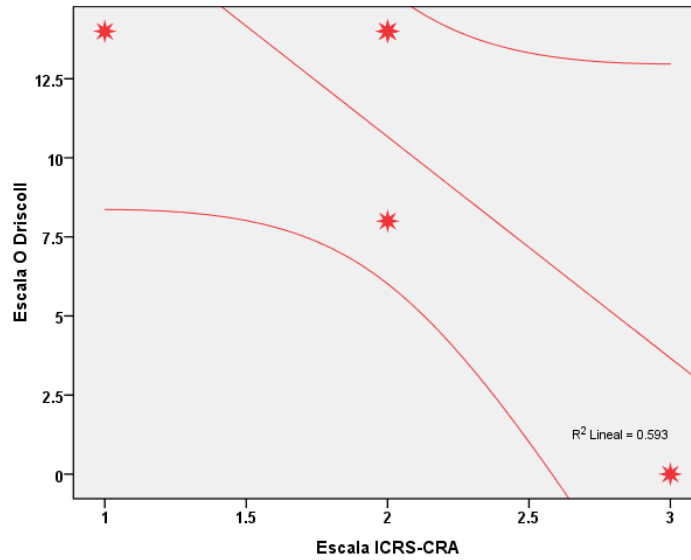


Gráfico 1. Coeficiente de correlación con rho de Spearman entre la escala ICRS-CRA y la escala de O'Driscoll

11.3. Inmunofluorescencia Indirecta

Se realizó un análisis semicuantitativo sobre el grado de expresión de proteínas específicas de tejido. Encontramos en las muestras de tejido neoformado, donde se implantó el andamio de MOD con condrocitos, la expresión de proteínas propias del cartílago hialino (Colágeno tipo II, Agrecano, Sox-9), con resultados muy similares al compararlo con cartílago nativo sano. Por su parte, en el sujeto control que no recibió tratamiento se expresaron proteínas propias de tejido osteofibroso (Runx2 y Colágeno tipo I), siendo considerablemente menor la expresión de proteínas relacionadas con el cartílago hialino como se puede observar en la Tabla 5 y el Gráfico 2.

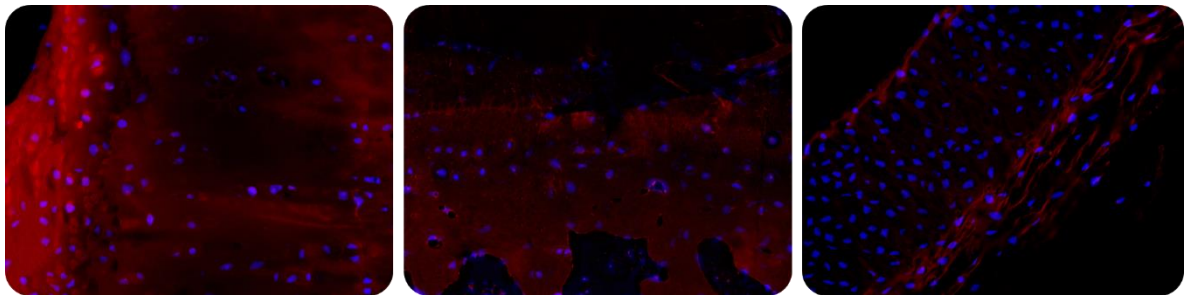


Figura 22. Inmunofluorescencia Indirecta para Colágeno II. Izquierda: Cartílago Nativo Sano. En medio: Cartílago Neoformado por MOD + condrocitos. Derecha: Tejido fibroso en defecto condral sin tratamiento.

Tabla 5. Evaluación por Inmunofluorescencia Indirecta

	Colágeno tipo 2	Sox-9	Agrecano	Colágeno tipo 1	Runx2
Cartílago Nativo Sano	55.02 %	10.21 %	33.47 %	5.73 %	7.22 %
Cartílago Neoformado (Condrocitos + MOD)	25.60 %	8.73 %	45.44 %	0.77 %	3.81 %
Control Negativo (Sin Tratamiento)	9.40 %	0.47 %	5.43 %	6.93 %	23.8 %

Porcentaje de expresión de la proteína de interés por inmunofluorescencia con respecto a los núcleos celulares. Cifras estimadas con Image J.

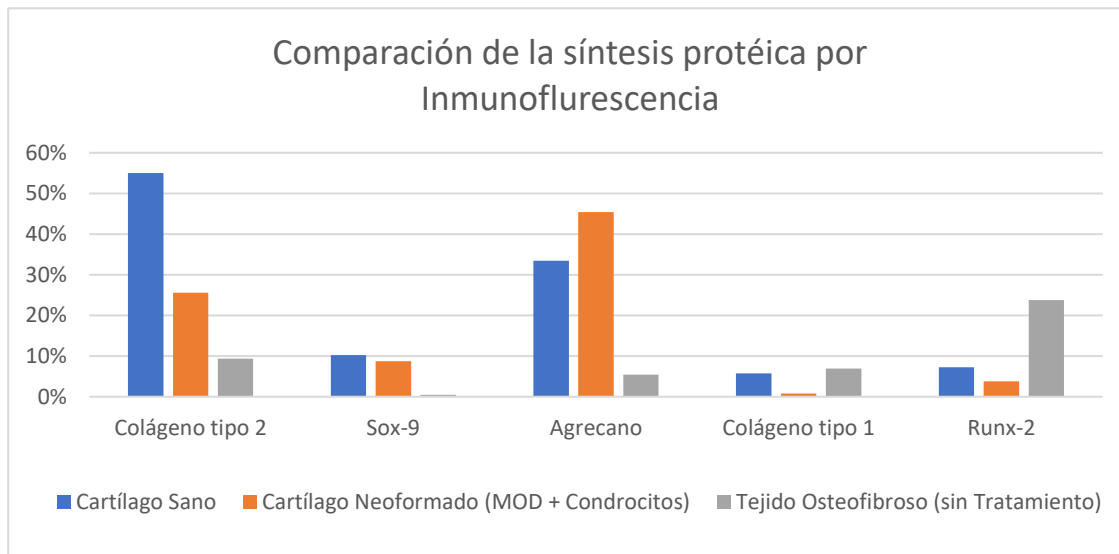


Gráfico 2. Representación gráfica del porcentaje de positividad por inmunofluorescencia para las diferentes proteínas de interés.

Por medio del coeficiente rho de Spearman se encontró que ante la presencia de marcadores propios de cartílago hialino existe una correlación positiva para la presencia de otros marcadores de este tipo y una correlación negativa para marcadores de fibrocartílago o hueso. De manera contraria, ante la presencia de marcadores de fibrocartílago o hueso, hay una correlación positiva para presentar este tipo de marcadores y una negativa para marcadores de cartílago hialino, algunas correlaciones siendo estadísticamente significativas como se puede observar en la Tabla 6.

	Rho de Spearman	p
Inmuno Col 2 con:		
Inmuno Sox-9	1.0	0.01
Imuno Agrecano	0.500	0.66
Imnuo Col 1	-0.500	0.66
Imnuoc Runx2	-0.500	0.66
InmunoSox-9 con:		
Inmuno Acan	0.500	0.66
Inmuno Col 1	-0.500	0.66
Inmuno Runx	-0.500	0.66
Inmuno Agrecano con:		
Inbmuno Col 1	-1.0	0.01
Inmuno Runx	-1.0	0.01
Inmuno Col 1 con:		
Inmuno Runx	1.0	0.01

Tabla 6. Coeficiente de correlación con rho de Spearman entre los resultados de la inmunofluorescencia.

11.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa de punto final

Del RNA extraído de las piezas de estudio y control, se realizó una amplificación génica para *Col1a2*, *Col2a1*, *Acan*, *Sox9* y *Gapdh* por RT-PCR de punto final, que posteriormente fue caracterizada por electroforesis en gel de agarosa. Como podemos observar en la Figura 23, se constató de manera cualitativa la presencia de los genes antes mencionados en todas las muestras.

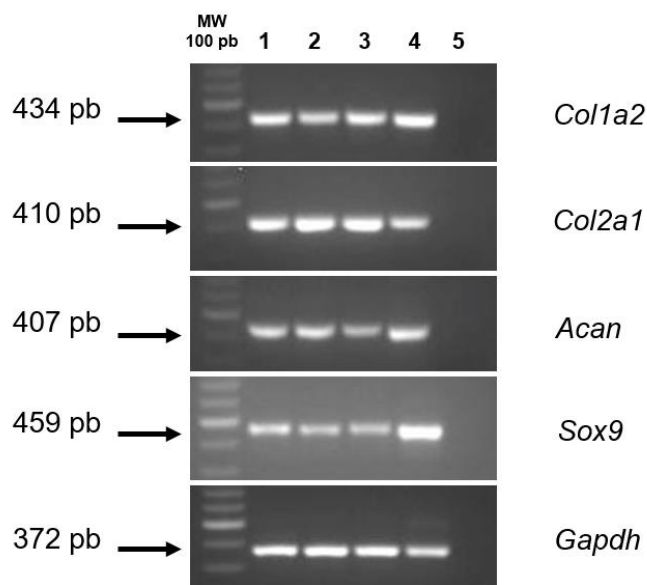


Figura 23. Se muestran las expresiones obtenidas de los genes *Col1a2*, *Col2a1*, *Acan*, *Sox9* y *Gapdh* de: **1.** cartílago sano; **2.** y **3.** cartílago neoformado en implantados con MOD + condrocitos; **4.** tejido de control sin tratamiento; **5.** muestra en blanco sin RNA. *Gapdh* se usó como control de expresión.

12. DISCUSIÓN

El tratamiento de las lesiones condrales continúa siendo un reto de la ortopedia moderna. El implante autólogo de condrocitos ha demostrado ser la técnica ideal para lesiones osteocondrales localizadas, sin embargo, esta técnica requiere de andamios, diseñados por medio de ingeniería de tejidos, que mantengan a los condrocitos en el sitio de interés para una adecuada reparación. Estos andamios, debido a su alto costo, son poco accesibles para los pacientes de países en desarrollo, por lo cual es imperativo buscar alternativas para poder realizar estas técnicas en nuestra población mexicana.

Como ya se mencionó, existen en la literatura algunos estudios que sugieren el potencial condrogénico de los andamios de MOD para la reparación condral.³⁵⁻³⁸ En nuestro estudio también pudimos constatar este potencial condrogénico al colocar condrocitos en un constructo de MOD e implantarlo en un modelo animal *in vivo* durante 12 semanas. Este potencial de reparación con cartílago hialino se evaluó de manera macroscópica, histológica, con inmunofluorescencia y mediante expresión genómica con RT-PCR.

A nivel macroscópico observamos la presencia de un tejido idéntico al cartílago hialino en un caso (20 %) y tejido muy similar al cartílago hialino en la mayoría de los casos (80 %), consistente con lo reportado por Bo³⁸ y Zhao³⁹, quienes evaluaron macroscópicamente el tejido neoformado posterior al uso de una MOD enriquecida con condrocitos o CTM, observando un tejido de características hialinas como el nuestro. Se obtuvo de manera general, una calificación promedio de la escala ICRS-CRA grado II, lo que indica un tejido casi normal. En nuestro estudio el sistema de sujeción del implante fue por técnica a presión *press fit* y sutura con puntos de vycril en las 4 esquinas; en los pocos casos en los que no se formó tejido de reparación de manera uniforme (ejemplo: lado medial reparado y lado lateral con defecto), sospechamos un desplazamiento del implante debido a la gran movilidad de los sujetos experimentales aun estando en jaula. Una propuesta de solución a este problema pudiera ser la sujeción del implante al hueso por medio de pegamento de fibrina o bien la inmovilización del sujeto de estudio por medio de aparatos de yeso veterinario. Estadísticamente, por medio de la prueba de bondad de ajuste de chi cuadrada pudimos constatar que existe una relación con respecto a su distribución en los resultados obtenidos entre los sujetos tratados y no tratados, es decir, los sujetos tratados se acercaron mucho a los valores considerados como normales para el tejido neoformado y a su vez el sujeto control no tratado, como se esperaba, se acerca a valores de anormalidad, con significancia estadística (p asintótica = 0.015).

Con las tinciones de Hematoxilina-Eosina, Safranina O y Azul Alciano, así como por la evaluación con la escala de O'Driscoll modificada, se observó mayormente (80 %) la presencia de un neocartílago, con adecuada formación de matriz extracelular hialina, con una celularidad normal y bien integrado al cartílago nativo, similar a lo reportado por Bo,³⁸ Meng,³⁶ Wang,³⁵ Man³⁷ y Zhao.³⁹ Cabe destacar que el andamio de MOD repara tanto el tejido óseo subcondral como el tejido condral, no dejando rastro de su estructura trabecular, siendo integrado al 100 por ciento al tejido nativo e intercambiado por tejido de neoformación. De igual forma, en los raros casos en que hay brechas entre el cartílago de reparación y el nativo, se sospecha un exceso de movimiento por parte del modelo experimental, que tendrá que ser tomado en cuenta para investigaciones futuras. Analíticamente en este caso, esperando que los conejos experimentales tuvieran todos 14 puntos (tejido similar al cartílago) y el conejo control 0 puntos (tejido fibroso anormal), la prueba de bondad de ajuste de chi cuadrada arroja un valor con significancia estadística ($p = 0.0001$) y con la misma relevancia clínica explicada en la escala ICRS-CRA.

Con respecto a estas escalas macro y microscópicas, existe una correlación lineal (-0.70) según el coeficiente de correlación rho de Spearman, es decir que mientras peor es la puntuación en la escala ICRS-CRA, más pobre es la puntuación en la escala de O'Driscoll; lo anterior no siendo significativo ($p = 0.12$) debido probablemente al pequeño tamaño de muestra.

Por medio de inmunofluorescencia constatamos la presencia, en mayor medida, de proteínas específicas del cartílago hialino como Colágeno tipo II, Agrecano y Sox-9 en los sitios de lesión de los sujetos tratados con el implante de MOD con condrocitos, siendo muy similar a lo encontrado en el cartílago sano. De manera contraria, en el sujeto control que no recibió el implante, se constató una mayor síntesis de proteínas propias de tejido osteofibroso. Una de las preocupaciones más importantes sobre este andamio, al tener como principal indicación el relleno de defectos óseos, es que no forme cartílago, sino hueso en la zona de defecto. Lo anterior se descartó por medio de histología y de las pruebas de inmunofluorescencia, en donde no hay indicios de formación ósea sino cartilaginosa. En el análisis estadístico encontramos que existen correlaciones tanto negativas como positivas en la expresión de proteínas y que tienen una plausibilidad biológica; por ejemplo, ante la sobreexpresión de Colágeno II se observa una correlación positiva para la expresión de Sox-9 y Agrecano (marcadores de cartílago hialino), y una correlación negativa para Colágeno I y Runx2 (marcadores de osteogénesis); este mismo patrón de correlación positiva y negativa sucede entre el resto de marcadores propios de

cartílago hialino (Sox-9 y Agrecano). De manera opuesta, existe una correlación positiva entre Colágeno I y Runx2, y a su vez una correlación negativa con los marcadores de cartílago hialino (Colágeno II, Sox-9 y Agrecano). Lo anterior hace el resto de nuestros hallazgos más consistentes, ya que encontramos una correlación entre marcadores similar a lo reportado por otros autores.^{35,36}

Nos apoyamos de técnicas de biología molecular para buscar marcadores específicos de cartílago hialino. Estos marcadores son genes que se expresan principalmente en el cartílago hialino neoformado. Similar a lo realizado por otros autores,³⁵⁻³⁷ analizamos la expresión génica del tejido en estudio, por lo cual decidimos hacer amplificación de genes a partir del RNA mensajero obtenido de la muestra en fresco, por medio la técnica de Transcripción Reversa de RNA y la amplificación del cDNA por PCR de punto final (RT-PCR). Sin embargo, aun cuando se obtuvo una amplificación homogénea del gen control, *Gapdh*, no obtuvimos conclusiones contundentes de nuestros resultados por algunos motivos específicos: 1) la técnica de RT-PCR o PCR de punto final es una técnica cualitativa, que solamente nos indica la presencia o ausencia de algún gen; 2) ya que la expresión fue analizada en un solo punto final del tratamiento realizado a los conejos, tal vez un seguimiento en diferentes tiempos nos podría mostrar los cambios de expresión génica y cómo pudieran llegar a ser similares en todos los sujetos estudiados después de 12 semanas; 3) una manera un tanto subjetiva de volver esta técnica semicuantitativa, es por medio del análisis de los pixeles obtenidos de la imagen digital de las bandas en la electroforesis; sin embargo, en nuestros resultados no se presentó una expresión diferencial de los genes, siendo todos los genes positivos en cada una de las muestras. Lo anterior se puede explicar por la presencia de algunos condrocitos desdiferenciados que desarrollan fenotipo fibroblástico con un aumento en la expresión de marcadores como *Col1a1*, *Col10a1* y *Runx2*,⁴⁵ pudiendo generar la ambigüedad obtenida en nuestros hallazgos.

Finalmente, cabe mencionar que una de las limitantes de nuestro estudio es el tamaño de muestra, sin embargo, el objetivo principal de nuestra investigación era constatar el potencial condrogénico de la MOD reportado por otros autores, realizando técnicas de ingeniería de tejidos con los materiales disponibles en nuestro medio, un país en desarrollo, para así poder sentar las bases de una posible aplicación clínica de este tipo de andamios en las técnicas de implantes de condrocitos, en pacientes con lesiones condrales.

13. CONCLUSIONES

El andamio de Matriz Ósea Desmineralizada demostró ser, por medio de examen macroscópico, histológico, inmunofluorescencia y RT-PCR, una alternativa viable y con suficiente potencial condrogénico para la formación de cartílago hialino, que puede volver al implante de condrocitos una técnica accesible a la población de países en vías de desarrollo.

14. AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Los investigadores expresamos nuestra gratitud al **Banco de Tejidos Musculoesquelético y Piel Novoinjertos de México** por su invaluable apoyo en la adquisición de los sujetos de estudio y andamios utilizados en esta investigación.

Así mismo agradecemos la valiosa colaboración en este proyecto del **M.V.Z. Hugo Lecona Butrón**, jefe del servicio de Bioterio y Cirugía Experimental, así como de su muy profesional equipo:

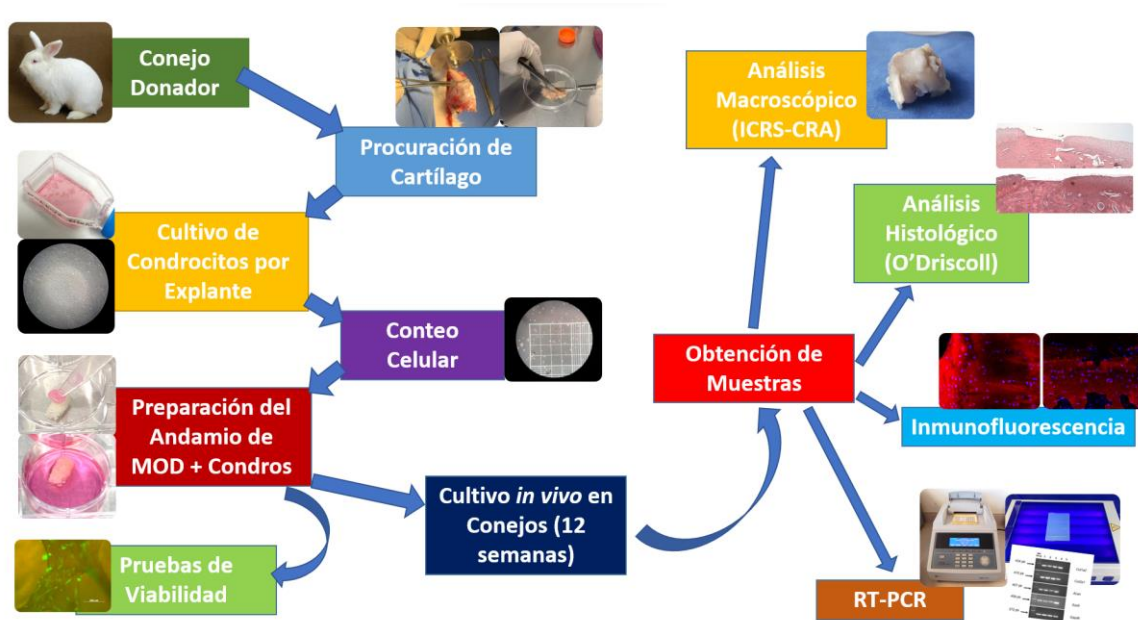
- MVZ. Javier Pérez Gallaga
- Auxiliar en bioterio Jorge Arturo de la Fuente Sánchez
- Ayudante de investigador Hiram García Campillo
- Técnico en bioterio Ricardo N. Mejenez López
- Técnico en bioterio Esmeralda García Camacho

¡Gracias!

ANEXOS

Anexo 1:

Diagrama de Flujo de Material y Métodos



CARTILAGE REPAIR ASSESSMENT

Criteria	Points	
Degree of Defect Repair I Protocol A ⁽¹⁾	* In level with surrounding cartilage	4
	* 75% repair of defect depth	3
	* 50% repair of defect depth	2
	* 25% repair of defect depth	1
	* 0% repair of defect depth	0
I Protocol B ⁽²⁾	* 100% survival of initially grafted surface	4
	* 75% survival of initially grafted surface	3
	* 50% survival of initially grafted surface	2
	* 25% survival of initially grafted surface	1
	* 0% (plugs are lost or broken)	0
II Integration to Border zone	* Complete integration with surrounding cartilage	4
	* Demarcating border < 1mm	3
	* 3/4 of graft integrated, 1/4 with a notable border >1mm width	2
	* 1/2 of graft integrated with surrounding cartilage, 1/2 with a notable border > 1mm	1
	* From no contact to 1/4 of graft integrated with surrounding cartilage	0
III Macroscopic Appearance	* Intact smooth surface	4
	* Fibrillated surface	3
	* Small, scattered fissures or cracks	2
	* Several, small or few but large fissures	1
	* Total degeneration of grafted area	0
Overall Repair Assessment	Grade I normal	12 P
	Grade II nearly normal	11-8 P
	Grade III abnormal	7-4 P
	Grade IV severely abnormal	3-1 P

Cartilage Biopsy

Location _____

(1) Protocol A:	(2) Protocol B:
autologous chondrocyte implantation (ACI); periosteal or perichondrial transplantation; subchondral drilling; microfracturing; carbon fibre implants; others:	Mosaicplasty; OAT; osteochondral allografts; others:

Anexo 3:

O'Driscoll histological score (modified)	
Cellular morphology	
Hyaline articular cartilage	4
Incompletely differentiated mesenchyme	2
Fibrous tissue or bone	0
Safranin-O staining	
Normal or nearly normal	3
Moderate	2
Slight	1
None	0
Hypocellularity	
Normal cellularity	3
Slight hypocellularity	2
Moderate hypocellularity	1
Severe hypocellularity	0
Microscopic identification	
Easy identification at 4×	4
Easy identification at 10×	3
Easy identification at 20×	2
Difficult identification at 20×	1
No identification of cartilage-like structure	0

BIBLIOGRAFÍA

1. Farmer JM, Martin DF, Boles CA, Curl WW. Chondral and osteochondral injuries Diagnosis and management. *Clinics in Sports Medicine*. 2001;20(2):299-320.
2. Maiotti M, Monteleone G, Tarantino U, Fasciglione GF, Marini S, Coletta M. Correlation between osteoarthritic cartilage damage and levels of proteinases and proteinase inhibitors in synovial fluid from the knee joint. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2000;16(5):522-526. doi:10.1053/jars.2000.4632
3. Responde DJ, Lee JK, Hu JC, Athanasiou KA. Biomechanics-driven chondrogenesis: from embryo to adult. *The FASEB Journal*. 2012;26(9):3614-3624. doi:10.1096/fj.12-207241
4. Grässel S, Lorenz J. Tissue-Engineering Strategies to Repair Chondral and Osteochondral Tissue in Osteoarthritis: Use of Mesenchymal Stem Cells. *Current Rheumatology Reports*. 2014;16(10):452. doi:10.1007/s11926-014-0452-5
5. Lee EH, Hui JHP. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *The Journal of Bone and Joint Surgery British volume*. 2006;88-B(7):841-851. doi:10.1302/0301-620X.88B7.17305
6. Berebichez-Fridman R, Gómez-García R, Granados-Montiel J, et al. The Holy Grail of Orthopedic Surgery: Mesenchymal Stem Cells—Their Current Uses and Potential Applications. *Stem Cells International*. 2017;2017:1-14. doi:10.1155/2017/2638305
7. Ibarra C, Velasquillo C, Villalobos E. Reparación del cartílago articular: Técnicas basadas en cultivos celulares. *Acta Ortopédica Mexicana*. 2009;23(1):38-44.
8. Villalobos E, Velasquillo C, Ibarra C. Resultados en la reparación experimental de lesiones osteocondrales en un modelo porcino mediante ingeniería de tejidos. *Acta Ortopédica Mexicana*. 2007;21(4):217-223.
9. Ibarra C, Izaguirre A, Villalobos E, et al. Follow-up of a New Arthroscopic Technique for Implantation of Matrix-Encapsulated Autologous Chondrocytes in the Knee. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 2014;30(6):715-723. doi:10.1016/j.arthro.2014.02.032
10. Arredondo Valdés RH, Olivos Meza A, Villalobos Córdoba FE, et al. Una nueva técnica artroscópica de implante de condrocitos autólogos en matriz encapsulada (ICAME) en patela: evaluación clínica y por mapeo T2 a 4 años de seguimiento. *Revista Española de Artroscopia y Cirugía Articular*. 2018;25(1):30-41. doi:10.24129/j.reaca.25161.fs1709032

11. Olivos-Meza A, Velasquillo Martínez C, Olivos Díaz B, et al. Co-culture of dedifferentiated and primary human chondrocytes obtained from cadaveric donor enhance the histological quality of repair tissue: an in-vivo animal study. *Cell and Tissue Banking*. 2017;18(3):369-381. doi:10.1007/s10561-017-9635-4
12. Landa-Solís C, Olivos-Meza A, Olivos-Díaz B, et al. Behavior of multipotent stem cells isolated in mobilized peripheral blood from sheep after culture with human chondrogenic medium. *Tissue and Cell*. 2018;52(September 2017):116-123. doi:10.1016/j.tice.2018.05.007
13. Landa-Solís C, Granados-Montiel J, Olivos-Meza A, et al. Cryopreserved CD90+ cells obtained from mobilized peripheral blood in sheep: a new source of mesenchymal stem cells for preclinical applications. *Cell and Tissue Banking*. 2016;17(1):137-145. doi:10.1007/s10561-015-9526-5
14. Gómez-Barrena E, Solá CA, Bunu CP. Regulatory authorities and orthopaedic clinical trials on expanded mesenchymal stem cells. *International Orthopaedics*. 2014;38(9):1803-1809. doi:10.1007/s00264-014-2332-z
15. Hu Q, Liu M, Chen G, Xu Z, Lv Y. Demineralized Bone Scaffolds with Tunable Matrix Stiffness for Efficient Bone Integration. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2018;10(33):27669-27680. doi:10.1021/acsami.8b08668
16. Abedin E, Lari R, Mahdavi Shahri N, Fereidoni M. Development of a demineralized and decellularized human epiphyseal bone scaffold for tissue engineering: A histological study. *Tissue and Cell*. 2018;55(February):46-52. doi:10.1016/j.tice.2018.09.003
17. Bae E bin, Park K ho, Shim J hyung, et al. Efficacy of rhBMP-2 Loaded PCL/ β -TCP/bdECM Scaffold Fabricated by 3D Printing Technology on Bone Regeneration. *BioMed Research International*. 2018;2018:1-12. doi:10.1155/2018/2876135
18. Shi Y, Niedzinski JR, Samaniego A, Bogdansky S, Atkinson BL. Adipose-Derived Stem Cells Combined with a Demineralized Cancellous Bone Substrate for Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part A*. 2012;18(13-14):1313-1321. doi:10.1089/ten.tea.2011.0357
19. Dufrane D, Docquier PL, Delloye C, Poirel HA, André W, Aouassar N. Scaffold-free Three-dimensional Graft From Autologous Adipose-derived Stem Cells for Large Bone Defect Reconstruction. *Medicine*. 2015;94(50):e2220. doi:10.1097/MD.0000000000002220
20. Chen G, Lv Y. Decellularized Bone Matrix Scaffold for Bone Regeneration. In: K. T, ed. *Decellularized Scaffolds and Organogenesis. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, New York, NY; 2017:239-254. doi:10.1007/7651_2017_50
21. Colnot C, Romero DM, Huang S, Helms JA. Mechanisms of Action of Demineralized Bone Matrix in the Repair of Cortical Bone Defects. *Clinical*

- Orthopaedics and Related Research.* 2005;NA;(435):69-78. doi:10.1097/00003086-200506000-00012
22. Li Q, Zhang W, Zhou G, Cao Y, Liu W, Zhang Z yong. Demineralized bone matrix-based microcarrier scaffold favors vascularized large bone regeneration in vivo in a rat model. *Journal of Biomaterials Applications.* 2018;33(2):182-195. doi:10.1177/0885328218784370
 23. Parrilla-Almansa A, García-Carrillo N, Ros-Tárraga P, et al. Demineralized Bone Matrix Coating Si-Ca-P Ceramic Does Not Improve the Osseointegration of the Scaffold. *Materials.* 2018;11(9):1580. doi:10.3390/ma11091580
 24. Álvarez R. Sustitutos óseos en ortopedia. *Rev Mex Ortop Ped.* 2014;16(1):11-19.
 25. Zárate-kalfópulos B, Reyes-sánchez A. Injertos óseos en cirugía ortopédica. *Cir Ciruj.* 2006;74(3):217-222.
 26. Zhang H, Mao X, Du Z, et al. Three dimensional printed macroporous polylactic acid/hydroxyapatite composite scaffolds for promoting bone formation in a critical-size rat calvarial defect model. *Science and Technology of Advanced Materials.* 2016;17(1):136-148. doi:10.1080/14686996.2016.1145532
 27. Tapias LF, Ott HC. Decellularized scaffolds as a platform for bioengineered organs. *Current Opinion in Organ Transplantation.* 2014;19(2):145-152. doi:10.1097/MOT.0000000000000051
 28. Lee DJ, Diachina S, Lee YT, et al. Decellularized bone matrix grafts for calvaria regeneration. *Journal of Tissue Engineering.* 2016;7:204173141668030. doi:10.1177/2041731416680306
 29. Cho H, Bucciarelli A, Kim W, et al. Natural Sources and Applications of Demineralized Bone Matrix in the Field of Bone and Cartilage Tissue Engineering. In: Chun H., Reis R., Motta A. KG, ed. *Bioinspired Biomaterials, Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1st ed. Springer; 2020:3-14. doi:10.1007/978-981-15-3258-0_1
 30. Hexter AT, Pendegrass C, Haddad F, Blunn G. Demineralized Bone Matrix to Augment Tendon-Bone Healing: A Systematic Review. *Orthopaedic Journal of Sports Medicine.* 2017;5(10):232596711773451. doi:10.1177/2325967117734517
 31. Thangarajah T, Sanghani-Kerai A, Henshaw F, Lambert SM, Pendegrass CJ, Blunn GW. Application of a Demineralized Cortical Bone Matrix and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Model of Chronic Rotator Cuff Degeneration. *The American Journal of Sports Medicine.* 2018;46(1):98-108. doi:10.1177/0363546517727512
 32. Thangarajah T, Shahbazi S, Pendegrass CJ, Lambert S, Alexander S, Blunn GW. Tendon Reattachment to Bone in an Ovine Tendon Defect Model of Retraction

- Using Allogenic and Xenogenic Demineralised Bone Matrix Incorporated with Mesenchymal Stem Cells. Zeugolis D, ed. *PLOS ONE*. 2016;11(9):e0161473. doi:10.1371/journal.pone.0161473
33. Hsu S ling, Wang C jen. The use of demineralized bone matrix for anterior cruciate ligament reconstruction: a radiographic, histologic, and immunohistochemical study in rabbits. *Journal of Surgical Research*. 2014;187(1):219-224. doi:10.1016/j.jss.2013.09.025
 34. Lovric V, Chen D, Yu Y, Oliver RA, Genin F, Walsh WR. Effects of Demineralized Bone Matrix on Tendon-Bone Healing in an Intra-articular Rodent Model. *The American Journal of Sports Medicine*. 2012;40(10):2365-2374. doi:10.1177/0363546512457648
 35. Wang Z hui, He X jing, Yang ZQ, Tu JB. Cartilage Tissue Engineering With Demineralized Bone Matrix Gelatin and Fibrin Glue Hybrid Scaffold: An In Vitro Study. *Artificial Organs*. 2010;34(2):161-166. doi:10.1111/j.1525-1594.2009.00856.x
 36. Meng Q, Man Z, Dai L, et al. A composite scaffold of MSC affinity peptide-modified demineralized bone matrix particles and chitosan hydrogel for cartilage regeneration. *Scientific Reports*. 2015;5(1):17802. doi:10.1038/srep17802
 37. Man Z, Hu X, Liu Z, et al. Transplantation of allogenic chondrocytes with chitosan hydrogel-demineralized bone matrix hybrid scaffold to repair rabbit cartilage injury. *Biomaterials*. 2016;108:157-167. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.09.002
 38. Bo Y, Yanhai C, Ming L, Siyuan LI, Junling CAO. Demineralized cancellous bone seeded with allogeneic chondrocytes for repairing articular osteochondral defects in rabbits. *J South Med Univ*. 2018;38(9):1039-1044. doi:10.12122/j.issn.1673-4254.2018.09.03
 39. Zhao D, Li Y, Zhou X, Yang Z. Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells Combined with Modified Demineralized Bone Matrix Promote Pig Cartilage Defect Repair. *Cells Tissues Organs*. 2018;206(1-2):26-34. doi:10.1159/000493210
 40. Olivos-Meza A, Landa-Solis C, Olivos-Díaz B, Cardenas-Soria V, Suarez-Ahedo C, Ibarra C. Expression of articular cartilage markers in 3D Demineralized Bone Matrix Scaffolds. In: *International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society Macau*. ICRS; 2018.
 41. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*. 1997;13(4):456-460. doi:10.1016/S0749-8063(97)90124-9

42. Elders MJ. The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol Suppl.* 2000;60:6-8.
43. Gil-Loyzaga P. *Cultivo de Células Animales y Humanas: Aplicaciones En Medicina Regenerativa.* 1st ed. Visión Libros; 2011.
44. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques.* 1993;15(3):532—4, 536—7.
45. Zhang R, Meng F, Zhang Q, et al. Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells promote the expression of chondrocyte redifferentiation markers and retard the progression of knee osteoarthritis in rabbits. *Am J Transl Res.* 2021;13(2):632-645. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33594314>