



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“ZARAGOZA”

“EFECTO *IN VITRO* DEL EGF, IGF Y FGF EN LA  
PROLIFERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE MATRIZ  
EXTRACELULAR SOBRE CONDROCITOS  
OBTENIDOS DE CARTÍLAGO HIALINO Y  
ELÁSTICO DE CONEJO”.

## T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

LEONARDO FERMIN ACEVEDO OLVERA

DIRECTORES: DRA. ATLÁNTIDA M. RAYA RIVERA  
M. EN C. ALBERTO PARRA BARRERA

ASESOR: Q.F.B. ENRIQUE ESCALERA ZUÑIGA



MEXICO, D. F .

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE INGENIERIA  
DE TEJIDOS DEL HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GOMEZ".  
BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. ATLANTIDA MARGARITA RAYA RIVERA Y  
EL M. EN C. ALBERTO PARRA BARRERA Y COMO ASESOR INTERNO. Q.F.B.  
ENRIQUE ESCALERA ZUÑIGA

## **AGRADECIMIENTOS**

A DIOS, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y lograr otra meta más en mi carrera.

A MIS PADRES HILDA Y LEONARDO, a quienes agradezco de todo corazón, porque gracias a su cariño, guía y apoyo he llegado a realizar uno de los más grandes anhelos, terminar mis estudios profesionales y por lo cual les viviré eternamente agradecido.

A MIS HERMANOS SELENE Y FABIÁN, por la compañía y el apoyo que me brindan.

A LA MEMORIA DE MIS ABUELITAS, por los momentos felices que pase a su lado y que hoy son recuerdos.

A LA FAMILIA GUTIÉRREZ IGLESIAS, porque han sido como una segunda familia para mi, en los cuales he encontrado apoyo y comprensión mil gracias.

A ELY, CARI, BETO Y GIS, como un testimonio de gratitud y eterno reconocimiento, por el apoyo brindado y con el cual he logrado terminar mi carrera profesional.

A ELY, como un pequeño testimonio por el gran apoyo y comprensión brindado durante los años más difíciles y más felices de mi vida, en los cuales he logrado terminar mi carrera profesional, la cual constituye un aliciente para continuar con mi superación.

A MIS ASESORES, a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr la realización de esta tesis.

A LA DRA. RAYA, por permitirme ser parte del grupo de trabajo, y adentrarme en los proyectos de investigación.

A BETO, porque gracias a su amistad, apoyo, confianza y estímulos brindados he llegado a realizar una de mis metas.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO, DRA. ATLÁNTIDA M. RAYA RIVERA, Q.F.B. ENRIQUE ESCALERA ZUÑIGA, Q.F.B. CARINA GUTIÉRREZ IGLESIAS, M. EN C. JUANA ROSADO PÉREZ, por sus valiosas sugerencias, las cuales enriquecieron este trabajo.

AL GRUPO DE DIVULGACIÓN DE LA CIENCIA: MAESTRA ANGELES Y ESTELITA, por los momentos agradables que pase con ustedes.

A LOS AMIGOS DEL HIM: DR. ESQUILIANO, DRA. SÁNCHEZ, Q. EMA, RAÚL, MARCO, LEONEL, IVAN, MA. ELENA, JOSÉ, ALEJANDRA, FRANCISCO por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

A MIS MAESTROS, gracias a cada uno de los maestros que participaron en mi desarrollo profesional durante mi carrera, sin su ayuda y conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

A TODOS ELLOS “GRACIAS”

# INDICE

1	Introducción.....	1
2	Marco teórico.....	3
2.1	Cartílago.....	3
2.2	Formación del cartílago.....	4
2.3	Componentes de la matriz extracelular.....	5
2.3.1	Colágeno.....	5
2.3.2	Proteoglicanos.....	6
2.3.3	Glicoproteínas.....	8
2.4	Factores de crecimiento.....	8
2.4.1	Definición.....	9
2.4.2	Mecanismo de acción.....	10
2.4.3	Función en los condrocitos.....	10
2.4.4	Familia del factor de crecimiento tipo insulina (IGF).....	10
2.4.5	Factor inhibidor de la leucemia (LIF).....	11
2.4.6	Factor de crecimiento derivado del endotelio vascular (VEGF)....	11
2.4.7	Interleucinas (IL).....	12
2.4.8	Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).....	12
2.4.9	Familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF).....	13
2.4.10	Factor de crecimiento epidérmico (EGF).....	13
2.5	Tipos de cartílago.....	14
2.5.1	Cartílago hialino.....	14
2.5.2	Cartílago elástico.....	14
2.5.3	Cartílago fibroso.....	15
2.6	Fisiopatología del cartílago y terapia celular.....	16
2.7	Ingeniería de tejidos.....	17
2.7.1	Principios básicos en la ingeniería de tejidos.....	18
2.7.2	Biomateriales.....	19
2.7.3	Cultivo de condrocitos.....	21
2.7.4	Biorreactores.....	22
2.8	Antecedentes.....	23
3	Planteamiento del problema.....	25
4	Objetivos.....	27
5	Hipótesis.....	28
6	Material y método.....	29
7	Resultados.....	35
8	Análisis de resultados.....	51
9	Conclusiones.....	57
10	Glosario.....	59
11	Anexos.....	60
12	Bibliografía.....	75

# 1.- INTRODUCCION

El transplante de órganos, es un procedimiento muy utilizado en la actualidad pero tiene los siguientes inconvenientes: 1) es un método costoso, 2) es deficiente por la falta de donadores, 3) se requieren medicamentos para evitar el rechazo inmune, y 4) la vida media de un órgano transplantado es de 8 años; por lo que muchos países, han invertido dinero en la búsqueda de nuevos métodos que sustituyan o mejoren los transplantes de órganos<sup>1</sup>, surgiendo así la Ingeniería de Tejidos, o bien, la hoy llama Medicina Regenerativa, con la cual se pueden fabricar diferentes tejidos autólogos que evitarían el rechazo del órgano transplantado. Desafortunadamente, la mayoría de estos tejidos son proyectos que solo se realizan a nivel experimental en animales.

El Laboratorio de Ingeniería de Tejidos que pertenece al área de urología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, es uno de los pocos laboratorios en donde actualmente se realizan investigaciones para la restauración de diferentes tejidos, tanto en niños como en niñas, como son el reemplazo de uretra y vagina respectivamente. Uno de los tejidos, en el que se ha enfocado esta investigación es la formación de “neo-cartílago”, ya que es un tejido que se podría utilizar para corregir los defectos físicos de oreja y/o nariz, e incluso para la fabricación de prótesis testiculares (proyecto del laboratorio ya puesto en marcha), con lo cual, se espera en un futuro no muy lejano, que se puedan reparar los tejidos de pacientes pediátricos de este hospital.

Para llevar a cabo este procedimiento en la clínica, es necesario establecer y/o estandarizar ciertos parámetros o aspectos en el cultivo de condrocitos, con la finalidad de evitar su desdiferenciación a fibroblastos y así llegar a formar un tejido muy semejante al cartílago.

En base a su estructura e histomorfología, el cartílago está formado por condrocitos y una compleja matriz extracelular, sintetizada por ellos mismos, la cual esta en remodelación continua, y a su vez se encuentra regulada por factores anabólicos (factores de crecimiento) y catabólicos (interleucinas).

Los factores de crecimiento mas importantes, que intervienen en la biología del cartílago son: Factor inhibidor de la Leucemia (LIF), Factor de crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF), Factor de necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), Factor de

Crecimiento tipo Insulina-1 (IGF-1), el Factor de Crecimiento de los Fibroblastos básico (FGFb o FGF-2) y el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF). De los cuales, el EGF, IGF-I y FGFb, promueven la síntesis de matriz extracelular ya que tienen efectos anabólicos sobre esta.

En la literatura existen reportes relacionados con el uso de factores de crecimiento para aumentar la proliferación de los condrocitos en cultivos en monocapa y en tercera dimensión. Sin embargo, se desconoce el porcentaje de condrocitos bioactivos se están utilizando. En el presente proyecto, se analizaron los cultivos *in vitro*, para conocer, cual es el porcentaje de condrocitos biológicamente activos están sintetizando matriz extracelular de forma individual, y al compararse con los controles correspondientes se podrá establecer, si es posible generar neo-cartílago estimulando su proliferación y síntesis de colágeno tipo II y proteoglicanos con factores de crecimiento (EGF, IGF y FGFb); lo cual tendría la ventaja de obtener un neo-tejido en un menor tiempo de cultivo *in vitro*, y con una menor probabilidad de alterar su maquinaria genética.

Por otro lado, en este proyecto se pretende comparar las diferencias entre los dos cartílagos más propicios para la ingeniería de tejidos: el cartílago hialino, y el cartílago elástico; para conocer cual tejido y que factores de crecimiento, serian los mas adecuados para su uso en los proyectos del laboratorio de ingeniería de tejidos de este hospital.



## 2.- MARCO TEÓRICO O FUNDAMENTACIÓN.

### 2.1 CARTILAGO

El tejido cartilaginoso o cartílago (*lat. cartílago; gr. chondros*) es un tejido conectivo denso y especializado que forma el esqueleto transitorio en el embrión y persiste en el adulto en articulaciones, tracto respiratorio, costillas y orejas.

En el ser humano adulto hay relativamente poco cartílago, pero en el feto y la infancia desempeña un papel muy importante, ya que forma la mayor parte del esqueleto. Es un componente que crece con gran rapidez, el cual Posee aproximadamente un 80% de agua, un 6% de sales minerales y un 14% de sustancias orgánicas. La flexibilidad y resistencia del cartílago a la compresión permiten que funcione como un absorbedor de choques y su superficie lisa, permite un movimiento de las articulaciones del cuerpo casi sin fricción.

Tiene un origen embriológico mesodérmico, aunque a diferencia de otros tejidos conectivos, el cartílago no contiene vasos ni terminaciones nerviosas, por lo que, sus células se nutren con el material que se difunde desde de los capilares sanguíneos del tejido conjuntivo adyacente. Esta constituido por células, denominadas condrocitos, y por una matriz extracelular (MEC) flexible que contiene fibras elásticas y colágenas que aumentan la fuerza tensora y elástica del tejido y en la cuál los condrocitos se ubican en espacios llamados lagunas (Fig. 1).

Salvo los cartílagos articulares, todos los demás están rodeados por una capa de tejido conectivo de colágeno denso, denominado membrana del cartílago o

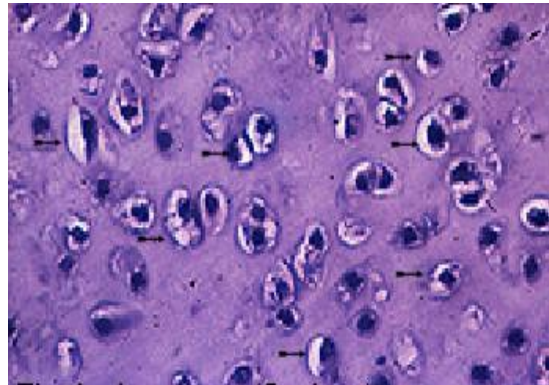


Fig. 1 Formación de lagunas (ver flechas).

pericondrio. Éste ultimo esta formado por fibras elásticas, por colágena tipo I, y células fusiformes de aspecto semejante al de los fibroblastos; además se distingue una capa externa fibrosa y una capa interna celular en la cual se ubican las células que pueden dar origen a los condroblastos, los cuales son los

precursores de los condrocitos y difieren de ellos solo en su edad y en su mayor síntesis de componentes de la matriz extracelular.

La capa fibrosa, esta adyacente a los vasos sanguíneos del tejido conectivo circundante, con el cual se fusiona; y la capa interna, también llamada capa condrógena, la cual es más celular.

Los condroblastos (Fig. 2) presentan un ergastoplasma y un aparato de Golgi muy desarrollados y presentan vesículas y granos de secreción, lo cuál guarda relación con su rol de sintetizar y secretar los distintos componentes de la matriz extracelular cartilaginosa que está formada principalmente por colágeno tipo II, proteoglicanos de condroitín y queratansulfato, ácido hialurónico (en forma de hialuronato) y glicoproteínas.

Al disminuir su actividad de síntesis disminuye el desarrollo tanto del ergastoplasma como del aparato de Golgi,

acumulan glicógeno y lípidos en su citoplasma y se les llama **condrocitos**. (Fig. 3) La zona que rodea las lagunas se llama matriz territorial (cápsulas cartilagosas), y la matriz entre las lagunas se conoce como matriz interterritorial.<sup>2-4</sup>

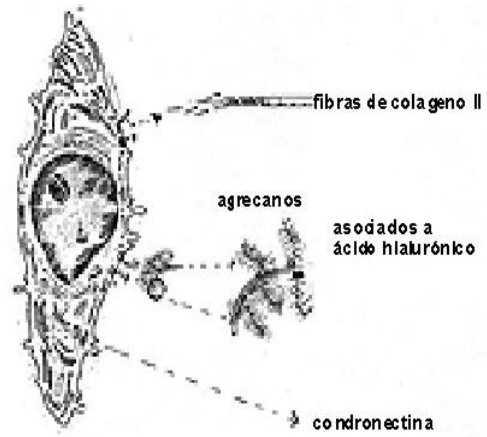


Fig. 2 Estructura del Condroblasto

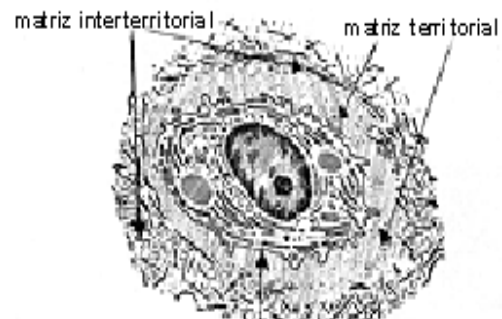


Fig. 3 Estructura del Condrocito

## 2.2 FORMACIÓN DEL CARTILAGO

Una vez que las células mesenquimatosas se condensan y dan lugar a los centros de condricación, se van diferenciando y secretan una matriz extracelular que las va rodeando. Al mismo tiempo, las fibras primitivas de colágena se van segregando, y van quedando embebidas en el interior de la matriz extracelular.

Finalmente, las células adquieren sus características histológicas de condrocito y, quedan aisladas unas de otras en cavidades o lagunas, al aumentar el material

intersticial entre ellas. Una vez que ha aparecido el cartílago, éste sufre un doble proceso de crecimiento, el crecimiento intersticial y el aposicional.

En el crecimiento intersticial, las células se dividen por mitosis y entre dos células hijas se forman tabiques intersticiales que separan a las dos células. Estas células formarán la nueva matriz y las nuevas fibras de colágena.

Por otro lado, en el crecimiento aposicional, el mesénquima que va rodeando al contorno cartilaginoso inicial se condensa formando el pericondrio. Posteriormente, las células de la capa interna del pericondrio, se van transformando en condrocitos que secretarán la matriz y la colágena que formará el nuevo tejido cartilaginoso.

Sin embargo, se ha demostrado que los condrocitos que descienden de una misma célula por el proceso de mitosis del crecimiento intersticial, mantienen un vínculo directo entre ellos al agruparse formando los denominados grupos isogénicos.

### **2.3 COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)**

Los condrocitos son los encargados de sintetizar y secretar los componentes orgánicos de la matriz extracelular que son básicamente:<sup>3-6</sup>

- \* Colágeno
- \* Proteoglicanos
- \* Glicoproteínas.

#### **2.3.1 COLÁGENO**

Es una proteína extracelular compuesta por tres cadenas polipeptídicas (cadenas  $\alpha$ ); las cuales se enroscan entre sí formando una estructura en soga, y se estabiliza mediante puentes de hidrógeno en la glicina y uniones covalentes determinadas por la hidroxilisina.<sup>7</sup> El colágeno puede formar homotrímeros (las tres cadenas  $\alpha$  son iguales entre sí), como en los tipos II y X, y heterotrímeros (las tres cadenas  $\alpha$  son diferentes), en los tipos VI, IX y X.

El colágeno que mayoritariamente se encuentra en el cartílago es de tipo II, lo cual le confiere al cartílago una gran resistencia a la tensión y ayuda a inmovilizar a los proteoglicanos en la MEC.<sup>7</sup>

Las fibras de colágeno adoptan un patrón morfológico en forma de malla o red concéntrica que rodean a los grupos isogénicos. Las fibras que rodean a los grupos isogénicos y las células que los forman constituyen la denominada condrona.

### 2.3.2 PROTEOGLICANOS (PGs)

Los PGs son macromoléculas complejas formadas por un núcleo proteico con varios dominios globulares al que se unen largas cadenas de polisacáridos denominados glicosaminoglicanos (GAG). Estos están formados por una cadena larga, no ramificada, de unidades repetidas de polisacáridos.

La distinción entre los glicosaminoglicanos o glucosaminoglicanos son los restos de azúcares como lo podemos ver en la siguiente tabla.<sup>3</sup>

Tipo de GAG	Disacárido	Distribución
Ac. Hialurónico	Ac. glucurónico + N-acetilglucosamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• tejido conectivo</li> <li>• piel</li> <li>• cartílago</li> <li>• líquido sinovial</li> </ul>
Condroitín Sulfato	Ac. glucurónico + N-acetilgalactosamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cartílago</li> <li>• hueso</li> <li>• piel</li> <li>• pared de arterias</li> <li>• córnea</li> </ul>
Dermatán Sulfato	Ac. glucurónico (ác. idurónico) + N-acetilgalactosamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• piel</li> <li>• vasos sanguíneos</li> <li>• corazón</li> </ul>
Heparán Sulfato	Ac. glucurónico (ác. idurónico) + N-acetilglucosamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• membranas basales</li> <li>• pulmón</li> <li>• vasos sanguíneos</li> <li>• corazón</li> <li>• sangre</li> </ul>
Queratán Sulfato	Galactosa + N-acetilglucosamina	<ul style="list-style-type: none"> <li>• cartílago</li> <li>• córnea</li> <li>• discos vertebrales</li> </ul>

**Tabla 1.** Principales glucosaminoglicanos (GAG)

El 80-90% de los PGs son grandes y se denominan agreganos debido a sus propiedades de agregación, su localización es en el cartílago y su principal función es el soporte mecánico.<sup>8</sup>

Están formados por un centro proteico (2,25 kDa) que presenta tres dominios globulares (G1, G2, G3) al que se adhieren cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato. En el extremo N-terminal de la proteína central, uno de los dominios globulares (G1) tiene la función específica de unión al hialuronato a través de la llamada proteína de unión, formando un complejo agregano-hialuronato (Fig 4). Los principales agreganos son el condroitín sulfato en sus distintas isoformas (condroitín-6-sulfato principalmente), el queratán sulfato y el dermatán sulfato.

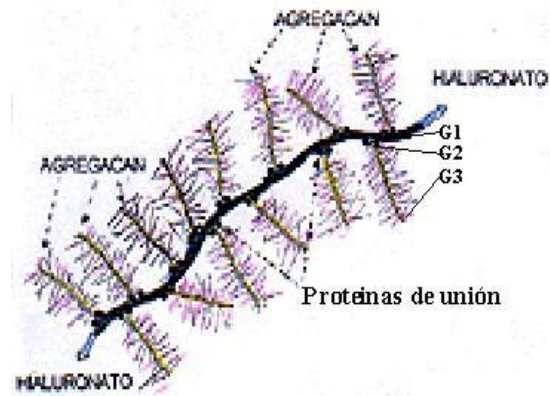


Fig. 4 Estructura de los Proteoglicanos

Los principales agreganos son el condroitín sulfato en sus distintas isoformas (condroitín-6-sulfato principalmente), el queratán sulfato y el dermatán sulfato. El condroitín sulfato es el más abundante y cada cadena está formada por 25-30 unidades de disacáridos, con un peso promedio de 15-20 kDa. Las cadenas de queratán sulfato son más cortas y su peso molecular medio oscila entre 5-10 kDa.<sup>9</sup>

El hialuronato es también un glicosaminoglicano que se diferencia de los agreganos por no estar sulfatado, no poseer proteína central y no formar PGs. Al no estar ramificado se unen a él múltiples moléculas de agregano y se forman grandes macromoléculas que permanecen inmobilizadas dentro de la red de colágeno.

La mayor concentración de condroitín sulfato está alrededor de los grupos isogénicos, lo cual permite visualizar una matriz territorial, y una menor concentración está, entre los diferentes grupos isogénicos, la cual es la matriz interterritorial.

Los PGs son altamente hidrofílicos debido a que los grupos sulfato y carboxilo de los GAGs retienen iones positivos (sodio) junto con agua y esto hace que: a) el tejido mantenga su turgencia y no se deforme por fuerzas compresivas, y b) pueda difundir con facilidad los nutrientes hasta las células

### **2.3.3 GLICOPROTEÍNAS.**

En el cartílago se encuentran diferentes tipos de glicoproteínas. Algunas son de transmembrana y actúan como receptores para moléculas de adhesión, factores de crecimiento o interleucinas. Otras glicoproteínas son extracelulares con funciones de unión y ensamblaje entre los componentes de la MEC y los condrocitos. En general, están constituidas por una base proteica a la que se unen algunos mono y oligosacáridos.

Las principales glicoproteínas estructurales son la ancorina CII, fibronectina, laminina y, sobre todo, las integrinas. La ancorina CII es un miembro de la familia de calpactinas situada en la superficie del condrocito que liga al colágeno y ancla los condrocitos a las fibras colágenas de la MEC. La fibronectina se presenta en forma de agregados en la MEC y en la superficie de los condrocitos; y está tiene afinidad para unirse a fibrina, colágeno tipo II, heparina, hialuronato, etc.

La interacción de todas estas glicoproteínas con los condrocitos se realiza por medio de otras glicoproteínas, denominadas moléculas de adhesión y estas son las integrinas, cadherinas y selectinas como E-selectina, P-selectina y L-selectina.

Dentro de estas, las más importantes son las integrinas, las cuales regulan los procesos de adhesión, migración, proliferación y diferenciación celulares.<sup>9</sup>

Las interacciones entre las glicoproteínas con otros componentes de la MEC, especialmente las macromoléculas, y la superficie de los condrocitos proporcionan estabilidad a todo el cartílago.

Como podemos ver muchas de estas glicoproteínas sirven de receptores para los factores de crecimiento los cuales parecen actuar directamente sobre los condroblastos y condrocitos mediante receptores de superficie denominados integrinas e indirectamente mediante modificaciones de la matriz extracelular que modula las señales transmitidas a las células desde la matriz extracelular.

### **2.4 FACTORES DE CRECIMIENTO (FCs)**

Los FCs, incluyendo las citoquinas, representan un número muy grande de polipéptidos, glucoproteínas y otras moléculas relacionadas, producidos en cantidades limitadas.

Todos ellos estimulan o inhiben la proliferación, la diferenciación y las funciones especializadas de casi cualquier tipo de célula.<sup>10</sup>

#### **2.4.1 DEFINICIÓN**

Se denomina FCs al mensajero químico que actúa sobre: 1) la misma célula que lo produce, por vía autocrina o intracrina; 2) en células vecinas, por vía paracrina y/o 3) en un grupo celular distante, por vía endocrina.<sup>11</sup>

Los FCs transmiten la señal a las células sensibles a ellos uniéndose a un receptor específico, y esta unión da lugar a un sistema transductor de señales constituido por proteínas citoplasmáticas que, en último término, determinan la activación o inhibición de genes intranucleares.

Con respecto a los efectos que producen, los FCs se pueden clasificar en:

1. Reguladores positivos que estimulan la proliferación, o la diferenciación celular o ambas.
2. Reguladores negativos que inhiben la proliferación, la diferenciación o ambas.

Los FCs también ejercen efectos metabólicos en la célula diferenciada; esto es, promueven su funcionamiento como célula especializada. Por otro lado, algunos tipos celulares responden de manera diferente al mismo factor de crecimiento dependiendo de su estado de diferenciación.

Los FCs. se sintetizan en el retículo endoplásmico en forma de grandes moléculas precursoras: pre-pro-factores o pro-factores; luego se almacenan, en forma de gránulos, en el aparato de Golgi; allí se realiza el procesamiento de los pre-pro-factores y de los pro-factores en factores. Finalmente, los gránulos son vertidos al líquido extracelular mediante exocitosis.<sup>5</sup>

Al ingresar al líquido extracelular ya sea intersticial o plasmático los FCs se fijan, rápidamente, a proteínas que impiden su degradación y que se denominan: Proteínas Transportadoras o de Unión (Binding Proteins o BP). Al igual que las hormonas, los FCs sólo ejercen efectos fisiológicos cuando no están unidos a las BP y, en consecuencia, pueden unirse fácilmente a los receptores de las células blanco.<sup>5</sup>

### **2.4.2 MECANISMO DE ACCIÓN**

Al igual que otros mensajeros químicos los FCs ejercen sus efectos, inicialmente, mediante la unión a receptores específicos ubicados en la membrana celular.

Por lo general, estos receptores son enzimas que catalizan la fosforilación de las proteínas en tirosina, por lo que se las denomina tirosina-quinazas (TK); o hay otros tipos de receptores que también son quinazas pero en serina y treonina. Las TK inician reacciones en cascada, que además son ramificadas. Por lo general, la unión entre receptor y ligando lleva a la autofosforilación y activación de la enzima receptora. El receptor activado se une a proteínas citoplasmáticas que inician una cascada, que culmina con la fosforilación de proteínas, que a su vez fosforilan factores de transcripción cuya activación determina que se modifique la expresión de ciertos genes, y produzcan una respuesta celular trófica (proliferación y diferenciación celular) o metabólica (función celular especializada), última etapa de la serie de reacciones.<sup>5,12</sup>

### **2.4.3 FUNCIONES DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO EN LOS CONDROCITOS.**

Tales efectos en los condrocitos, varían tanto *in vivo* como *in vitro*, en función de la especie animal, la edad de los sujetos, etc. En general, estimulan la síntesis de los componentes de la MEC del cartílago, inhiben las proteasas y activan los sistemas de inhibición de éstas. Sin embargo, en condiciones basales la mayoría de los FCs no tienen ningún efecto sobre la síntesis de PGs o la inhiben.<sup>5</sup> Pero no todos los fenotipos celulares tienen los mismos receptores, debido a estos fenómenos el efecto de los FCs no será el mismo en todos los tejidos ni en todas las situaciones. A continuación se describen las principales familias de factores de crecimiento que intervienen en la biología del cartílago.

### **2.4.4 FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO TIPO INSULINA (IGF)**

El sistema del IGF comprende los factores de crecimiento IGF-I, IGF-II y la propia insulina, sus receptores y una serie de proteínas denominadas IGFBPs, que regulan la disponibilidad de los mismos.

La mayoría de los FCs son sintetizados por el megacariocito, pero el IGF-I y la proteína que modula su actividad biológica, IGFBP-3 (insulin growth factor binding



proteín -3) se sintetizan en el hígado y se liberan al torrente circulatorio donde son las plaquetas las encargadas de captar el factor por endocitosis y almacenarlo en los gránulos alfa.

El IGF es el factor de crecimiento del que mejor se conoce su actividad sobre la proliferación y desarrollo de los condrocitos del cartílago y de su crecimiento.

Ejerce procesos anabólicos tanto en fases del desarrollo como en etapas adultas, favoreciendo la síntesis de proteoglicanos y colágeno II.

Por otro lado el IGF-I estimula la síntesis de integrinas alfa 3 y 5 en la superficie de los condrocitos y favorece la adhesión de éstos a la fibronectina y al colágeno II.<sup>5,13,14</sup>

Los condrocitos del cartílago articular expresan receptores para el IGF-I y las acciones de los IGFs sobre ellos dependen de los niveles del factor y de su receptor, de la afinidad y disponibilidad del propio receptor y de IGFBP.

Los factores de crecimiento tipo insulina, son factores endocrinos circulantes en el torrente sanguíneo que se unen a receptores específicos para IGF1R (tirocinasa) e IGF2R (manosa 6- fosfato).

#### **2.4.5 FACTOR INHIBIDOR DE LA LEUCEMIA (LIF)**

Se trata de un factor de crecimiento con actividad pleiotrófica que estimula la liberación de PG e inhibe su síntesis en cultivo. Pero existe una forma soluble de su receptor, denominada proteína ligante del factor inhibidor de la leucemia — LIFBP— que inhibe de manera dosis-dependiente la liberación de PG producida por el LIF y revierte la supresión de su síntesis.<sup>5,15</sup>

#### **2.4.6 FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DEL ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)**

El VEGF (también conocido como factor de permeabilidad vascular VPF, y vasculotropina VAS) es una glucoproteína dimérica con cuatro isoformas que son altamente específicas para los receptores VEGF-1,-2,-3. Su peso molecular es de 46 KD. Los receptores de VEGF pertenecen a la familia de los receptores tirocinasa, que inician la cascada al dimerizarse.<sup>14,16</sup> La activación de los receptores de VEGF (VEGFR) también resulta en señalización indirecta para el inicio de la adhesión y la agregación de las integrinas a las proteínas de la matriz extracelular.

El cartílago normal carece de vasos y ello es debido, al menos en parte, a que los condrocitos producen factores inhibidores de la proliferación de células endoteliales y la angiogénesis de acuerdo con su estado de diferenciación y de la presencia de MEC. Sus receptores se expresan en las placas de crecimiento de las vértebras y en las costillas.<sup>5,17</sup>

#### **2.4.7 INTERLEUCINAS (IL)**

Representan el otro gran sistema implicado en la regulación del metabolismo del cartílago, y que en líneas generales desempeñan acciones opuestas a los factores de crecimiento. Las más importantes en la biología del cartílago articular son las IL-1 e IL-6 y el TNF $\alpha$ . Sus mecanismos de acción son muy variados y posiblemente incluyen la inducción de apoptosis en los condrocitos.<sup>5</sup>

#### **2.4.8 FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- $\alpha$ )**

Es una proteína secretada por los monocitos y macrófagos activados de PM 17.000 daltons que está codificada por un gen situado en el cromosoma 6 humano.

Se han encontrado receptores para el TNF en fibroblastos, células endoteliales, adipocitos y miocitos. El número de receptores celulares no es indicativo del grado de respuesta celular a la acción de éste.

Sus acciones son variadas, dependiendo del tipo celular en el que se sitúa. En las células normales ejerce un papel estimulador. Estimula el crecimiento de los fibroblastos, los induce, junto a las células endoteliales a producir GM-CSF, y aumenta la expresión de antígenos de clase 1. Induce además la liberación de IL-1 por las células endoteliales y estimula los fibroblastos.

Por otra parte el TNF $\alpha$  estimula la producción de enzimas proteolíticos, principalmente metaloproteasas, e inhibe la síntesis de componentes de la MEC, permitiendo la degradación del cartílago. Recientemente se ha visto que la colagenasa-3 se expresa en los condrocitos durante el desarrollo y en determinadas patologías, y que su ARNm es inducido por el TNF $\alpha$ .<sup>5</sup>

#### **2.4.9 FAMILIA DEL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO (FGF)**

Son una familia de polipéptidos, de los cuales los mejor caracterizados son el FGF-1 o FGFa (ácido) y el FGF-2 o FGFb (básico).<sup>14,16,18</sup> El FGF es un polipéptido mitógeno aislado de cerebro y pituitaria, el cual ha sido demostrado que es mitógeno para células derivadas de la mesoderma en cultivo de tejidos; también ha sido detectado en el cartílago articular y es un potente mitógeno y factor de diferenciación para los condrocitos, tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>19</sup>

Sus efectos biológicos se regulan mediante los receptores de la superficie con alta afinidad. Desarrollan su actividad a partir de la tirosina-quinasa. Por otro lado, El FGFb regula la producción y degradación de los componentes de la MEC estimulando la síntesis de PG a la vez que suprime la síntesis de condroitín-6-sulfato. Además, potencia la acción de la IL-1, induce la expresión de su receptor y favorece la de colagenasa-3 en unas líneas celulares de condrosarcoma.<sup>5,10,12,20-22</sup>

#### **2.4.10 FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)**

El EGF (factor de crecimiento epidérmico) es una pequeña proteína (53 residuos de aminoácido con un peso molecular de 6.045 KDa) que estimula la proliferación de las células epidérmicas y de una gran variedad de otros tipos celulares, tanto epiteliales como no epiteliales. Esta presente en las glándulas submaxilares del ratón y similar a la estructura urogástrica humana, el cual ha sido señalado que es mitógeno para células epidermales, como también para fibroblastos y fibras musculares lisas y aumenta la síntesis de ADN en los condrocitos, dependiendo de la edad.<sup>5,14,20-23</sup>

Es mitógeno para los condrocitos articulares y sobre los constituyentes de la MEC puede favorecer o inhibir la síntesis de PG. Además, los inhibidores de la síntesis de PG (ácido retinoico e IL-1 $\beta$ ) aumentan la densidad de receptores para el EGF, mientras que los tratamientos con potenciadores de la síntesis (hormona paratiroidea y el dibutilil-cAMP) la reducen.

Se conoce que el EGF se encuentra en el plasma y puede representar uno de los factores involucrados en la proliferación de condrocitos *in vivo*.

## 2.5 TIPOS DE CARTILAGO

Según las características y componentes de la matriz, el cartílago se clasifica en tres grandes grupos.<sup>3,4,24</sup>

- a) **Hialino:** incluye el cartílago articular, nasoseptal, costal, traqueal y laringeal.
- b) **Elástico:** incluye el cartílago auricular (de la oreja) y de la epiglotis.
- c) **Fibroso o Fibrocartílago:** se encuentra en el disco intervertebral de la espina, en el tendón y la intersección del ligamento del hueso.

Y cada uno de estos, es distinto en su estructura y naturaleza bioquímica.

### 2.5.1 CARTÍLAGO HIALINO

Es el tipo de cartílago más abundante del cuerpo. En estado fresco, el cartílago hialino aparece como una masa translúcida color blanco azulado. Con excepción de los cartílagos articulares, este tejido siempre está cubierto por el pericondrio. Su grosor varía según la función y el área de cada articulación e incluso en las distintas áreas de una misma articulación (Fig. 5).

Las células cartilaginosas o condrocitos se encuentran en las lagunas de la matriz; las células jóvenes son aplanadas o elípticas, con su eje mayor paralelo a la superficie. Hacia el interior se hacen ovals o hipertroficadas y se hallan en los nidos celulares o grupos isogénicos. Las células cartilaginosas maduras se encuentran en general hacia el centro de la masa cartilaginosa.



Fig. 5 Cartílago Hialino

### 2.5.2 CARTÍLAGO ELÁSTICO

Este es semejante al cartílago hialino, excepto que tiene abundantes fibras elásticas en su matriz, además de muchas fibras colágenas delgadas y elastina. La matriz es amarillenta en estado fresco, por la presencia de fibras elásticas y es más opaca que el cartílago hialino, del cual es una modificación. Las células del cartílago elástico son similares al cartílago hialino, y están alojadas en lagunas

aisladamente o en grupos isogénicos de 2 a 4; presentan menor acumulación de grasa y glucógeno que las del cartílago hialino. También esta rodeado por el pericondrio (Fig. 6).

Las fibras elásticas forman una red más o menos densa en las porciones mas profundas de la matriz y son menos abundantes en la periferia del cartílago, a partir de la cual se les puede seguir hasta el pericondrio circundante. Este tipo de cartílago se encuentra en los lugares en que se necesita sostén con flexibilidad, como el conducto

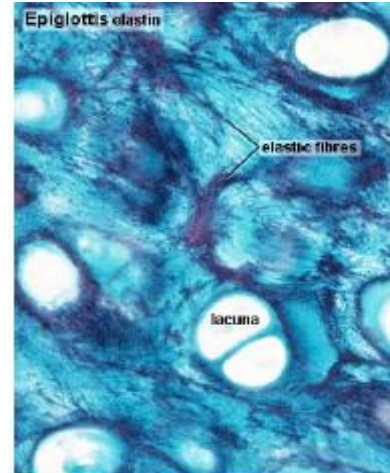


Fig. 6 Cartílago Elástico

auditivo externo, pabellón auricular, trompa de eustaquio, epiglottis y algunos cartílagos de la laringe.

### 2.5.3 FIBROcartÍLAGO

Este tipo de cartílago contiene pocas células, su matriz tiene abundante colágeno tipo I y II, la cual esta agrupada en haces, también su matriz es rica en condroitín sulfato y dermatan sulfato; presenta una gran resistencia a las tracciones y compresiones, por lo que, se presenta donde se necesita apoyo firme. Nunca se presenta solo, sino que se fusiona gradualmente con el cartílago hialino vecino o con el tejido fibroso denso (Fig. 7). El fibrocartílago es un tipo transicional entre el cartílago hialino y el tejido conectivo fibroso denso de tendones y ligamentos, sus células tienden a agruparse en



Fig. 7 Cartílago Fibroso

cápsulas separadas unas de otras por gruesos haces de fibras colágenas. Las células están encerradas en cápsulas de matriz cartilaginosa hialina. No hay un verdadero pericondrio. Muestra una cantidad escasa de matriz y tiene haces de colágena tipo I, que se tiñen en forma ácido-fila. Los condrocitos están alineados

muchas veces en hileras paralelas alternadas con haces gruesos y burdos de colágena, y son las responsables de la fuerzas de tensión que soporta este tejido.

## **2.6 FISIOPATOLOGIA DEL CARTILAGO Y TERAPIA CELULAR**

Actualmente existe una alta incidencia de patologías causadas por la progresiva destrucción del cartílago hialino y elástico, ya que el cartílago tiene una capacidad de reparación limitada y las lesiones a este nivel generan un tejido del tipo fibrocartilaginoso que no reproduce las características fisiológicas, morfológicas y mecánicas necesarias para mantener una viabilidad celular, generando un daño progresivo<sup>1</sup>. Al parecer estos cambios están relacionados con la edad, ya que hay una disminución del número de condrocitos por mm<sup>3</sup>, y por lo tanto una disminución de la actividad de síntesis de las macromoléculas de la matriz extracelular.

Además de estos problemas existen las patologías por traumas adquiridos o por defectos congénitos en los diferentes cartílagos, como en el auricular, nasoseptal, articular, traqueal, etc.<sup>7,22,25-27</sup> Por lo que, numerosas técnicas han sido utilizadas con el objetivo de restituir o regenerar el tejido dañado.<sup>1,28</sup> Estas técnicas o terapias celulares incluyen:

- a) **Transplante autólogo o autoinjerto:** Consiste en sustituir una parte de la articulación afectada por otra que tenga la misma función; esta proviene del mismo individuo y es uno de los mejores métodos quirúrgicos; pero a pesar de que el tejido es repuesto, el problema de la deficiencia de su función no se ha resuelto, y nada mas se puede extraer una pequeña porción y el sitio donde se extrajo el implante, se deja dañado.
- b) **Transplante alogénico o aloinjerto:** Aunque con el desarrollo de agentes supresores del sistema inmune, se ha prolongado la era del aloinjerto (proveniente de un individuo genéticamente diferente), el número de donadores con el mismo tipo de HLA (por sus siglas en inglés Human Leukocyte Antigen) es muy limitado, y además se corre el riesgo de una posible transmisión de algún virus como el HIV o hepatitis al receptor o en dado caso, el rechazo del órgano transplantado.<sup>29</sup>

- c) **Dispositivos mecánicos:** Son otro método para la sustitución del tejido, los cuales no pueden realizar todas las funciones de un órgano, y por lo tanto, proveen sólo un beneficio temporal; además tienen un tiempo de vida media limitada, insuficiencia para unirse al hueso, y puede causar reacciones alérgicas por la abrasión del material.

Sin embargo, la eficacia a largo plazo de estas técnicas es incierta hasta el momento.

Por otra parte, la población que requiere recibir el trasplante de un órgano o tejido ha aumentado vertiginosamente en nuestro país; la lista de espera conformada por los datos de los pacientes procedentes de las instituciones públicas y privadas muestra que la demanda rebasa por mucho el número de órganos de los que se dispone.<sup>30</sup> El desfase entre el número de donaciones y la demanda de trasplantes reproduce la situación que en otros países ya se presenta de una forma más aguda, y México no es la excepción.

Ejemplos como este existen muchos, y ante la necesidad de nuevas terapias para las aplicaciones médicas surge una nueva área denominada Ingeniería de Tejidos o lo que se le llama hoy Medicina Regenerativa,<sup>26,31</sup> con la cual se pretende restaurar los tejidos dañados, como es en el caso del cartílago, formando un injerto de condrocitos autólogos.

## **2.7 INGENIERÍA DE TEJIDOS O MEDICINA REGENERATIVA.**

La ingeniería de tejidos se define según la *Nacional Science Foundation Workshop (NSFW)* como un campo interdisciplinario de investigación con aplicaciones clínicas para restaurar, reemplazar o regenerar tejidos y/o órganos; y así tratar alguna función dañada, ya sea, por un defecto congénito, alguna enfermedad y/o trauma, y esta se utiliza en combinación de varios avances tecnológicos que van más allá de un trasplante tradicional y/o terapia.<sup>32</sup>

Además esta área, aplica los principios y métodos de la ingeniería (materiales, química de superficie, química física, matemáticas e ingeniería computacional) a los principios de las ciencias de la vida (como son biología molecular, biología celular, medicina de trasplantes, genética y cirugía), para el entendimiento de la

relación función-estructura de los tejidos normales y patológicos y al desarrollo de nuevos tejidos o “constructos” para aumentar, restaurar o mantener los sistemas biológicos existentes.<sup>31,32</sup>

Este es un nuevo campo que busca usar la combinación de células, biomateriales y factores de crecimiento para lograr la rápida regeneración o reparación de tejidos con propiedades mecánicas y bioquímicas similares a las del tejido original.

### 2.7.1 PRINCIPIOS BÁSICOS EN LA INGENIERÍA DE TEJIDOS.

Mediante la ingeniería de tejidos se han fabricado diferentes tejidos, utilizando células madre y células somáticas; sin embargo, la mayoría de estos tejidos se realizan a nivel experimental en animales<sup>31</sup> (ver tabla 2).

Ingeniería de tejidos basada en células madre	Ingeniería de tejidos basada en células somáticas
Vasos sanguíneos	Vejiga
Hueso	Cartílago (oreja, nariz)
Cartílago	Valvas de corazón
Cornea	Intestino
Esmalte de los dientes	Riñón
Músculo de corazón	Uretra
Hígado	Traquea
Páncreas	Meniscos
Tejido nervioso	Mucosa oral
Músculo esquelético	Uréter
Piel	

**Tabla 2.** Tejidos formados mediante Ingeniería de tejidos.

Independientemente del tipo de tejido, algunos de los “ingredientes básicos” para crecer nuevos tejidos *in vivo* son: células, matriz extracelular, vasos sanguíneos, comunicación intercelular e interacciones célula-matriz extracelular. Dichos componentes están bien combinados, en un espacio bien coordinado y en una fase tiempo-dependiente. Además de los ingredientes antes mencionados, otro de los prerrequisitos para la aplicación exitosa de la ingeniería de tejidos *in vivo*, es tener los conceptos quirúrgicos bien elaborados. A medida que se incrementa la complejidad de los componentes utilizados en la ingeniería de tejidos hay que



tomar las debidas precauciones para evitar un daño de las células que pueden susceptibles o de los templates bioactivos durante su implantación. Dependiendo de los conceptos específicos, un periodo previo *in vitro* puede variar de 1 día hasta varios meses. Este periodo comúnmente es usado para la expansión celular o la inducción de la diferenciación celular tejido-especifico.<sup>33</sup>

En general, en la ingeniería de tejidos se utilizan biomateriales modificados que en conjunto con los componentes celulares mimetizan a un tejido natural, como resultado se forma un material biológico funcional para la restauración física y/o el remplazamiento de los defectos tisulares; superando a los autoinjertos o aloinjertos.<sup>34</sup>

Por lo que, mediante la ingeniería de tejidos se podría formar un “neo-cartílago”, el cual tendría muchas aplicaciones en el Laboratorio de Ingeniería de Tejidos de este hospital; pero, primero se debe de estandarizar un método de cultivo y seleccionar un biomaterial que nos sirva de sostén para sembrar los condrocitos, y estos puedan proliferar y formar un tejido, además de que les permita sintetizar proteínas como son: proteoglicanos y colágena tipo II, los cuales son marcadores de la estabilidad fenotípica de estas células.

### **2.7.2 BIOMATERIALES.**

El termino biomaterial comprende un amplio rango de sustancias de origen natural y sintéticas, las cuales se utilizan en amplio espectro para aplicaciones medicas.<sup>32</sup> Así, los biomateriales se pueden definir como sustancias contenidas en drogas o alimentos utilizados para uso terapéutico o de diagnóstico o bien en algunos casos se definen como materiales compuestos de derivados biológicos o sintéticos para aplicaciones clínicas.<sup>35</sup>

El desarrollo de nuevos biomateriales requiere de los conocimientos conjuntos de ingenieros, biólogos y físicos. En años recientes, se ha incrementado el desarrollo de nuevos biomateriales, no artificiales (obtenidos de animales o humanos) y artificiales de los cuales deben ser totalmente biocompatibles, reabsorbibles y no reabsorbibles y de tal manera que la implantación de nuevos biomateriales en la clínica se esta expandiendo enormemente (Tabla 3).

Matrices artificiales absorbibles	Matrices artificiales no absorbibles	Matrices no artificiales
Poligalactina	Polivinil alcohol	Esponjas de colágeno de tipo I
Ácido poliláctico	Nylon	Menisco
Ácido poliglicólico	Poliéster	Tejidos embrionarios
Poliuretano	Politetrafluoroetileno	Hueso descalcificado
	Fibras de carbono	Fibrina polimérica
	Poliétileno	Ácido hialurónico

**Tabla 3.** Los materiales utilizados en la Ingeniería de Tejidos.

Todos los biomateriales utilizados en la ingeniería de tejidos deben cumplir con ciertos prerrequisitos, tales como no ser tóxicos o carcinogénicos, que sean biocompatibles, esterilizables y con flexibilidad quirúrgica, además de tener ciertas propiedades mecánicas como ser permeables, estables, elásticos, y reabsorbibles a medida que se reemplaza el tejido. Los biomateriales permiten la adherencia celular y poseen el potencial de transportar agentes biomoduladores como los factores de crecimiento y material genético.<sup>36</sup>

Mediante técnicas de hibridación se ha logrado integrar la matriz extracelular a los polímeros, por lo que se le denomina “scaffold” o templete. Una de las principales proteínas utilizada para combinarse con los polímeros es la colágena, la cual tiene propiedades adhesivas para las células, sin embargo, otros componentes de la matriz extracelular pueden recubrir la superficie de los polímeros e incrementar las uniones celulares más específicas entre polímero-célula, como las glicoproteínas que semejan a la fibronectina, vitronectina y laminina, la secuencia péptido semejante a arginina-glicina-ácido aspártico (RGD).<sup>34,37</sup>

Hoy en día, siguen diseñándose y sintetizándose muchos biomateriales para ser utilizados en el área médica en un futuro, así por ejemplo algunos biomateriales están diseñados para cambiar de una forma temporal a una permanente por un cambio de temperatura.<sup>38</sup>

Uno de los biomateriales que se está utilizando en este laboratorio y que se podría utilizar como soporte para los condrocitos, es el ácido poliglicólico (PGA); el cual es un polímero sintético, cuyo peso molecular es de 69 kDa; está formado por fibras organizadas en forma de red, con un diámetro de 13- $\mu$ m, y tiene un 97% de porosidad. (Fig 8) El PGA pierde su integridad mecánica en alrededor de dos

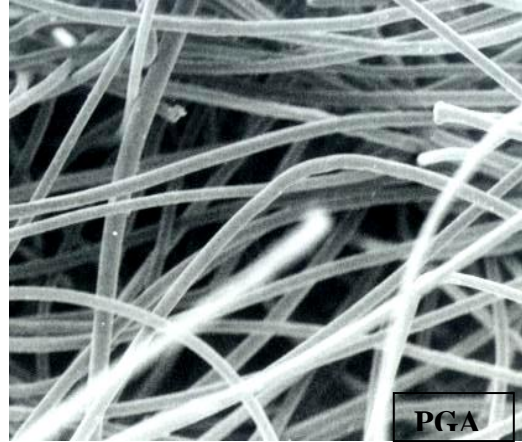


Fig. 8 Estructura del PGA

semanas y disminuye su masa a un 50%, en 4 semanas de cultivo tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>39,40</sup> Su fabricación es por vaciado en molde, y es diseñado como una red multifilamentaria orientada como una tela de trama, para formar una malla no ondulada de fibras interconectadas y prensada entre placas calientes para mejorar su estabilidad mecánica. La malla es prensada en discos de 5-10mm de diámetro, 1, 2, o 5 mm de espesor. Finalmente es esterilizada con óxido de etileno por 12 horas y secada por al menos 24hs.

Otro biomaterial es el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA), el cual es un polímero ampliamente utilizado como dispositivos terapéuticos por su biodegradabilidad y biocompatibilidad.<sup>39,40</sup> Se prepara en diferentes proporciones de ácido láctico y ácido glicólico, las cuales van desde una dilución 50:50 hasta un 75:25 respectivamente; se degrada por hidrólisis en sus uniones éster en presencia de agua y la relación que se utiliza más frecuentemente es 50:50; y se ha comprobado que se degrada alrededor de 2 meses.<sup>40</sup>

Con la unión del PGA y PLGA se puede formar un co-polímero el cual permite que el PGA aumente su adhesión celular.

### 2.7.3 CULTIVO DE CONDROCITOS

Al igual que ocurre con otros tipos celulares, cuando los condrocitos se aíslan y se cultivan en monocapa pueden aumentar de forma notable, su capacidad de síntesis, por lo que pueden tener ciertas aplicaciones clínicas especialmente en ingeniería de tejidos y en la terapia génica.<sup>26,41</sup> Sin embargo, el cultivo de

condrocitos *in vitro* no esta exento de dificultades, en particular, es su tendencia a desdiferenciarse en cultivos en monocapa, por lo que con el paso del tiempo su fenotipo cambia progresivamente a una morfología de fibroblastos al realizar diferentes resiembras o subcultivos.<sup>27,42-46</sup>

Las causas de la desdiferenciación de los condrocitos son: su trasplante de un medio condrotrópico en el que están sometidos a una serie de factores de crecimiento y la carencia *in vitro* de la matriz tridimensional que ellos mismo secretan; por lo que, la ausencia de estos elementos conduce a una adaptación al nuevo medio y se produce esta transformación.<sup>27,44,45</sup>

La desdiferenciación es evitable por varios métodos diferentes o con la combinación de varios de éstos, tal es el caso de:

1) Cultivo a alta densidad ( $2 \times 10^5$  células por  $\text{cm}^2$ ), es el más empleado y vendría a resolver parte del problema, dado que son capaces de mantener el fenotipo condrocitario hasta que son subcultivados. Aun así, y a pesar de sus ventajas, los condrocitos presentan en ellos una expresión de colágeno tipo II más lábil que la de agrecano.

2) Inclusión de los condrocitos en matrices tridimensionales que simulen, de alguna forma, el ambiente primordial del que han sido extraídos, y se han utilizado como matrices a geles de colágeno, agarosa, alginato, esponjas de colágeno y polímeros sintéticos o biomateriales;<sup>47</sup> estos son capaces de mantener su fenotipo, pero la desventaja es su crecimiento celular lento.

3) Un método paliativo es el tratamiento de las células con factores de crecimiento que retrasan el proceso de desdiferenciación.<sup>12,20,41,43</sup>

Aunado a esto, las muestras de cartílago presentan una enorme variabilidad en sus respuestas, por lo que el uso de biorreactores es importante para mantenimiento del cartílago y para valorar los diferentes procedimientos al que es sometido este tejido.<sup>31,51</sup>

#### **2.7.4 BIORREACTORES.**

Los biorreactores tienen una función importante en la ingeniería de tejidos, ya que gracias a estos sistemas es posible la reproducibilidad y se pueden controlar los factores ambientales específicos.<sup>49</sup> Mediante estos sistemas se realizan estudios

controlados con el objetivo de entender los efectos físicos, químicos y biológicos. Los biorreactores se han empleado para el cultivo de bacterias o células de mamíferos en un ambiente monitoreado, controlado y bajo ciertas condiciones operacionales como son: pH, temperatura, oxígeno y suministro de nutrientes a niveles industriales o gran escala (Fig 9). Por lo tanto, los conocimientos obtenidos de



Fig. 9 Cultivos en el biorreactor.

los cultivos celulares en monocapa no aplican para el cultivo de tejidos en tercera dimensión y por lo tanto, cada tipo de neot Tejido creado *in vitro* (piel, hueso, cartílago) requiere de un diseño especial.<sup>31</sup>

## **2.8 ANTECEDENTES**

La formación de cartílago mediante ingeniería de tejidos utilizando condrocitos articulares depende de las condiciones y la duración de los cultivos utilizados *in vitro*, para así lograr una mejor calidad del neot Tejido (por ejemplo: mejor composición bioquímica e histomorfológica) y de función (mecánica y porcentaje de biosíntesis).<sup>49</sup> Estudios realizados por el grupo del Dr. Atala, demostraron que es posible formar cartílago articular tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando condrocitos de cartílago hialino bovino como fuente celular y una matriz a base de un polímero de ácido poliglicólico (PGA).<sup>48</sup> Después de seis semanas de cultivo, se formó un tejido completamente cartilaginoso, estando en completo equilibrio la cantidad de glicosaminoglicanos y colágeno.<sup>48,49</sup> Aunque algunos investigadores consideran que el factor más importante para la formación del cartílago por ingeniería de tejidos es la presencia de células biosintéticas activas, capaces de proliferar y rellenar los espacios existentes en el polímero y formar cartílago progresivamente.<sup>50</sup>

Estudios realizados recientemente demostraron que existen dos parámetros muy importantes para la generación de cartílago: la selección de un tipo celular apropiado y la concentración celular. Así como también que, existe una correlación entre el número celular inicial, el grosor y peso del cartílago neo-formado.<sup>51</sup> Un periodo apropiado de crecimiento se correlaciona con un incremento de la

proliferación de matriz cartilaginosa y un incremento en las distancias intercelulares. El balance entre estos dos parámetros es vital para tener éxito en la formación de cartílago por ingeniería de tejidos.<sup>52</sup>

La devolución o remisión de los condrocitos a un ambiente condrotrópico (fundamentalmente su situación en matrices tridimensionales) puede conducir a la rediferenciación de estas células, con la recuperación de la expresión génica característica de ellas y la vuelta a un fenotipo típicamente condral.<sup>22,41,43,48</sup>

La estimulación de los condrocitos en cultivo *in vitro* con factores de crecimiento aumentan su proliferación como por ejemplo: en presencia de IGF-I producen una mayor síntesis de los proteoglicanos, que coincide con un aumento en la expresión de su receptor; el FGFb o FGF-2 y EGF aumenta la proliferación de condrocitos de oreja de conejo o articulares, expuestos a medio suplementado con suero;<sup>53</sup> además que el EGF se encuentra en el plasma y puede representar uno de los factores involucrados en la proliferación de condrocitos *in vivo*.<sup>20</sup> En estos artículos varían en las concentraciones de los recombinantes, ya que estimulan a los condrocitos con concentraciones que van desde 5ng/mL, 10ng/mL hasta 100 ng/mL. e inclusive en concentraciones de µg.<sup>13,19-21,43</sup>

### **3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Al no encontrar un tejido que pueda reemplazar al cartílago, tanto en su estructura, como en su flexibilidad, todas las investigaciones se han enfocado en el intento de encontrar una manera de poder “fabricar” neo cartílago *in vitro*, con la finalidad de sustituir los defectos causados en este, y así conseguir una integridad anatómico-funcional completa tanto en lesiones de la laringe, traquea, pabellón auricular y oído medio con el cartílago elástico, al igual que articulaciones, nariz y formación de hueso con el cartílago hialino.

Sin embargo, el uso de los condrocitos no se limita a la formación de tejidos ya que, como se ha visto los condrocitos tienen una facilidad de crecimiento, cultivo, y expansión celular *in vitro*; además de que es un tejido idóneo para transplantarse, ya que es aneural, relativamente avascular, e inmunoprivilegiado, nutriéndose fundamentalmente del líquido sinovial, y se ven protegidos del sistema inmune por la matriz circundante lo que les permite sobrevivir durante años, sin necesidad de inmunosupresión.<sup>48</sup>

Por todo esto, su utilidad es muy viable en el campo de la urología, ya que, en recientes estudios se ha demostrado que pueden ser usado para formar el tracto genitourinario para el tratamiento del reflujo vesicouretral y la incontinencia urinaria en modelos animales y en humanos<sup>48,50</sup>; además de que puede ser utilizado en prótesis testiculares en pacientes con ausencia testicular unilateral o bilateral causada por problemas congénitos (criptorquidia, hipogonadismo, hermafroditismo) ó adquiridos (traumas, cáncer testicular), los cuales son problemas que se presentan en urología pediátrica de este hospital. El principal inconveniente del cultivo de condrocitos, es el de realizar varias resiembras, para obtener una cantidad apropiada para sembrar sobre el templete o matriz tridimensional, esto conlleva a enfrentarnos a un problema común en este linaje celular que es la desdiferenciación hacia un linaje fibroblástico, lo cual cambia la síntesis de colágeno tipo I en lugar de la síntesis de colágeno tipo II. Por lo que sea visto, la necesidad de utilizar factores de crecimiento para que sea más rápida su expansión en menos pasajes y así evitar su desdiferenciación.

Los FCs en general, ejercen un efecto anabólico y catabólico sobre los condrocitos y puede potenciarse entre ellos<sup>54</sup>, por lo que se han relacionado

con la producción de matriz extracelular (MEC), la cual sufre un proceso permanente de renovación que determina el grado de actividad condrocitaria.

En cultivos *in vitro*, se ha observado que la adición de factores de crecimiento exógenos como el IGF-1, el EGF y el FGF básico (FGF-2) inducen la proliferación y la síntesis de ciertas proteínas de matriz extracelular de condrocitos,<sup>59-62</sup> ya que tienen un efecto anabólico a comparación del TNF- $\alpha$  y LIF que tienen un efecto catabólico sobre los componentes de la matriz.

Debido a esto, se propuso establecer un método de cultivo, con un adecuado equilibrio entre la rápida proliferación de los condrocitos y evitando su desdiferenciación mediante la presencia de FCs.

Por lo tanto, los condrocitos estimulados con IGF-I, EGF y FGFb, tendrían como ventajas:

- \* Estimular la proliferación celular, lo cual evitaría su desdiferenciación a fibroblastos, además evitaría la síntesis de colágena tipo I.
- \* Obtener un neocartílago con mejores características morfológicas en un tiempo de cultivo más corto, en comparación con el cultivado en condiciones normales de cultivo (medio DMEM-F12 con 10% SFB).

Por lo que, se han planteado las siguientes preguntas de investigación:

¿Incrementaran la proliferación los factores que tienen un efecto anabólico que los que tienen un efecto catabólico?

¿La estimulación de los condrocitos con factores de crecimiento incrementa o disminuye la síntesis de proteínas en membrana o matriz extracelular?

¿Que cartílago es mejor el hialino o el elástico para su uso en el laboratorio de ingeniería de tejidos?

¿Qué diferencias existen en la utilización de uno y otro?

¿Cual de los factores de crecimiento utilizados será el más conveniente para su uso en laboratorio de ingeniería de tejidos?

¿Qué concentración de los factores de crecimiento será la mas apropiada para utilizar?



#### **4.- OBJETIVOS.**

- 1) Obtener biopsias y disgregar las células de tejido auricular y costal de conejo.
- 2) Cultivar los condrocitos a diferentes concentraciones de factores de crecimiento.
- 3) Realizar una cinética de proliferación de los condrocitos en presencia y ausencia de los factores de crecimiento IGF-I, EGF, y FGFb.
- 4) Caracterizar las células condrocíticas mediante inmunohistoquímica y citometría de flujo.
- 5) Determinar el efecto del IGF, EGF y FGFb en la expresión y síntesis de proteínas de condrocitos hialinos y condrocitos elásticos *in vitro*.
- 6) Analizar la expresión de proteínas de superficie y membrana en los condrocitos estimulados con los factores de crecimiento.

## **5.- HIPÓTESIS.**

Se ha descrito que los condrocitos cultivados *in vitro*, responden al efecto de factores de crecimiento, como el EGF, FGFb, IGF-1; entonces, si los cultivos de condrocitos se estimulan con estos factores de crecimiento se incrementara la proliferación, la síntesis y/o expresión de las proteínas de matriz extracelular, y por lo tanto, mejoraran las características morfológicas del cartílago.

## **6.- MATERIALES Y MÉTODOS.**

### **1) Obtención del tejido auricular y costal de conejo.**

Se utilizaron conejos machos New Zeland, púberes de aproximadamente 7 semanas de vida extrauterina y un peso aproximado 1.7 kg. Fueron anestesiados por vía muscular y arterial con Ketamina y pentobarbital a una dosis de 20 mg/kg y 40 mg/kg respectivamente. Se utilizó el antibiótico Gentamicina pre y post-operatorio a una dosis de 13 mg/kg y 5 mg/kg respectivamente.

Los conejos fueron cuidados por el personal capacitado del Bioterio del Hospital Infantil Federico Gómez, que incluye alimento, agua y limpieza diaria a libre consumo.

### **2) Disgregación de tejido cartilaginoso mediante tripsina-EDTA y colagenasa tipo II.**

Las biopsias de cartílago hialino y/ó elástico fueron transportadas en PBS 1X frío con antibiótico-antimicótico (GIBCO) frío por separado al laboratorio en tubos cónicos Falcon de 50mL. En condiciones de esterilidad, fueron lavadas exhaustivamente en tres ocasiones con PBS 1X estéril, se les retiró la capa que recubre el cartílago (pericondrio), se cortaron en pequeñas porciones de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> y fueron disgregados por separado en presencia de 5 mL de tripsina-EDTA (GIBCO) por 30 minutos a 37°C (para eliminar los fibroblastos), transcurrido el tiempo, se desechó el sobrenadante, se lavaron tres veces con PBS 1X, se les adicionó 5 mL de colagenasa tipo II (1 mg/mL) (ICN Biomedicals Inc) en DMEM-F12 (GIBCO) y se mantuvieron en agitación constante por 3 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

El disgregado celular se centrifugó por 10 min. a 2000 r.p.m (SORVALL), el botón celular se resuspendió en medio DMEM-F12 fresco y las células condrocíticas fueron sembradas a una concentración celular de 2 x 10<sup>5</sup> células/cm<sup>2</sup> en cajas de petri de 100 mm x 20 mm (CORNING) con 10 mL de DMEM-F12 (GIBCO) al 10% de suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO).

### **3) Cultivo y crecimiento de las células condrocíticas.**

Las células fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM-F12 suplementado con Suero Fetal de Bovino al 10%, antibiótico-antimicótico 1% (GIBCO), en una

incubadora (REVCO) a 37°C, humedad saturada y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez que los condrocitos alcanzaron una confluencia celular del 80%, se procedió a resembrarlos o sembrarlos en presencia de los diferentes los FCs.

#### **4) Cultivo de condrocitos a diferentes concentraciones de factores de crecimiento.**

Para observar el día máximo de proliferación y encontrar la concentración adecuada de cada uno de los FCs se hizo la siguiente prueba. En una placa de 96 pozos fondo plano (COSTAR) se sembraron  $50 \times 10^5$ /mL condrocitos en presencia-ausencia de cada uno de los siguientes FCs: EGF (SIGMA), FGFb (SIGMA), VEGF (SIGMA), TNF- $\alpha$  (BIODESIGN), LIF (SIGMA) e IGF-1 (BIOSOURCE). Las concentraciones utilizadas fueron de 5, 10 y 20 ng/mL y se evaluó la viabilidad por la prueba del MTT (SIGMA) al día 7. El MTT es un colorante amarillo soluble en agua, el cual es reducido por las células vivas a formazan un colorante púrpura e insoluble en agua.

La evaluación se hizo de la siguiente manera: a tres pozos con condrocitos en presencia-ausencia del recombinante correspondiente a cada concentración, se les adicionó 40  $\mu$ L de la solución de MTT-PBS (5mg/mL) y fueron incubadas 3-4 horas a 37°C; trascurrido el tiempo, se retiró el medio-solución de MTT-PBS, entonces los pozos se lavaron con PBS 1X y se les agregó 200 $\mu$ L de alcohol isoamílico-HCl (0.04%) (SIGMA), se resuspendió bien el precipitado azul hasta que se disolvió y se tomó una alícuota de 30  $\mu$ L para ser leídos en un lector de placas para ELISA (Tecan GENios) a 595 nm.

#### **5) Cinética de proliferación de los condrocitos en presencia de los factores de crecimiento mediante el método de MTT.**

En una placa de 96 pozos fondo plano (COSTAR) se sembraron  $50 \times 10^5$  condrocitos/mL en presencia-ausencia de cada uno de los siguientes FCs: EGF, FGFb, VEGF, TNF  $\alpha$ , LIF e IGF-I. Tres pozos correspondientes de recombinante fueron evaluados a los días 1, 3, 5, 7, 9, 11 y 13. Brevemente, se adicionaron 40  $\mu$ L de la solución de MTT-PBS (5mg/mL) y se incubaron 3-4 horas a 37°C.; trascurrido el tiempo se retiró la solución de MTT-PBS, se lavó con PBS 1X y posteriormente se agregaron 200 $\mu$ L de alcohol isoamilico-HCl (0.04%), se resuspendió bien el precipitado azul hasta que se disolvió y

finalmente se tomó una alícuota de cada condición, las cuales fueron leídas a 595 nm en un lector de placas para ELISA (Tecan GENios).

## **6) Caracterización de los condrocitos mediante inmunohistoquímica (colágena II, $\rho$ -selectina, S-100, CD-14, y agrecanos).**

Para la caracterización de los condrocitos por inmunohistoquímica (IHQ) se utilizó el kit En vision+® System-HRP (DAB) (DakoCytomation). Brevemente, se sembraron  $1 \times 10^5$  cél./pozo en medio DMEM/F12 en presencia de SFB 10% en una cámara Lab-Teck de 8 pozos (Nalge Nunc Int.), una vez que las células formaron una monocapa, fueron fijadas con acetona fría por 1 min.

Posteriormente, fueron incubadas con el bloqueador de peroxidasa endógena 5 min., se lavaron dos veces con agua destilada y se volvieron a incubar otros 5 min. ahora con el bloqueador universal 1X (Biogener 10X), se incubaron por 45 min con el siguiente panel de anticuerpos monoclonales/policlonales primarios: anti-S100 (SIGMA), anti- $\rho$ -Selectina (DakoCytomation), anti-colágena II (CHEMICON), anti-agrecanos\* (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.). Para lo cual, se utilizaron diluciones de 1:100, transcurrido el tiempo, se lavaron con PBS-Tween20 (0.01%) en tres ocasiones, se incubaron por 30 min. con el polímero de Dako (el cual, tiene adsorbido un anticuerpo secundario y la HRP) y se lavaron nuevamente en 3 ocasiones con PBS-Tween20 (0.01%), finalmente, se agregó el revelador DAB por 1 min., se lavaron en 4 ocasiones con PBS-Tween20 (0.01%) para eliminar el exceso del cromógeno; y se realizó una contratinción con Hematoxilina de Harris y se observaron en el microscopio de luz visible.

\*Para los pozos donde correspondían al anticuerpo antiagrecanos: no se utilizó el Kit de DAKO, por lo que las células condrocíticas después de incubarse con el anticuerpo primario anti-agrecano fueron incubadas con un anticuerpo secundario Multi Link (DakoCytomation) a una dilución 1:100 por 30 min., transcurrido el tiempo se lavaron nuevamente en 3 ocasiones con PBS-Tween20 (0.01%) y se incubaron con Streptavidina-Biotina (DakoCytomation) a una dilución 1:300 por 30 min., transcurrido el tiempo se lavaron nuevamente en 3 ocasiones con PBS-Tween20 (0.01%) y finalmente se agregó el sustrato DAB por 1 min. se lavaron en 4 ocasiones con PBS-Tween20 (0.01%) para eliminar el exceso de el cromógeno, después se realizó una contratinción con

Hematoxilina y fueron observadas en el microscopio de luz visible (Zeiss, Olympus B071).

**7) Caracterización de los condrocitos tratados con el EGF, IGF-I, y FGFb, mediante inmunohistoquímica (colágena II,  $\rho$ -selectina, S-100, CD-14, y agrecanos).**

Una vez sembradas las células a una concentración de  $1 \times 10^5$  cél./pozo con medio DMEM/F12 en presencia de SFB al 10% en una cámara Lab-Teck de 8 pozos, fueron estimuladas con FGFb (5ng/mL), EGF (5 ng/mL) e IGF-I (10 ng/mL) y se fijaron al cuarto día, fueron caracterizaron con los anticuerpos antes mencionados, usando el mismo procedimiento.

**8) Caracterización de los condrocitos mediante citometría de flujo (FACS). (colágena II,  $\rho$ -selectina, S-100, CD-14, y agrecanos).**

Para la caracterización por FACS, las células fueron despegadas del sustrato utilizando tripsina-EDTA (0.025%) y fueron lavadas dos ocasiones con PBS estéril y frío. Posteriormente, se colocaron  $2 \times 10^6$  células en 7 viales y fueron incubadas en 100 $\mu$ L de PBS-albúmina sérica bovina al 0.01% por 10 min.; transcurrido este tiempo se lavaron 2 veces con PBS frío, se incubaron con 100 $\mu$ L del bloqueador universal 1X por 5 min, después se incubaron por 45 min. a 4°C con un panel de anticuerpos: anti-S100, anti-Colágena II, anti- $\rho$ -Selectina, y anti-Agrecanos\*. Las células fueron lavadas con PBS frío dos veces e incubadas con un anticuerpo secundario anti-mouse-FITC (SIGMA), el cual reconoce específicamente la porción Fc del anticuerpo primario (dilución 1:100 por 30 min.). Transcurrido el tiempo, las células se lavaron en dos ocasiones y se centrifugaran, el botón celular se resuspendió en 1 mL y se procedió a leerlos en un FACS-Scalibur (Becton Dickinson) en el canal 2, a una longitud de onda de 520 nm.

\*El anti-Agrecanos, se incubó con un anticuerpo secundario anti-goat marcado con FITC (SIGMA) dilución 1:100 por 30 min.

**9) Caracterización de los condrocitos tratados con el EGF, IGF-I, y FGFb mediante citometría de flujo. (colágena II, p-selectina, S100, CD14, Y agrecanos).**

Es el mismo procedimiento que el anterior nada mas que ahora tratados por separado con los factores antes mencionados y caracterizados con los anticuerpos correspondientes.

**10) Formación de los polímeros PGA-PLGA**

El ácido poliglicólico (PGA) (ALBANY INTERNATIONAL RESEARCH) fue cortado en 24 trozos pequeños de 1cm<sup>2</sup> y cubiertos (rociados) de ácido poliláctico-coglicólico (PLGA) (50:50) (SIGMA), una vez cubierto toda la superficie de ambos lados y las orillas del PGA, se procedió a secar por 24 horas los polímeros PGA-PLGA para eliminar el cloroformo en el cual es disuelto el PLGA.

Después se procedió a esterilizar los polímeros.

**11) Siembra en polímeros de ácido poliglicólico (PGA)-ácido poliláctico-coglicólico (PLGA)**

Una vez que alcanzaron una confluencia del 80% los condrocitos de los primeros pasajes (del P2-P4) estimulados con los factores de crecimiento (IGF-I, EGF, FGFb) y no estimulados (medio DMEM-F12 con SFB al 10%), fueron despegados del sustrato utilizando tripsina-EDTA (0.025%) por 10-12 min. Se colocaron en tubos Falcon de 50 mL por separado y fueron centrifugados por 10 min. a 2000 r.p.m., el botón celular se resuspendió en PBS 1X y fueron lavadas una vez mas con PBS 1X frío. Finalmente, el botón celular se resuspendió en 500 µL de medio DMEM-F12 sin suero y se procedió a contar el numero de células con azul tripano (SIGMA).

Previamente los polímeros PGA-PLGA fueron hidratados en condiciones de esterilidad con el medio DMEM-F12 sin suero en un recirculador (Glas-Col) por 10-15 min., se retiró el medio y se eliminó lo mas que se pudo de la membrana succionando con una pipeta pasteur, los polímeros se colocaron en placas de petri (todo esto en condiciones de suma esterilidad) y se procedió a la siembra de los condrocitos.

Se tomó del resuspendido celular los µL necesarios para sembrar  $8.5 \times 10^6$  de cada uno de los tipo de condrocitos (elásticos y costales), tratados o no

tratados con los factores de crecimiento (IGF, EGF, FGF), se sembraron en cada polímero y se incubaron por 3 horas bajo condiciones estériles de 37°C, humedad saturada, 5% de CO<sub>2</sub>.

Posteriormente se adicionaron 10 mL de DMEM-F12 al 10% de SFB a cada una de las membranas por 24 horas. Al día siguiente se retiró el medio y se procedió a contar las células que no se adhirieron al polímero, y se colocaron las membranas en birreactores por separado, con una agitación muy suave y se cambió el medio cada tercer día, adicionándole en cada recambio la concentración adecuada de cada recombinante.

Cada uno de los polímeros se dejó por 15 días en cultivo, posteriormente se sacaron del birreactor y se fijaron en formol para hacer cortes histológicos

### ***12) Cortes histológicos y citoquímica.***

Ya fijados las muestras en formol, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes histológicos de 4 micras y el tejido se montó en portaobjetos y se procedió a teñirlos con Hematoxilina-eosina para observar su morfología y estructura, con Azul Alciano-Pas para detectar los mucopolisacaridos ácidos (totales), y la tricrómica de Mallory para observar la colágena (ver anexo).

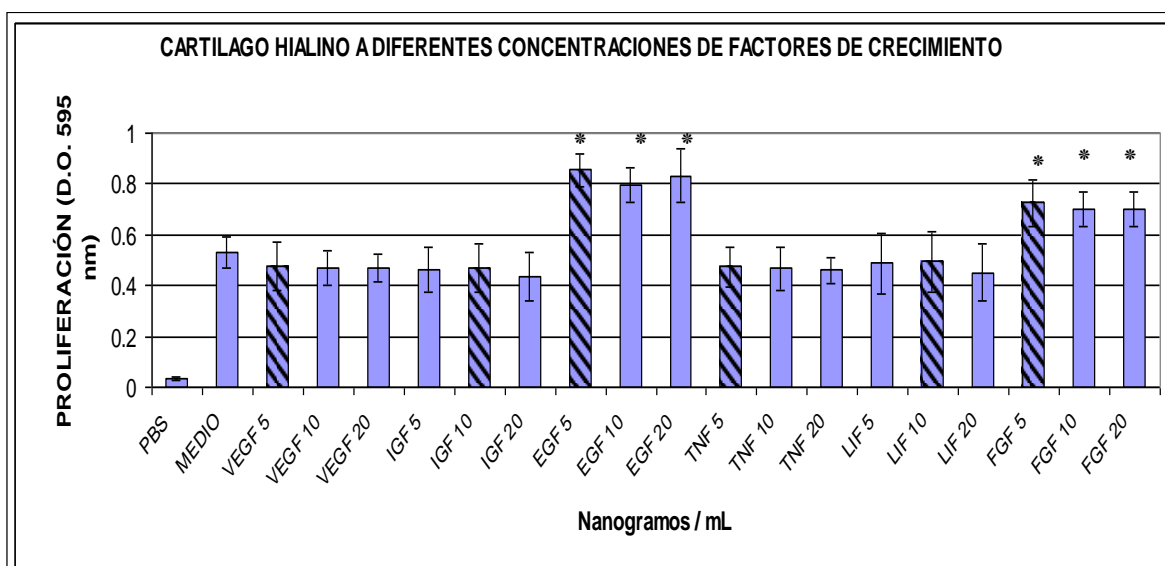


## 7.- RESULTADOS

### **CARTILAGO HIALINO Y ELASTICO CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FCs.**

Para evaluar la capacidad de los FCs de estimular la proliferación de los condrocitos de cartílago hialino y elástico; en una primera parte fueron estimulados exógenamente con 10, 30 y 50ng/mL, observándose un efecto proliferativo con concentraciones de alrededor de 10 ng/mL (datos no mostrados), por lo que se decidió manejar concentraciones de entre 5, 10 y 20 ng/mL en los siguientes cultivos en monocapa, para conocer la concentración mas adecuada para su aplicación (ver Grafica 1 y 2).

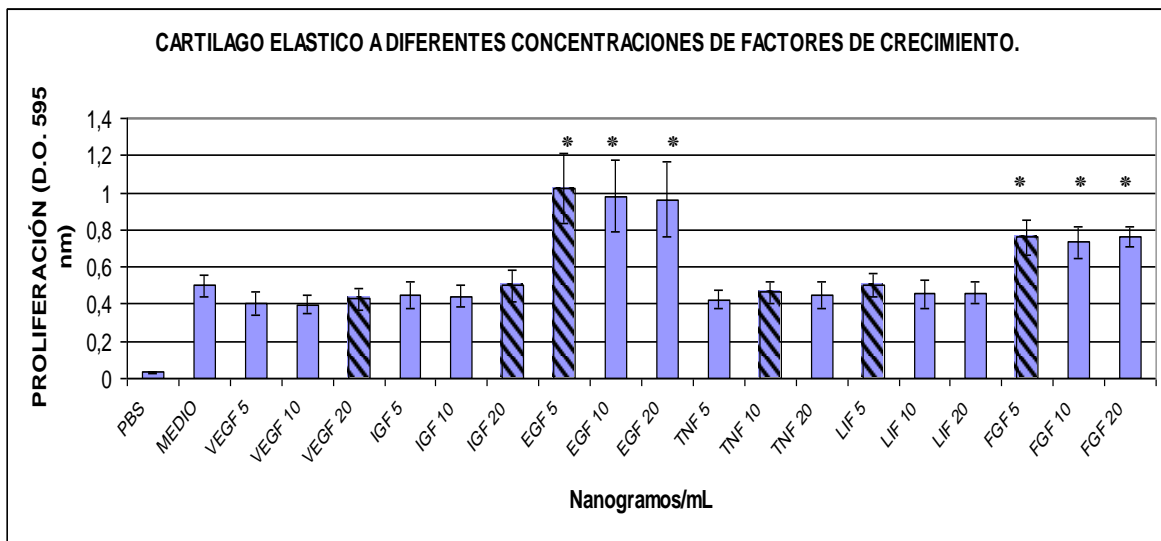
Los condrocitos fueron estimulados con VEGF, IGF-I, EGF, TNF- $\alpha$ , LIF y FGFb con diferentes concentraciones (ver materiales y métodos). Sólo el EGF y el FGFb estimularon la proliferación de los condrocitos, con 5, 10 y 20 ng/ml con una diferencia significativa proporcionada con la prueba de t-student con  $\alpha = 5\%$  y un 95% de confianza, comparado con respecto al medio sin FCs (control) a los 7 días de cultivo *in vitro* (ver gráfica 1 y anexo). Además se determinaron las concentraciones óptimas para cada uno de los recombinantes, VEGF (5ng/ml), IGF-I (10 ng/ml), EGF (5 ng/ml), TNF- $\alpha$  (5 ng/ml), LIF (10 ng/ml) y FGFb (5ng/ml).



Grafica 1. Efecto en la proliferación de los condrocitos del cartílago hialino con los factores de crecimiento. El símbolo \* indica una diferencia significativa determinada por t-student con  $\alpha=5\%$ .

También se puede apreciar en esta misma grafica que el FCs que ejerce un estímulo o un efecto mayor en la proliferación es el EGF, inclusive tiene un efecto de casi el doble que el ejercido por el FGFb.

En el cartílago elástico (grafica 2), los FCs. que tuvieron un efecto en la proliferación con respecto al medio DMEM-F12 con SFB al 10% fueron el EGF y FGFb a 5, 10 y 20 ng/mL, lo cual fue muy semejante al cartílago hialino; además de estos FCs. los que ejercieron un estímulo, fueron el IGF-I a 20 ng/mL y el LIF a 5 ng/mL; pero con la prueba de t-student no fueron significativos, nada mas el EGF y FGFb. También se observo que el FGF-2 a 5 y 20 ng/mL fue superior al FGF-2 a 10 ng/mL, pero la diferencia entre el de 5 y 20 ng/mL fue mínima por lo que se prefirió utilizar el de 5 ng/mL para la estimulación por ser menor concentración, y se establecieron las concentraciones óptimas para cada uno de los recombinantes, VEGF (20 ng/ml), IGF-I (20 ng/ml), EGF (5 ng/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml), LIF (5 ng/ml) y FGFb (5ng/ml) (ver gráfica 3).



Grafica 2. Efecto en la proliferación de los condrocitos del cartílago elástico con los factores de crecimiento. El símbolo \* indica una diferencia significativa determinada por t-student con  $\alpha=5\%$ .

## **ANDEVA PARA EL EFECTO DE LOS FCs A DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE EL CARTILAGO HIALINO Y ELASTICO.**

Para esta evaluación, se plantearon dos hipótesis:

- \* la hipótesis nula ( $H_0$ ) los dos cartílagos presentan el mismo efecto en la proliferación.  $H_0 = \mu_H = \mu_E$
- \* la hipótesis alterna ( $H_a$ ) los dos cartílagos no presentan el mismo efecto en la proliferación.  $H_a = \mu_H \neq \mu_E$

[ FCs	F. CALCULADA						
	TNF	FGFb	EGF	IGF-I	LIF	VEGF	Medio sin FCs
5	2.675	0.470	4.936*	0.008	0.109	3.598	1.573
10	0.003	0.808	4.986*	6.044*	0.641	6.529*	
20	0.179	2.964	2.429	1.815	0.032	3.140	
F teórica $(_{0.95,1,14}) = 4.60$							

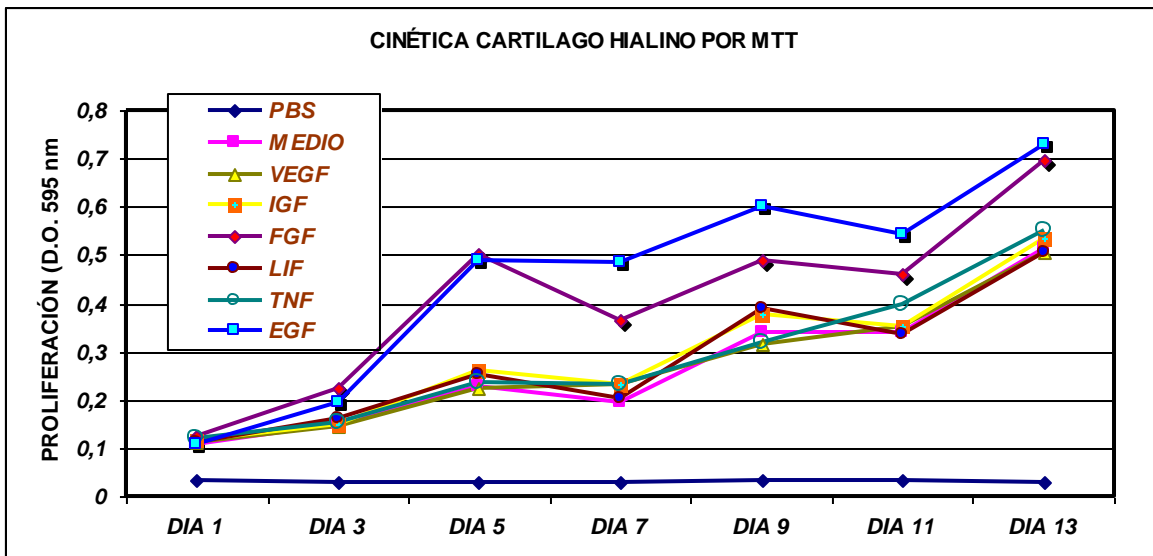
Tabla 4. El efecto de los FCs en la proliferación de condrocitos obtenidos del cartílago hialino y elástico. \* Diferencia Significativa entre los 2 tipos de cartílago.

En esta tabla se muestran las diferencias en cuanto a su proliferación entre los dos tipos de condrocitos (estimulados y no estimulados), y comparamos los valores de F calculada con respecto a la F teórica obtenida de la tabla A-7 de percentiles de la distribución F ( $F_{0.95}$ ). Puesto que  $F_{calc.} > F_{teor.}$ , se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ , por lo que si hay diferencias significativas (al 5%), entre el cartílago hialino y el elástico cuando son estimuladas con el EGF a 5 y 10 ng/mL, IGF a 10ng/mL y con el VEGF a 10 ng/mL; el EGF actúa o estimula mas la proliferación de los condrocitos del cartílago elástico, en comparación con los del cartílago hialino, aunado a que proliferan mas rápido los condrocitos de cartílago hialino que los condrocitos de cartílago elástico con medio sin FC. Así como también, el IGF-1 y VEGF a 10 ng/mL estimulan más la proliferación de los condrocitos de cartílago hialino que los condrocitos de cartílago elástico.

## CINETICA DE PROLIFERACION DEL CARTILAGO HIALINO Y ELASTICO.

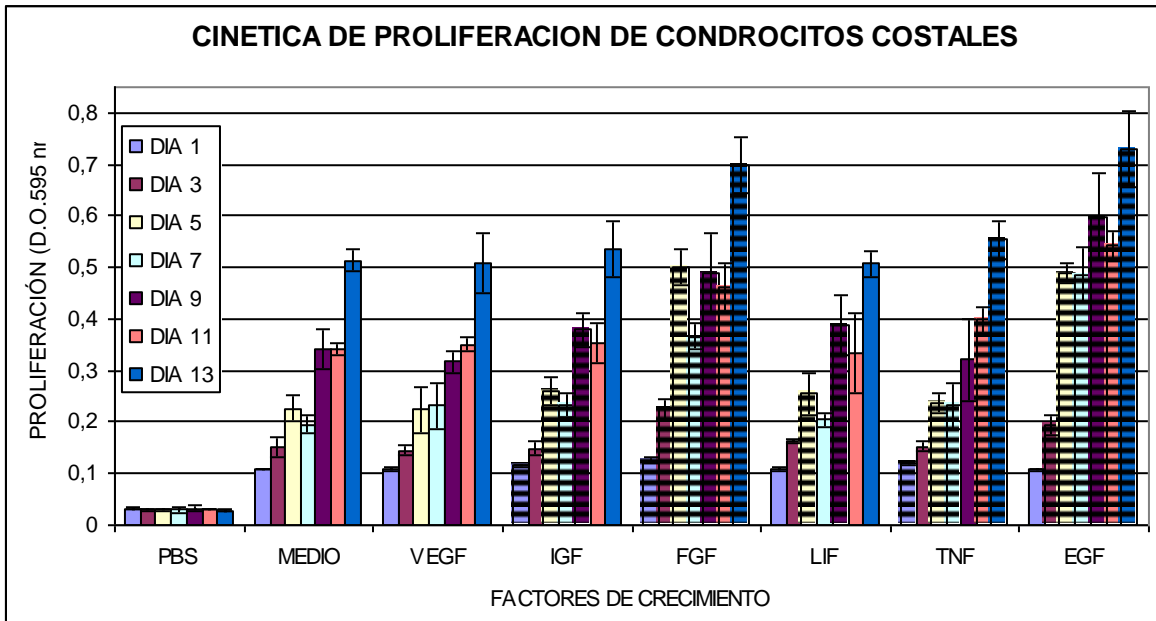
Ya determinada la concentración óptima de cada FCs, se realizó una cinética de proliferación a 13 días (Graficas 3-6), además se comparo al EGF, IGF-I y FGFb con los que tienen un efecto catabólico en la MEC (LIF y TNF $\alpha$ ).

En la grafica 3 referente a los condrocitos del cartílago hialino, se corroboró que los mejores dos FCs, son el EGF y el FGF. El efecto proliferativo de estos dos, se comienza a observar desde el día 5 de cultivo, si comparamos con el resto de los FCs o el control (medio); además se observa que los condrocitos del cartílago costal (hialino) responden muy semejante ante el estímulo de los factores de crecimiento y este efecto también se observo en el cartílago elástico (grafica 5).



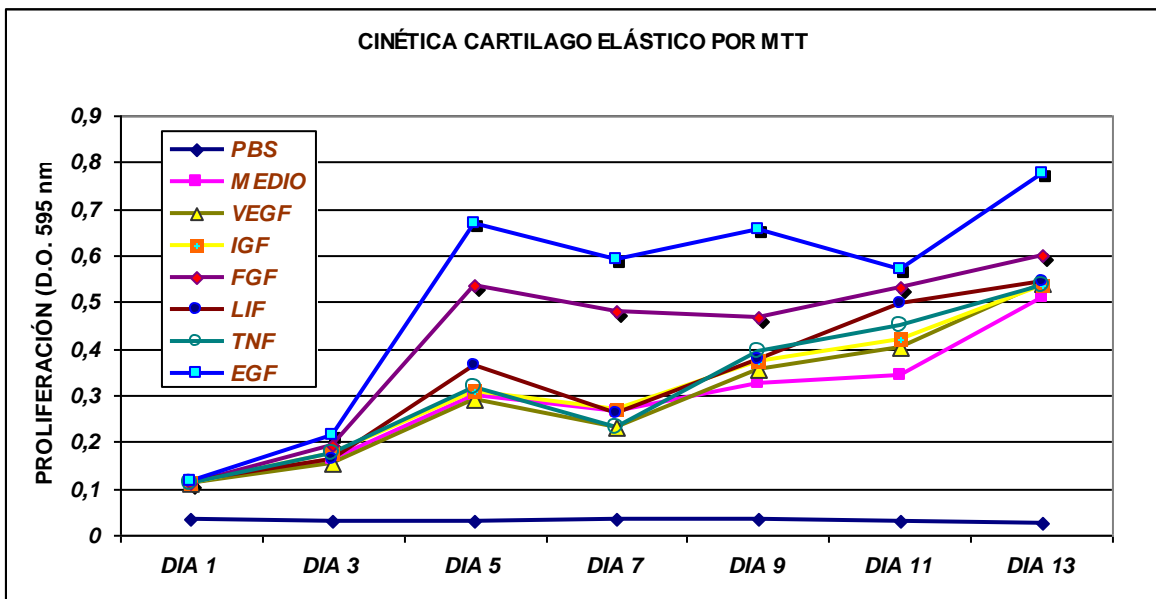
Grafica 3. Evaluación de la cinética de proliferación del cartílago hialino por el MTT hasta el día 13.

En la grafica 4 se observa que del día 1 al 5, el FC que aumenta mas la proliferación es el FGFb, y a partir del día 7 hasta el final el que ejerce un mayor estímulo es el EGF, aunque el que le sigue es el FGFb; también se puede observar que el FGFb, EGF, TNF- $\alpha$  y IGF tienen diferencias significativas en varios días con respecto al medio (barras con rayas en negro), determinada por t-student con  $\alpha=5\%$  (ver anexo).



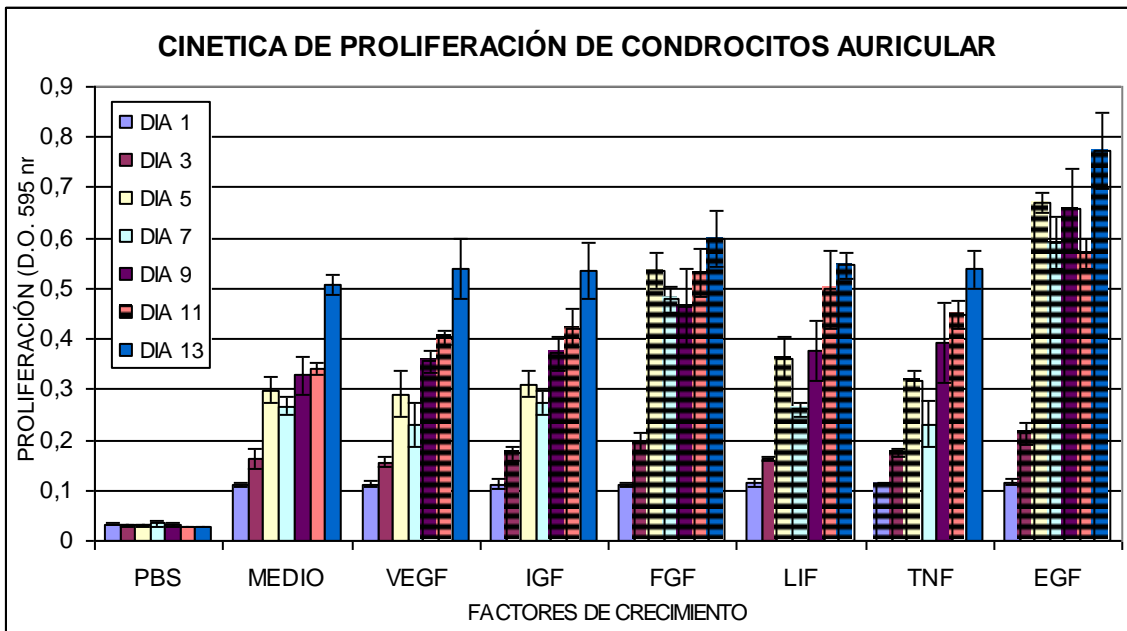
Grafica 4. Evaluación de la cinética de proliferación de condrocitos costales (cartílago hialino) por el MTT.

En la grafica 5 se observa nuevamente que el EGF y FGFb ejercen un estímulo mayor en la proliferación que el control (medio) y otros FCs, aunque al día 11 el LIF y TNF- $\alpha$  también ejercen un efecto proliferativo un tanto menor al EGF y FGFb pero mayor al control.



Grafica 5. Evaluación de la cinética de proliferación del cartílago elástico por el MTT hasta el día 13.

En la grafica 6, se pueden ver las diferencias de los factores de crecimiento con respecto al medio y se puede observar que en el cartílago elástico, el FC que estimula mas la proliferación en comparación con el medio es el EGF a 5ng/mL, en casi todos los días, excepto a las 24 horas (1día) y el que le sigue en estimulo es el FGF-2.



Grafica 6.- Evaluación de la cinética de proliferación del cartílago elástico por el MTT hasta el día 13.

### **ANDEVA ENTRE EL CARTILAGO HIALINO Y ELASTICO A DIFERENTES DÍAS ESTIMULADOS CON FACTORES DE CRECIMIENTO**

Para esta evaluación, se plantearon dos hipótesis:

- \* La hipótesis nula ( $H_0$ ): Los dos cartílagos responden igual a la síntesis de proteínas.  $H_0 = \mu_H = \mu_E$
- \* La hipótesis alterna ( $H_a$ ): Los dos cartílagos responden diferente a la síntesis de proteínas.  $H_a = \mu_H \neq \mu_E$

DIA	F. CALCULADA						
	<i>TNF</i>	<i>FGFb</i>	<i>EGF</i>	<i>IGF-I</i>	<i>LIF</i>	<i>VEGF</i>	<i>Medio sin FCs</i>
1	7.754*	22.338*	6.431*	0.121	2.058	0.436	0.084
3	15.839*	5.616*	4.859	13.258*	0.070	5.758*	1.180
5	112.70*	2.813	219.93*	12.353*	37.060*	12.512*	28.175*
7	0.892	78.396*	17.039*	4.308	34.180*	0.542	11.641*
9	3.133	0.460	1.983	0.239	0.139	11.938*	0.317
11	8.923*	8.169*	2.464	14.887*	25.318*	5.262*	0.004
13	15.839*	5.616*	4.859	13.258*	0.070	5.758*	1.180
F teórica $(_{0.95,1,14}) = 4.96$							

Tabla 5. El efecto en la proliferación de los FCs sobre los condrocitos del cartílago hialino y elástico del día 1-13. \* Diferencia Significativa entre los 2 tipos de cartílago

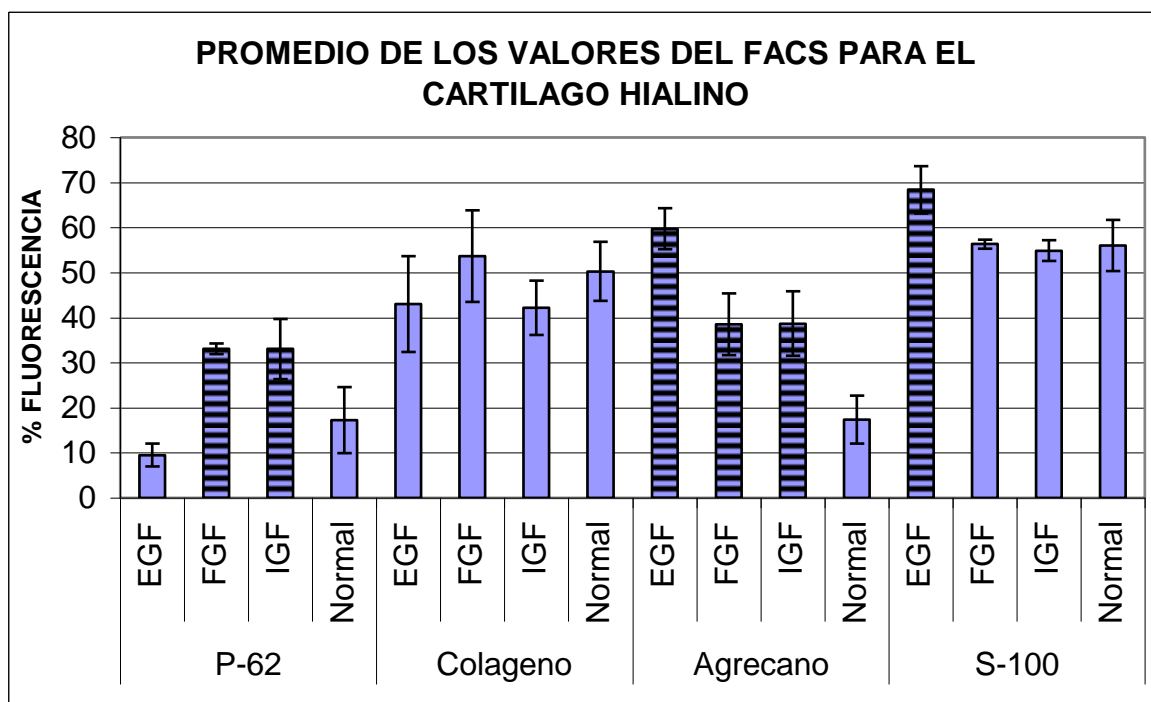
En esta tabla se muestran en que días y en cuales condrocitos (estimulados y no estimulados) difiere cada cartílago en cuanto a su proliferación, ya que se compara los valores de F calculada con respecto a la F teórica obtenida de la tabla A-7 de percentiles de la distribución F ( $F_{0.95}$ ). Puesto que  $F_{calc.} > F_{teor.}$ , se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ , por lo que hay diferencias significativas ( $\alpha = 5\%$ ) entre los cartílagos hialino y elástico en la mayoría de los casos.

### ***EVALUACIÓN DE LA SINTESIS DE PROTEINAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO.***

La evaluación se determino por citometría de flujo al 4º día después de la estimulación, y se determino el % de fluorescencia (% Gated) que emiten los anticuerpos con los que se determinaron estas proteínas a una longitud de onda de 520 nm. También se muestra cuales factores de crecimiento tuvieron una diferencia significativa con respecto al medio (barras con rayas en negro), determinada por t-student con  $\alpha=5\%$  (ver anexo).por citometría de flujo (FACS) por medio del % de fluorescencia.

En la grafica 7 se representan las evaluaciones para los condrocitos provenientes del cartílago hialino; en lo referente para p-62, los FCs que estimularon mas la

presencia de esta proteína de adhesión celular fue el IGF-I y FGFb en comparación con EGF y los no estimulados; además tuvieron una diferencia significativa con respecto al medio. Para la evaluación de la colágena tipo II el que emitió mayor fluorescencia fue FGFb, seguido de los no estimulados y en menor proporción EGF y IGF-I; pero para esta proteína no hubo diferencia significativa con respecto al medio. Con respecto a agregano el de mayor positividad fue el EGF, seguido del FGF-2 y IGF-I; y los tres tuvieron diferencias significativas con respecto al medio. Y finalmente, para S-100 el mas alto fue el EGF con valores muy cercano al 70%, pero la mitad de los condrocitos tanto estimulados como no estimulados presentaron ser positivos para esta proteína, obteniendo una diferencia significativa solo para el EGF.



Grafica 7.- Efecto de los factores de crecimiento en la síntesis de proteínas de matriz extracelular de los condrocitos del cartílago hialino.

En la grafica 8 se representan las evaluaciones para los condrocitos provenientes del cartílago elástico y en este, todas las determinaciones fueron menores que para el cartílago hialino, En la evaluación de p-62, los condrocitos no estimulados emitieron mayor fluorescencia que los estimulados, y dentro de estos el mas



relevante fue el IGF-I, pero no hubo diferencia con respecto al medio. Para colágena tipo II los condrocitos no estimulados emitieron mayor fluorescencia que los estimulados, destacándose el EGF y tampoco hubo diferencia con respecto al medio. Por último, en agrecano, los condrocitos no estimulados emitieron mayor fluorescencia que los estimulados, resaltando el IGF-I y para S-100 el de mayor emisión fue el IGF-I, obteniendo una diferencia significativa para el IGF y EGF con respecto al medio.

### **ANDEVA ENTRE EL CARTILAGO HIALINO Y ELASTICO PARA LA EVALUACIÓN DE PROTEINAS DE MEC POR FACS.**

Para esta evaluación, se plantearon dos hipótesis:

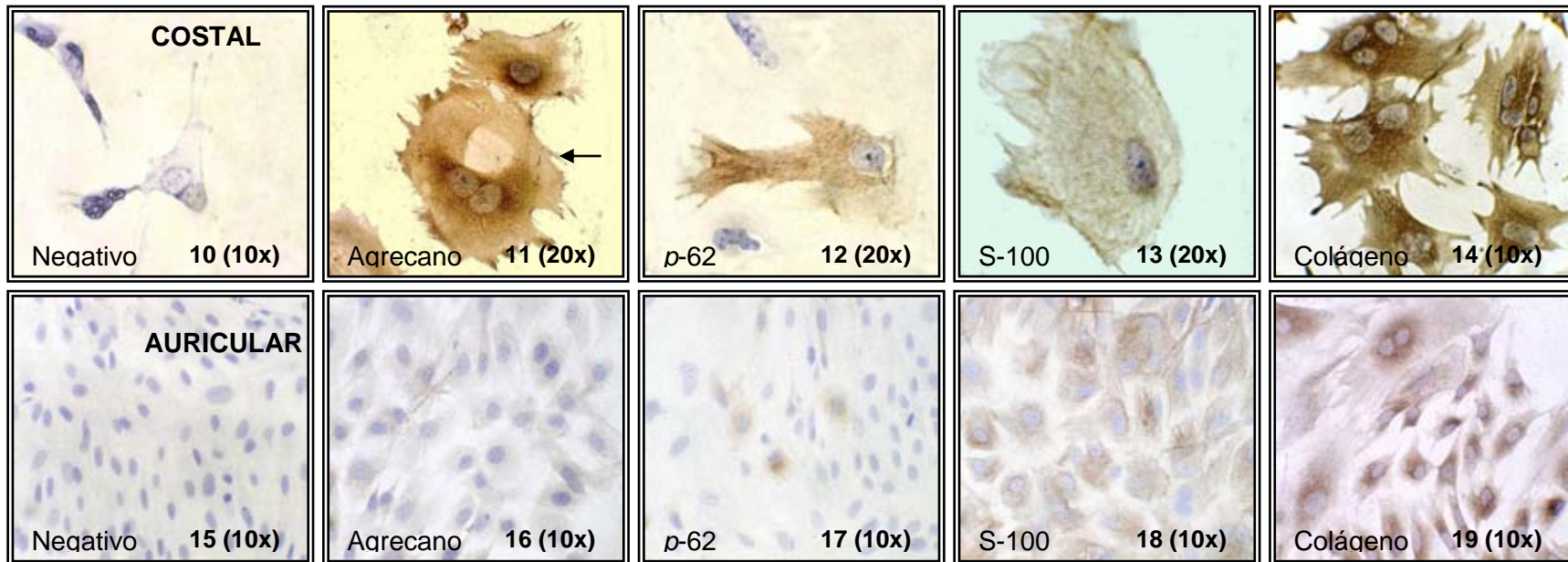
- \* la hipótesis nula ( $H_0$ ) los dos cartílagos responden igual a la síntesis de proteínas.  $H_0 = \mu_H = \mu_E$
- \* la hipótesis alterna ( $H_a$ ) los dos cartílagos responden diferente a la síntesis de proteínas.  $H_a = \mu_H \neq \mu_E$

<b>F. CALCULADA</b>				
Anticuerpo	<i>EGF</i>	<i>FGFb</i>	<i>IGF-I</i>	<i>Medio sin FCs</i>
<i>p-62</i>	8.603*	469.443*	27.567*	1.867
Colágena	0.594	39.823*	52.235*	4.370
Agrecano	219.933*	1.811	0.105	29.454*
S-100	45.994*	7.632	2.329	9.359*
F teórica $(0.95,1,4) = 7.71$				

Tabla 7.- Evaluación de la síntesis de proteínas de matriz extracelular de los condrocitos del cartílago hialino y elástico. \* Diferencia Significativa entre los 2 tipos de cartílago.

En esta tabla se muestran en que proteína y en cuales condrocitos (estimulados y no estimulados) difiere cada cartílago en cuanto a su síntesis de proteínas de matriz extracelular, ya que se compara los valores de F calculada con respecto a la F teórica obtenida de la tabla A-7 de percentiles de la distribución F ( $F_{0.95}$ ). Puesto que  $F_{calc.} > F_{teor.}$ , se rechaza  $H_0$  y se acepta  $H_a$ , por lo que hay diferencias significativas (al 5%) entre los cartílagos hialino y elástico en la mayoría de los casos.

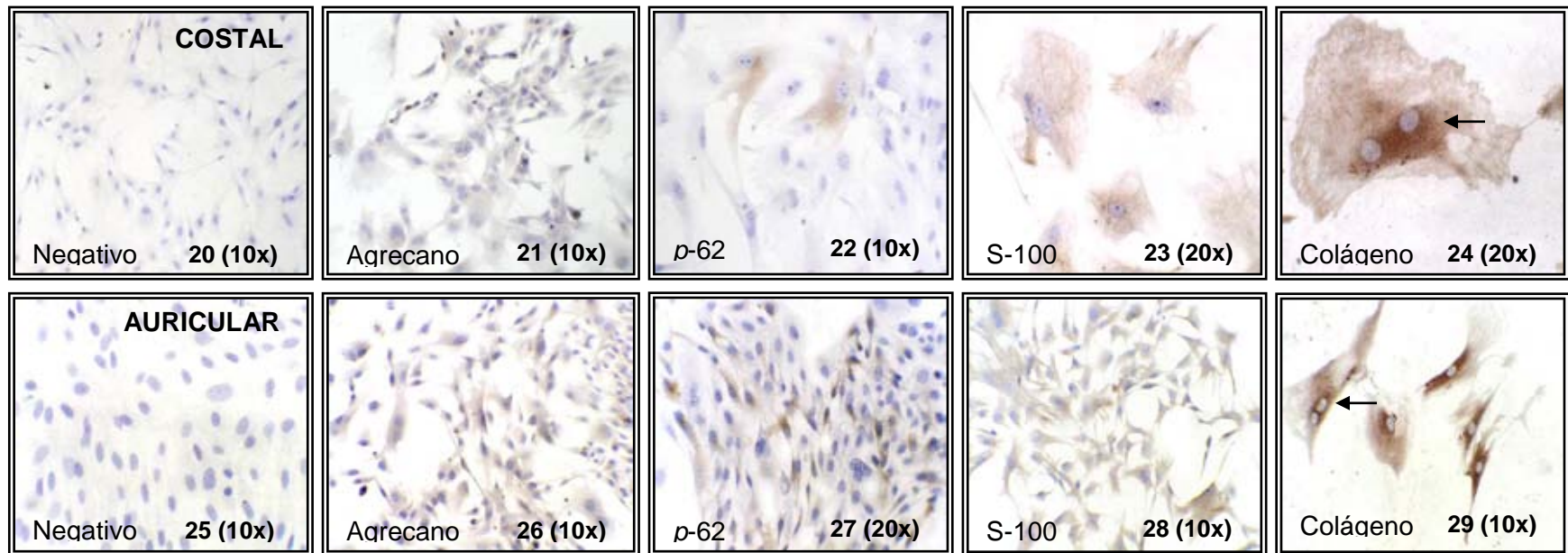
## INMUNOHISTOQUIMICA DE LOS CONDROCITOS



Figs. 10-14. Condrocitos de origen costal (hialino). Fig. 10 se observa el control negativo sin anticuerpo 1<sup>a</sup>. Fig. 11 El marcaje con el Ab es mas intenso alrededor de los grupos isogénicos, que es donde se encuentra mayor cantidad de condroitín sulfato y se puede observar la matriz territorial que sintetiza el condrocito, así como un nucleolo prominente lo que indica mayor actividad de síntesis. Fig. 12 algunos condrocitos son positivos a *p*-selectina (*p*-62) la cual es una proteína de adhesión celular que se une a mucinas y esta constituye porción polisacárida del ácido hialurónico. Fig. 13 Tinción citoplasmática y nuclear (citonuclear) que confirma que son condrocitos por su unión al anticuerpo anti-S100. Fig. 14 Secreción de colágena tipo II por los condrocitos, además nótese el marcaje alrededor de los diferentes grupos isogénicos y forman una condrona, lo que sugiere un crecimiento intersticial por los condrocitos. Figs. 15-19. Condrocitos

de origen auricular (elástico). Fig. 15 Control negativo. Fig. 16 Síntesis de proteoglicanos pero en menor cantidad que en el cartílago hialino. Fig. 17 se observa que no todos los condrocitos son positivos a p-62 lo cual sugiere que no todos están sintetizando ácido hialurónico. Fig. 18 se observa que son positivos a S-100 con un marcaje en el contorno del núcleo y citoplasma pero en menor intensidad. Fig. 19 Secreción de colágena tipo II, lo cual indica que estos condrocitos no se están desdiferenciando a un linaje fibroblástico.

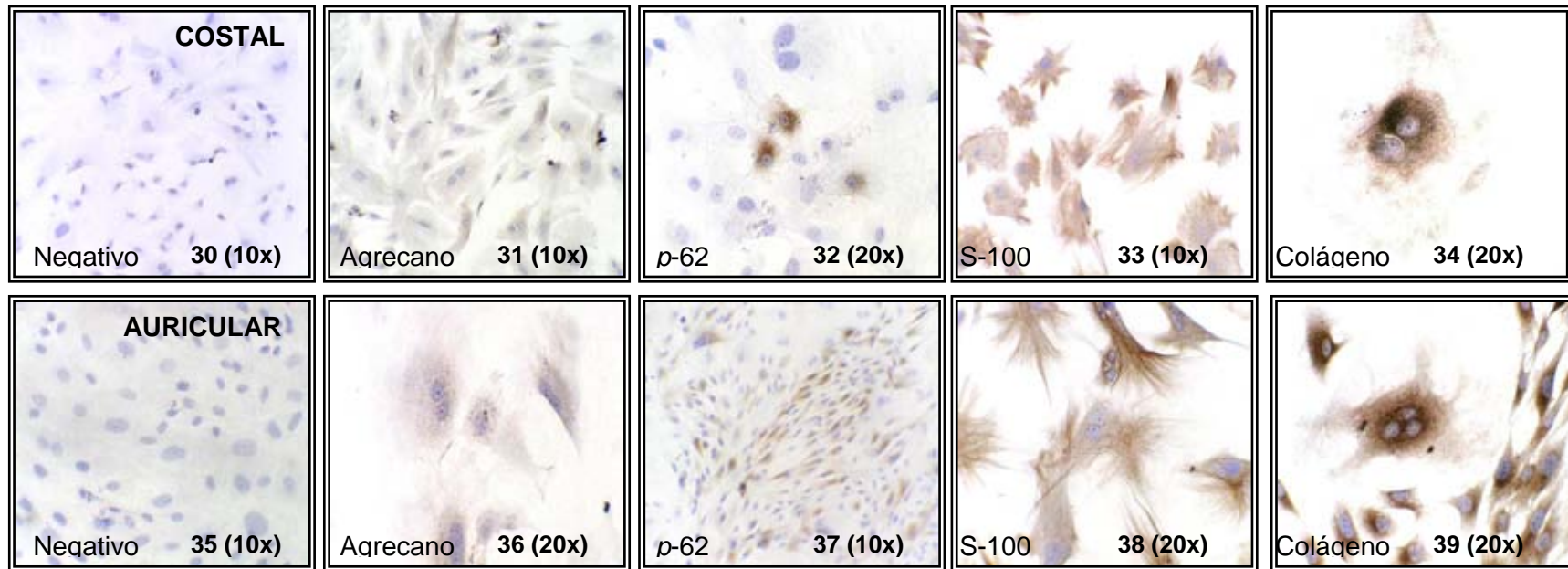
### **INMUNOHISTOQUIMICA DE LOS CONDROCITOS ESTIMULADOS CON EGF**



Figs. 20-24 Condrocitos de origen costal (hialino). Figs. 25-29 Condrocitos de origen auricular (elástico) Fig. 20 y 25 son los controles negativos, los cuales no contienen el anticuerpo 1<sup>a</sup>. Todos los condrocitos fueron estimulados con EGF y se observa que no pierden su linaje condrocitario ya que son positivas a S-100, colagena tipo II y agrecano y en una menor

cantidad a p-62 (p-selectina), pero se puede apreciar que el cartilago auricular es mas positivo a este anticuerpo en comparación con el cartilago costal. Tambien se observa que siguen formando grupos isogénicos en ambos casos (ver flechas).

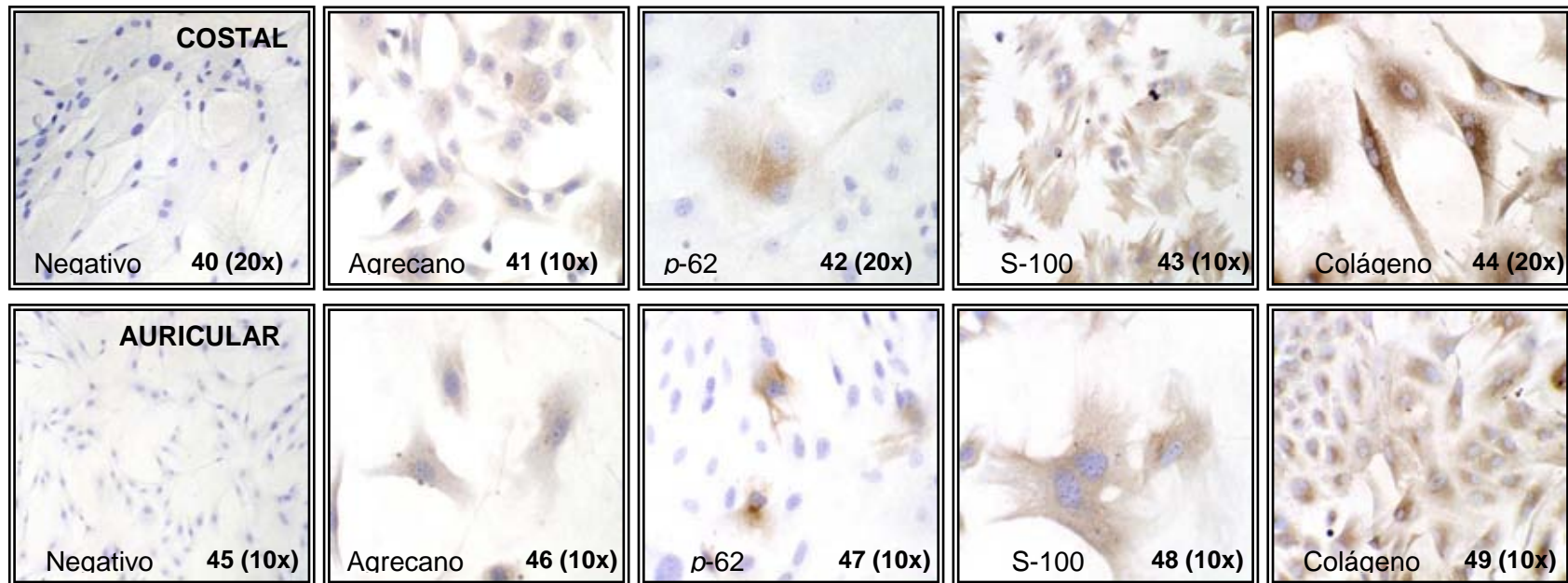
### **INMUNOHISTOQUIMICA DE LOS CONDROCITOS ESTIMULADOS CON IGF-I**



Figs. 30-34 Condrocitos de origen costal (hialino). Figs. 35-39 Condrocitos de origen auricular (elástico). Fig. 30 y 35 son los controles negativos los cuales no contienen el anticuerpo 1<sup>a</sup>. En estas figuras (31-39) se puede observar que son positivas a agrecano, colágena tipo II y S-100 lo cual, indica que estimulando su proliferación con IGF-I no se desdiferencian a un linaje fibroblástico; también se sigue observando que están formando condronas (grupos isogénicos),

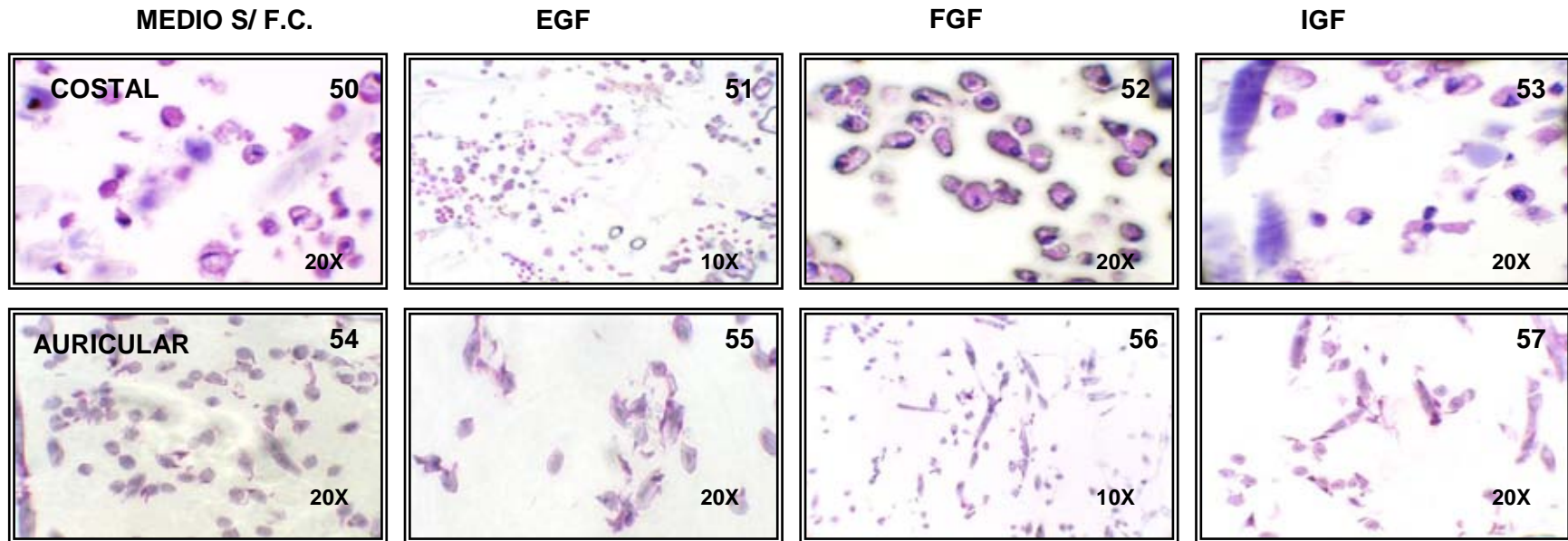
además se sigue observando que hay un mayor número de condrocitos positivos a p-62 en el cartílago auricular que en el costal.

### **INMUNOHISTOQUIMICA DE LOS CONDROCITOS ESTIMULADOS FGFb**



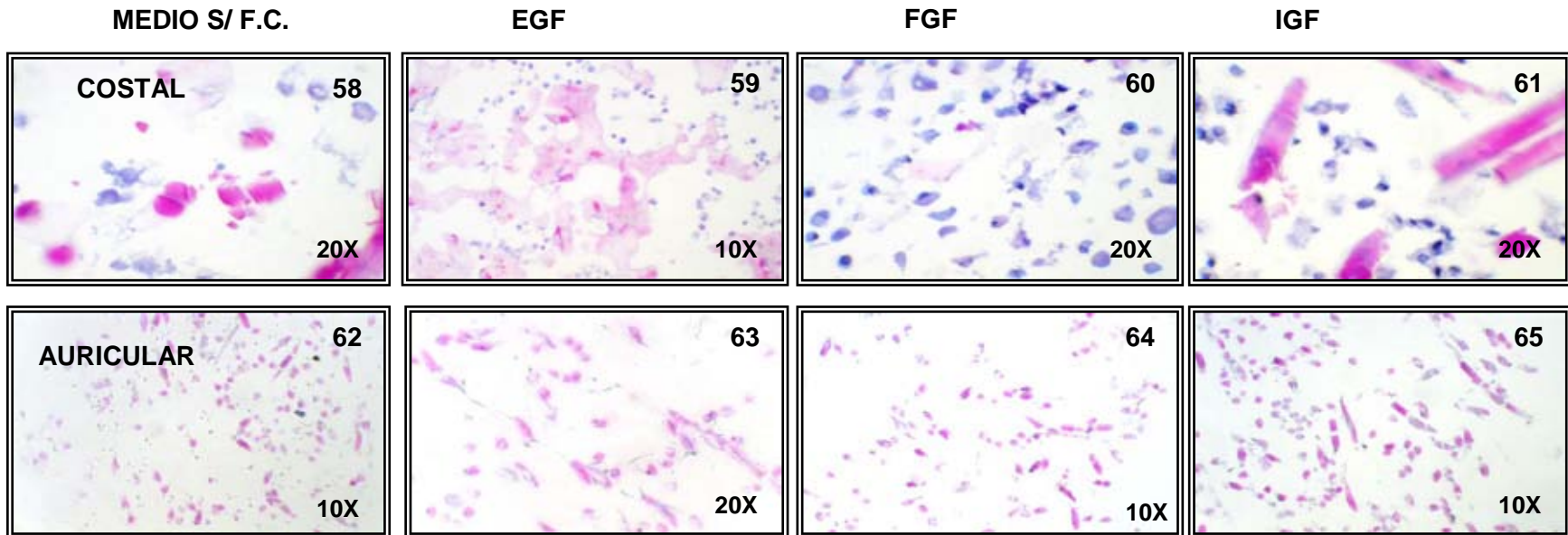
Figs. 40-44 Condrocitos de origen costal (hialino). Figs. 45-49 Condrocitos de origen auricular (elástico). Fig. 40 y 45 representan los controles negativos, En estas figuras (41-49) se puede apreciar que hay un aumento en su proliferación y no hay desdiferenciación a fibroblastos, ya que son positivos a S-100, p-62, agrecano y colagena tipo II; también se puede ver que no aumenta la expresión de p-62 en estos condrocitos y hay una menor cantidad de condrocitos positivos a p-62 en el cartilago auricular estimulados con FGFb en comparación con los estimulados con EGF y IGF-I.

**HISTOQUIMICA DEL NEO-CARTILAGO FORMADO CON LA MEMBRANA DE PGA-PLGA A 15 DIAS DE CULTIVO. TINCIÓN PARA HEMATOXILINA-EOSINA**



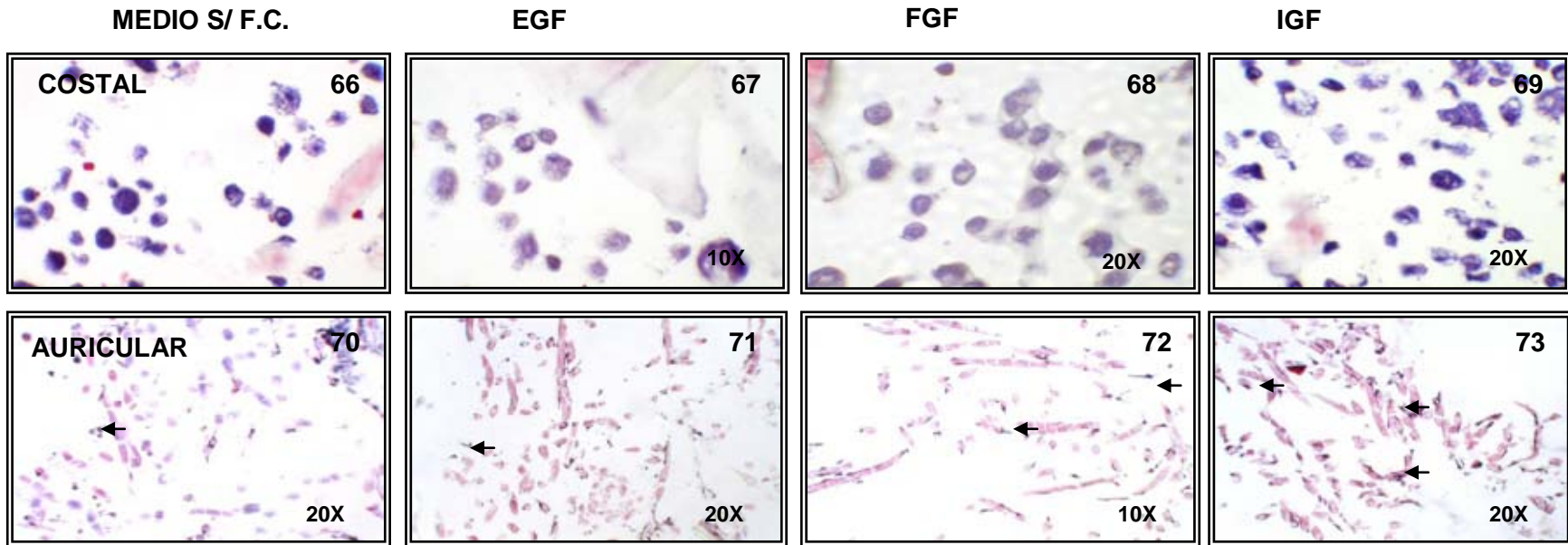
Figs. 50-53 muestran la formación del neo-cartílago costal (hialino). Fig. 50 Neo-cartílago costal cultivado sin FCs. Figs 51,52 y 53 neo-cartílago costal estimulado con el EGF, FGFb y IGF-I respectivamente. Figs 54-57 muestran la formación del neo-cartílago auricular (elástico). Fig. 54 Neo-cartílago auricular cultivado sin FCs. Figs. 55, 56 y 57 neo-cartílago auricular estimulado con el EGF, FGFb y IGF-I respectivamente. En los cortes para el cartílago costal se puede ver una mejor conformación y una mayor proliferación de condrocitos, en comparación con el cartílago auricular, además se observa cómo están formando su matriz extracelular dentro y en la superficie del polímero de PGA-PLGA, y se observa que todavía se encuentran fibras de este polímero a estos días.

**HISTOQUIMICA DEL DEL NEO-CARTILAGO FORMADO CON LA MEMBRANA DE PGA-PLGA A 15 DIAS DE CULTIVO. TINCIÓN PARA AZUL ALCIANO-PAS**



Figs. 58-61 muestran la formación del neo-cartílago costal (hialino). Fig. 58 Neo-cartílago costal cultivado sin FCs. Figs 59, 60 y 61 neo-cartílago costal estimulado con el EGF, FGFb y IGF-I respectivamente. Figs 62-65 muestran la formación del neo-cartílago auricular (elástico). Fig. 62 Neo-cartílago auricular cultivado sin FCs. Figs. 63, 64 y 65 neo-cartílago auricular estimulado con el EGF, FGFb y IGF-I respectivamente. Con esta tinción para los cortes del cartílago costal y auricular, se pueden observar los glicosaminoglicanos (Gag) totales, debido a, que con el azul anciano se tiñen los gag sulfatados (condotín, dermatan, queratan y ác. hialurónico y con el Pas (ácido peryódico de Schiff) los polisacaridos y mucinas neutras como las glucoproteinas y proteoglicanos que se encuentran en la matriz extracelular del cartílago.

**HISTOQUIMICA DEL CARTILAGO HALINO Y ELASTICO FORMADO CON LA MEMBRANA DE PGA-PLGA A 15 DIAS DE CULTIVO. TINCIÓN PARA MASSON**



Figs. 66-69 La formación del neo-cartílago costal (hialino). Fig. 66 Neo-cartílago costal cultivado sin FCs. Figs 67, 68 y 69 neo-cartílago costal estimulado con el EGF, FGFb y IGF-I respectivamente. Figs 70-73 La formación del neo-cartílago auricular (elástico). Fig. 70 Neo-cartílago auricular cultivado sin FCs. Figs. 71, 72 y 73 neo-cartílago auricular estimulado con el EGF, FGFb y IGF-I respectivamente. Con esta tinción para estos cortes, la colágena se tiñe de color azul, y se observa que en el costal hay una mayor secreción y en diferente proporción, ya que unos secretan mas que otros; pero en el auricular; se observa una secreción en menor cantidad que con el cartílago costal, pero ha diferencia de esta, en el cartílago elástico se observan pequeñas fibras de color negro las cuales son las fibras elásticas (ver flechas).



## 8.- ANALISIS DE RESULTADOS

Se ha descrito que los factores de crecimiento (FCs) o recombinantes humanos (rh) que desempeñan un papel importante en la biología del cartílago, son el IGF-I, FGF-2 ó FGFb, EGF, LIF, VEGF, TNF- $\alpha$ ; ya que regulan la proliferación, la síntesis de proteínas y matriz extracelular de los condrocitos<sup>5-23</sup>. De los cuales, el IGF-1, FGFb y EGF tienen efectos anabólicos y el LIF, TNF- $\alpha$  tienen efectos catabólicos en la degradación de la matriz extracelular de los condrocitos<sup>58</sup>. Se sabe, que aunque el cartílago es una estructura prácticamente avascular, pero en la capa superficial del pericondrio, tiene contacto con los capilares sanguíneos del tejido conjuntivo adyacente, lo que permite la acción del VEGF.<sup>5</sup>

Considerando lo reportado en la literatura uno de los métodos para evitar la desdiferenciación de los condrocitos a fibroblastos es o puede ser la utilización de los FCs, ya que se puede obtener la cantidad de condrocitos necesaria para ser trasplantados dentro de un templete, en un menor número de pasajes.<sup>27</sup>

Por lo que, en esta tesis se comparo el efecto de los siguientes FCs: IGF-1, FGF-2 y el EGF sobre la proliferación de los condrocitos, así como cual de estos FCs promueven la síntesis de proteínas de matriz extracelular (colágena tipo II, y agrecanos principalmente), y así obtener un numero adecuado de condrocitos en menor tiempo y poder cultivarlos dentro del biopolímero de PGA-PLGA con la finalidad de formar un tipo de tejido con características muy semejantes a las del cartílago hialino y las del cartílago elástico, como son el cartílago costal y auricular respectivamente.

Debido a que se ha documentado el uso de los FCs a concentraciones que van de 10 a 100 ng/mL e inclusive en cantidades de  $\mu\text{g}$ ,<sup>13,19-21,43</sup> se analizó concentraciones de 10, 30 y 50ng/mL y se encontró que alrededor de 10ng/mL se encontraba la concentración mas eficaz, por lo que se dio a la tarea de buscar concentraciones mayores y menores a esta, por lo que, se evaluaron concentraciones de 5, 10 y 20ng/mL. En el primer experimento, se analizó y se comparo cual FCs y a que concentración tuvo un mayor efecto en la proliferación comparado con los condrocitos sin estimular (medio). Se midió la actividad mitocondrial de las células mediante el MTT, el cual es reducido de

amarillo a formazan, un colorante púrpura insoluble en agua. La cantidad de sal reducida, medida espectrofotométricamente, es directamente proporcional al número celular y se lee en densidades ópticas (DO).

Con esto, para el cartílago hialino de acuerdo a la grafica 1, los que producen un mayor efecto en la proliferación fue el EGF y FGFb a 5, 10 y 20 ng/mL, encontrándose una diferencia significativa, de acuerdo a la prueba de t-student con  $\alpha=5\%$  y un 95% de confianza; también se observa que el EGF inclusive tiene un efecto de casi el doble que el ejercido por el FGF-2. Además la concentración óptima de estos FCs fue de 5 ng/mL en ambos casos.

Para el cartílago elástico, los condrocitos fueron estimulados con los mismos FCs y a las mismas concentraciones y como se observa en la grafica 2, los FCs que tuvieron un efecto en la proliferación fueron el EGF y FGF-2 a 5, 10 y 20 ng/mL, lo cual fue muy semejante al cartílago hialino; además de estos, los que produjeron un estímulo, fueron el IGF-1 a 20 ng/mL y el LIF a 5 ng/mL; pero con la prueba de t-student no hubo diferencia significativa, solo hubo diferencia para el EGF y FGFb a 5, 10, y 20 ng/mL.

Mediante el ANDEVA mostrado en la tabla 4 se pudo comprobar, que hay diferencias significativas entre el cartílago hialino y el elástico, cuando son estimuladas con el EGF a 5 y 10 ng/mL, IGF a 10 ng/mL y con el VEGF a 10 ng/mL, observando que el EGF produce un mayor estímulo en la proliferación de los condrocitos del cartílago elástico que en el cartílago hialino, no obstante, en el medio sin FCs prolifera más rápido el cartílago hialino que el elástico. Con medio sin FC. Con respecto al IGF-1 y VEGF a 10 ng/mL estimulan más la proliferación en cartílago hialino que el elástico.

Una vez que se obtuvo la concentración óptima, para una mayor proliferación, se hizo una cinética de proliferación a 13 días, evaluando cada tercer día la viabilidad con el MTT. Los resultados en la grafica 3 muestran, que los condrocitos del cartílago costal responden muy semejante ante el estímulo de los factores de crecimiento, ya que los días 5, 9 y 13 es cuando se observa mayor proliferación, lo que nos sugiere, que su ciclo celular se lleva a cabo cada 4 ó 5 días; y en este día, es cuando entra en una fase de mitosis. Este efecto también se observó en el cartílago elástico como se observa en la grafica 5.

Los resultados de la grafica 6 nos muestra que para el cartílago hialino, del día 1 al 5, hay un aumento en la proliferación con el FGFb, y del día 7 hasta el 13 el EGF ejerce un mayor estímulo es el EGF y un poco menor con el FGFb.

Observando la grafica 7, en el cartílago elástico, el EGF a 5ng/mL estimula más la proliferación en casi todos los días, excepto a las 24 horas y en segundo lugar lo produce el FGFb.

Todo esto nos indica, que hay diferencias entre los dos tipos de cartílago, en cuanto al estímulo ejercido por los factores de crecimiento en la forma de como responden los condrocitos ante este estímulo; y se evaluó con el ANDEVA, las diferencias producidas con el transcurso de los días se pueden ver en tablas 5.

Con lo anterior, se puede ver que el TNF- $\alpha$ , LIF y VEGF, ejercen un estímulo menor en la proliferación en la mayoría de los casos para ambos tipos de condrocitos, comparados con el EGF y FGF-2; por lo que, se decidió descartar a estos factores del siguiente experimento, además, de que el TNF- $\alpha$ , y LIF, al ejercer un efecto catabólico en la degradación de las proteínas de matriz extracelular tendrían valores inferiores que el EGF, IGF-I y FGFb.

Por otro lado, el TNF- $\alpha$ , y LIF estimulan la proliferación de condrocitos y a la vez estimulan la degradación de la matriz extracelular, por lo que, posiblemente estos factores de crecimiento estén implicados en los procesos de patologías del cartílago como la artrosis.<sup>15,26,58</sup> El VEGF aunque estimula la proliferación pero su efecto no es muy sobresaliente, pero este factor se podría utilizar en combinación con otros factores de crecimiento para obtener una buena proliferación en el tejido engendrado, y a la vez se promovería la angiogenesis,<sup>17</sup> lo cual traería grandes beneficios como el de suministrar los nutrientes mas rápido a los condrocitos en un experimento *in vivo*.

En este experimento, también se pudo apreciar que el IGF-1 tiene un efecto significativo en mas de la mitad de los casos, pero el estímulo es menor que el ejercido por el EGF y FGFb, posiblemente, porque tenga un efecto mas lento. En la siguiente fase del experimento, se buscó si el EGF, IGF-1 y/o FGFb aumentan la síntesis de proteínas de matriz extracelular en el cartílago. Esta se determinó primeramente por inmunohistoquímica para observar si había cambios morfológicos en la expresión de marcadores que indicaran que los condrocitos se están desdiferenciando a fibroblastos al marcarlos con los anticuerpos anti-S-100, anti-colágena tipo II, anti-agrecano, y anti-*p-selectina*

(p-62) presentes en los condrocitos. Los resultados que se observan de la figura 10 a la 49, muestran que los condrocitos estimulados y no estimulados, son positivos a S-100, colágena tipo II, agregano y *p-selectina*, lo cual demuestra que aumenta su proliferación y no se desdiferencian a fibroblastos; ya que el S-100 es un marcador para condrocitos, con el anti-colágena tipo II, se pudo demostrar que los condrocitos secretan este tipo de colágena, lo cual, demuestra que conservan su morfología de condrocitos, ya que este tipo de colágena no es secreta por los fibroblastos, ya que ellos secretan la tipo I. Con el anti-agrecanos también se demostró que no eran fibroblastos, ya que se detecto a los proteoglicanos como condroitin sulfato y queratan sulfato que se encuentran en la matriz extracelular. Con p-62 o p-selectina, la cual es una proteína de adhesión celular que reconoce residuos de oligosacáridos (mucinas) constituyentes de la porción polisacárida del ácido hialurónico, se pudo observar que no todos los condrocitos son positivas a p-62, tal vez, porque sus receptores están cubiertos por colágena y proteoglicanos. También se pudo ver que están creciendo y proliferando estos condrocitos por la presencia de grupos isogénicos.

Pero conocer con exactitud el porcentaje de condrocitos positivos a estos anticuerpos se hizo evaluaciones por triplicado en el citómetro de flujo.

Para en el cartílago hialino se evaluaron los condrocitos sin estimular y los estimulados con factores de crecimiento (IGF-1 10ng/mL, EGF y FGF-2 a 5ng/mL) y para en el cartílago elástico se evaluaron los condrocitos sin estimular y los estimulados con factores de crecimiento (IGF-1 20ng/mL, EGF y FGF-2 a 5ng/mL).

Generalizando el análisis de proteínas de matriz extracelular si hay diferencias significativas entre los dos cartílagos, ya que los valores demuestran que hay un mayor porcentaje de estas proteínas en el cartílago hialino, además podemos observar que una de las diferencias es que el factor de crecimiento que da mayor fluorescencia para colágena tipo II no lo hace para agregano, tal es el caso de el FGFb, ya que siempre una se secreta en mayor concentración que la otra. Otra diferencia es que el factor de crecimiento que da mayor fluorescencia para agregano, también lo es para S-100, el cual es el EGF. También se puede observar que en el cartílago hialino (costal) tratado con FGFb y IGF-I estimulan una mayor síntesis de colágena tipo II, la cual es

preferible, ya que sea reportado que la síntesis de colágena tipo II es más lábil que la de agreganos;<sup>6</sup> y para el cartílago elástico es el EGF.

En lo que se refiere a la evaluación de las proteínas por histoquímica si hay diferencias entre los cartílagos, ya que el porcentaje de colágena y agreganos en el cartílago hialino es mayor que en el elástico. Esto pudo observarse con la tinción de hematoxilina eosina, para determinar la morfología de los condrocitos en el tejido, ya que a los 15 días de cultivo *in vitro*, ya han secretado algo de su matriz extracelular (compuesta principalmente por proteoglicanos y colágena tipo II) sobre la matriz tridimensional o templete de PGA-PLGA.

La detección de glucosaminoglicanos totales, se hizo por medio de la tinción de azul anciano-PAS, apreciando las células con morfología esférica de color azul por la presencia de glucosaminoglicanos (GAG) altamente sulfatados (condroitín y queratán sulfato) y mucopolisacaridos ácidos (como ácido hialurónico) y de color magenta, las glucoproteínas y proteoglicanos restantes como biglicano, decorita y fibromodulina.

La detección de colágena, se realizó con la tinción tricromica de masson, que mostró coloración azul.

Con respecto a los cortes para el cartílago hialino, los condrocitos estimulados con EGF y no estimulados, se puede observar que en la tinción de azul anciano-PAS, hay predominio de los dos tipos de glucosaminoglicanos a comparación con los estimulados con FGFb y IGF-I en los que predominan en su totalidad de glucosaminoglicanos sulfatados y mucopolisacaridos ácidos. También se puede observar que en el cartílago formado con el co-polímero (PGA-PLGA) y los condrocitos costales estimulados con IGF-I y FGFb existe una mejor consistencia del tejido y una mayor proliferación de los condrocitos que en los estimulados con el EGF y los no estimulados.

En los cortes para el cartílago elástico, se puede observar que los condrocitos obtenidos del cartílago elástico, no solamente están sobre la superficie, si no también están en el centro de el templete y, aunque no se observa una vista panorámica de este, se puede ver como están formando su matriz extracelular, aunque en menor proporción que la formada por los condrocitos obtenidos del cartílago costal (cartílago hialino), lo cual puede deberse a que su composición principal es de fibras elásticas mas que de colágena y proteoglicanos.<sup>24</sup>

Aunque existen diferencias entre los estímulos ejercidos por los factores de crecimiento mencionados, sobre los condrocitos, no se puede definir cual es el mejor de estos, ya que a pesar de que el EGF tiene mayor efecto proliferación que los otros factores de crecimiento, tiene como desventaja que al día 4, cuando se evaluó el estímulo ejercido por este, en la síntesis de proteínas de matriz extracelular, no hay diferencia con respecto a los condrocitos que no fueron estimulados, lo cual nos sugiere, que si se evaluaran estas proteínas al día 8 o al día 12, tal vez los condrocitos ya habrían terminado de madurar y tendrían mejores resultados en la síntesis de proteínas de matriz extracelular con respecto al medio y se podría seleccionar cual de estos estimula mas su proliferación y produce mayor secreción de su matriz extracelular, por lo tanto, se puede decir que los tres factores de crecimiento EGF, IGF-I y FGFb, utilizados en esta tesis tienen efectos mitogénos para los condrocitos y la rápida proliferación o crecimiento es incompatible con el incremento en la síntesis de proteínas de matriz extracelular.<sup>19-21 y 59-62</sup>

## 9.- CONCLUSIÓN

Se pueden concluir varios aspectos en este proyecto.

- \* Se acepta la hipótesis propuesta para esta tesis, ya que es posible aumentar la proliferación de los condrocitos mediante la adición exógena de factores de crecimiento y evitar su desdiferenciación a fibroblastos.
- \* Se establecieron los parámetros para el cultivo celular como concentración celular y concentraciones óptimas de los factores de crecimiento para la siembra de los condrocitos en monocapa y en el biopolímero.
- \* El factor que aumenta o estimula la proliferación en los dos tipos de cartílago es el EGF.
- \* La rápida proliferación o crecimiento es incompatible con el incremento en la síntesis de proteínas de matriz extracelular.
- \* Los condrocitos responden diferente en cultivos en monocapa que en los cultivos en tercera dimensión (templetes o matrices tridimensionales), ya que con estos se crea un ambiente propicio para su proliferación y síntesis de matriz extracelular.
- \* El EGF, IGF-I y FGF-2 evitan su desdiferenciación a fibroblastos y aumentan su proliferación.
- \* Aunque el IGF-I proporciona un menor estímulo en la proliferación de condrocitos, si estimula eficientemente la síntesis de proteínas de matriz extracelular.
- \* El EGF estimula eficazmente al cartílago hialino en proliferación y síntesis de proteínas de matriz extracelular que en el cartílago elástico, en el cual actúa dominante el IGF-1.
- \* El FGF-2 y IGF-1 estimula principalmente su proliferación en los cultivos en tercera dimensión, en comparación con el EGF el cual los estimula en cultivos en monocapa, por lo que se podría utilizar una combinación entre estos o estimularlos primeramente en monocapa con el EGF y posteriormente cuando se siembren en el templete con el FGFb o con el IGF-I.

- \* Es posible formar tejido cartilaginoso y de buena calidad mediante Ingeniería de Tejidos
- \* Los condrocitos obtenidos del cartílago hialino son los mejores para formar cartílago, ya que presentan una mayor síntesis de proteínas de matriz.
- \* Los condrocitos del cartílago elástico también pueden ser utilizado si así se requiere, ya que también responde igual a los mismos factores de crecimiento que el hialino.



## 10.- GLOSARIO

**BP** = Proteínas Transportadoras o de Unión

**DESDIFERENCIACIÓN** = Se usa para describir a las células (condrocitos) con falta de funciones diferenciadas (marcadores de proteoglicanos y colágeno tipo II) y para implicar la regresión hasta un estado embrionario temprano (fibroblastos).

**DIFERENCIACIÓN** = La capacidad de la célula para presentar marcadores de superficie.

**DO** = Densidades ópticas

**EGF** = Factor de Crecimiento Epidérmico

**FGFb** = Factor Básico de Crecimiento Fibroblástico

**FCs** = Factores de Crecimiento

**GAG** = Glicosaminoglicanos

**GI** = Grados de libertad

**GRUPOS ISOGÉNICOS** = al agruparse los condrocitos en nidos celulares.

**IGF-I** = Factor de Crecimiento tipo Insulina-I)

**IGFBPs** = Proteínas de Unión al Factor de Crecimiento tipo insulina

**LIF** = Factor Inhibidor de la Leucemia

**MEC** = Matriz Extracelular

**MTT** = Azul de Tetrazolio

**PASAJE** = El numero de re-siembras a las cuales son sometidos los condrocitos.

**PGs** = Proteoglicanos

**PGA** = Ácido Poliglicólico

**PLGA** = Ácido poli-láctico-co-glicólico

**REDIFERENCIACIÓN** =La capacidad de adquirir nuevamente los marcadores de superficie.

**SFB** = Suero Fetal de Bovino

**TK** = Tirosina-quinasas

**TNF- $\alpha$**  = Factor de Necrosis Tumoral-alfa

**VEGF** = Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular

## **11.- ANEXOS 1**

### ***DESPARAFINACIÓN Y TINCIONES***

La desparafinación se realizó de la siguiente manera:

- 1.- Xilol 10 minutos
- 2.- Alcohol absoluto-xilol 5 minutos
- 3.- Alcohol absoluto 3 minutos
- 4.- Alcohol del 96% 3 minutos
- 5.- Alcohol del 70% 3 minutos
- 6.- Agua destilada 5 minutos.

### **HEMATOXILINA-EOSINA**

1. Coloración con Hematoxilina durante 1 minuto
2. Se lavó en agua de la llave
3. Se diferenció en alcohol-ácido
4. Se lavó en agua de la llave
5. Se viró en agua amoniacal
6. Se lavó en agua destilada
7. Se secó el exceso de agua
8. Se trató con Eosina durante 45 segundos
9. Se lavó con alcohol del 96% por 1 minuto
10. Y se procedió a hacer la deshidratación del tejido de la siguiente manera:
  - Se lavó con alcohol del 96% con un gotero
  - Se lavó con alcohol del 96% 20 segundos
  - Se lavó con alcohol absoluto 20 segundos
  - Se lavó con alcohol absoluto-xilol por 5 minutos
  - Se lavó con xilol por 10 minutos
11. Finalmente se montó en resina sintética
12. Resultados: Citoplasma rosado-rojo y núcleo azul.

### **AZUL ALCIANO-PAS, pH 1.0**

1. Se pasó el corte a agua acética al 3% durante 2 minutos
2. Se trató con azul anciano (sol 1% de ácido acético al 3%) durante 30 minutos

3. Se lavó bien en agua destilada
4. Se trató con ácido periódico al 0.6% por 5 minutos, a temperatura ambiente
5. Se lavó con abundante agua destilada
6. Se trató con el Reactivo de Schiff, por 5-30 minutos
7. Se lavó con agua sulfurosa por 2 minutos
8. Se lavó con agua destilada por 10 minutos
9. Y se procedió a hacer la deshidratación del tejido.
10. Finalmente se montó en resina sintética.
11. Resultados: mucinas sulfatadas y ácido hialurónico de color azul, y polisacáridos y mucinas neutras conteniendo hexosas y desoxihexosas con grupos glicol vecinos de color magenta

#### **TECNICA DE MALLORY**

1. Se trató con la solución de Bouin a 60° por 15 minutos
2. Se trató con Fucsina ácida al 1% en agua destilada durante 2 minutos
3. se trató con ácido fosfomolibdico al 1% durante 2 minutos (diferencia y fija la fucsina)
4. Se lavó con agua destilada y se seco ligeramente
5. Se trató con la mezcla de Mallory, por 3 minutos
6. Se lavó en agua destilada
7. Y se procedió a hacer la deshidratación del tejido.
8. Finalmente se montó en resina sintética.
9. Resultados: colágeno de color azul y fibras elásticas de color negro.

## ANEXOS 2

### **DISTRIBUCIÓN “t- STUDENT” PARA EL CARTILAGO HIALINO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FACTORES DE CRECIMIENTO.**

Para estas evaluaciones, se plantearon de manera opuesta las hipótesis nulas ( $H_0$ ), ya que los factores de crecimiento deben potenciar la proliferación de los condrocitos en comparación con los no estimulados.

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago hialino fue de 0.5313

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.5313$

$H_a = \mu > 0.5313$

Valor de la prueba = 0.5313 con $\alpha = 5\%$					
Factores de crecimiento		Valor de “t student”	Gl	Diferencia de medias	t cal. ( $t_{0.95}$ )
TNF 5		-2.022	7	-0.056925	$\pm 1.8946$
TNF 10		-2.184	7	-0.065188	$\pm 1.8946$
TNF 20		-3.898	7	-0.0701375	$\pm 1.8946$
FGF 5	*	6.012	7	0.1953000	$\pm 1.8946$
FGF 10	*	7.058	7	0.1698250	$\pm 1.8946$
FGF 20	*	7.090	7	0.1718000	$\pm 1.8946$
EGF 5	*	14.235	7	0.3251875	$\pm 1.8946$
EGF 10	*	11.274	7	0.2652500	$\pm 1.8946$
EGF 20	*	8.134	7	0.300338	$\pm 1.8946$
IGF 5		-2.159	7	-0.0669375	$\pm 1.8946$
IGF 10		-1.831	7	-0.0604875	$\pm 1.8946$
IGF 20		-2.746	7	-0.0948625	$\pm 1.8946$
LIF 5		-1.078	7	-0.0447000	$\pm 1.8946$
LIF 10		-0.910	7	-0.0377875	$\pm 1.8946$
LIF 20		-2.011	7	-0.0806000	$\pm 1.8946$
VEGF 5		-1.689	7	-0.0572000	$\pm 1.8946$
VEGF 10		-2.535	7	-0.0615788	$\pm 1.8946$
VEGF 20		-3.202	7	-0.0606938	$\pm 1.8946$

Tabla 8. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento y a que concentraciones aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago hialino con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el EGF y FGF a 5, 10 y 20 ng/mL aumentan la proliferación, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 1.89 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución t\*).

\* Diferencia Significativa.

## **DISTRIBUCIÓN “t- STUDENT” PARA EL CARTILAGO HIALINO A DIFERENTES DIAS, ESTIMULADOS CON FACTORES DE CRECIMIENTO.**

Para estas evaluaciones, se plantearon de manera opuesta las hipótesis nulas ( $H_0$ ) en cada caso, ya que los factores de crecimiento deben potenciar la proliferación de los condrocitos en comparación con los no estimulados.

### **DIA 1**

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (normal) para el cartílago hialino fue de 0.1091

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.1091$

$H_a = \mu > 0.1091$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

*t-Student* calculada ( $t_{0.95}$ )

$T_c = (0.95,3) = \pm 2.3534$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.1091 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de “t student”	GI	Diferencia de medias
TNF 5	*	4.179	3	0.0111750
FGF 5	*	7.194	3	0.0166000
EGF 5		-2.190	3	-0.0019250
IGF 10	*	11.612	3	0.0054750
LIF 10		0.508	3	0.0010500
VEGF 5		0.662	3	0.0013250

Tabla 9. Evaluación de la distribución t de *student* al día 1. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago hialino con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el TNF, FGF y IGF aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.35 calculada a 3 grados de libertad (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ).

Para las evaluaciones de los siguientes días (3-13) se hicieron 6 evaluaciones para cada experimento, por lo que cambia los grados de libertad a 5 y su  $T_c$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

*t Student* calculada ( $t_{0.95}$ )  $T_c = (0.95,5) = \pm 2.0150$

### DIA 3

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (normal) para el cartílago hialino fue de 0.1503

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.1503$

$H_a = \mu > 0.1503$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.1503 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
TNF 5		0.522	5	0.0022667
FGF 5	*	7.287	5	0.0744167
EGF 5	*	18.685	5	0.0426667
IGF 10		-0.404	5	-0.0013333
LIF 10		1.619	5	0.0132833
VEGF 5		-2.688	5	-0.0060000

Tabla 10. Evaluación de la distribución t de *student* al día 3. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago hialino con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el FGF y EGF aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

### DIA 5

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago hialino fue de 0.2262

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.2262$

$H_a = \mu > 0.2262$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.2262 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
TNF 5	*	6.730	5	0.0109833
FGF 5	*	19.054	5	0.2743333
EGF 5	*	31.105	5	0.2638000
IGF 10	*	3.775	5	0.0342167
LIF 10	*	4.976	5	0.0281833
VEGF 5		-1.129	5	-0.0026833

Tabla 11. Evaluación de la distribución t de *student* al día 5. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago hialino con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que solamente el VEGF no aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución t\*).

## DIA 7

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago hialino fue de 0.1956

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.1956$

$H_a = \mu > 0.1956$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.1956 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
TNF 5	*	3.310	5	0.0361333
FGF 5	*	22.922	5	0.1702000
EGF 5	*	34.714	5	0.2901000
IGF 10	*	2.655	5	0.0364167
LIF 10		0.908	5	0.0083333
VEGF 5		1.852	5	0.0354333

Tabla 12. Evaluación de la distribución t de *student* al día 7. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago hialino con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que solamente el VEGF y LIF no aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

## DIA 9

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago hialino fue de 0.3411

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.3411$

$H_a = \mu > 0.3411$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.3411 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
TNF 5		-0,832	5	-0,0206167
FGF 5	*	9,154	5	0,1479667
EGF 5	*	11,217	5	0,2583500
IGF 10	*	4,480	5	0,0381167
LIF 10	*	2,074	5	0,0469833
VEGF 5		-3,824	5	-0,0240500

Tabla 13. Evaluación de la distribución t de *student* al día 9. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago hialino con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que solamente el VEGF y TNF no aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

## DIA 11

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago hialino fue de 0.3419

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.3419$

$H_a = \mu > 0.3419$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.3419 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
TNF 5	*	4,579	5	0,0570667
FGF 5	*	8,035	5	0,1186500
EGF 5	*	15,778	5	0,1998167
IGF 10		1,465	5	0,0116333
LIF 10		-1,079	5	-0,0077500
VEGF 5		0,424	5	0,0093333

Tabla 14. Evaluación de la distribución t de *student* al día 11. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago hialino con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el TNF, FGF y EGF aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

## DIA 13

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago hialino fue de 0.5142

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.5142$

$H_a = \mu > 0.5142$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.5142 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
TNF 5	*	2,023	5	0,0389667
FGF 5	*	9,009	5	0,1841833
EGF 5	*	10,716	5	0,2156500
IGF 10		1,690	5	0,0220500
LIF 10		-0,405	5	-0,0074167
VEGF 5		-0,603	5	-0,0071500

Tabla 15. Evaluación de la distribución t de *student* al día 13. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago hialino con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el TNF, FGF y EGF aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.



**DISTRIBUCIÓN “t- STUDENT” PARA EL CARTÍLAGO ELÁSTICO A DIFERENTES DIAS, ESTIMULADOS CON FACTORES DE CRECIMIENTO.**

Para estas evaluaciones, se van ha plantear de manera opuesta las hipótesis nulas ( $H_0$ ) en cada caso, ya que los factores de crecimiento deben potenciar la proliferación de los condrocitos en comparación con los no estimulados.

**DIA 1**

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago elástico fue de

0.1097

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.1097$

$H_a = \mu > 0.1097$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

*t Student* calculada ( $t_{0,95}$ )

Valor de la prueba = 0.1097 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de “t student”	GI	Diferencia de medias
TNF 10	*	3.331	3	0.0027750
EGF 5		1.895	3	0.0066500
LIF 5		1.864	3	0.0058250
IGF 20		0.717	3	0.0032750
VEGF 20		1.170	3	0.0027750
FGF 5		0.215	3	0.0005000

$T_c = (0.95,3) = \pm 2.3534$

\* Diferencia Significativa

Tabla 16. Evaluación de la distribución t de *student* al día 1. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago elástico con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que solamente TNF aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.35 calculada a 3 grados de libertad (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución t\*).

Para las evaluaciones de los siguientes días (3-13) se hicieron 6 evaluaciones para cada experimento, por lo que cambia los grados de libertad a 5 y su  $T_c$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

*t Student* calculada ( $t_{0,95}$ )  $T_c = (0.95,5) = \pm 2.0150$

### DIA 3

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago elástico fue de 0.1618

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.1618$

$H_a = \mu > 0.1618$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.1618 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	Gl	Diferencia de medias
TNF 10	*	3.650	5	0.0133833
EGF 5	*	5.967	5	0.0504833
LIF 5		-0.235	5	-0.0004500
IGF 20	*	2.035	5	0.0123833
VEGF 20		-1.523	5	-0.0062667
FGF 5	*	4.476	5	0.0330500

Tabla 17. Evaluación de la distribución t de *student* al día 3. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago elástico con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que solamente el LIF y VEGF no aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

### DIA 5

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago elástico fue de

0.2992

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.2992$

$H_a = \mu > 0.2992$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.2992 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	Gl	Diferencia de medias
TNF 10	*	2.515	5	0.0186667
EGF 5	*	43.154	5	0.3695333
LIF 5	*	3.760	5	0.0632833
IGF 20		0.991	5	0.0106667
VEGF 20		-0.474	5	-0.0088833
FGF 5	*	16.445	5	0.2353833

Tabla 18. Evaluación de la distribución t de *student* al día 5. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago elástico con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que solamente el IGF y VEGF no aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

## DIA 7

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago elástico fue de 0.1956

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.1956$

$H_a = \mu > 0.1956$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.1956 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	Gl	Diferencia de medias
TNF 10		0.144	5	0.0026667
EGF 5	*	15.434	5	0.3314167
LIF 5	*	3.107	5	0.0186333
IGF 20		1.790	5	0.0177500
VEGF 20		-2.109	5	-0.0376500
FGF 5	*	21.555	5	0.2322667

Tabla 19. Evaluación de la distribución t de *student* al día 7. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago elástico con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el LIF, FGF y EGF aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

## DIA 9

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago elástico fue de

0.3276

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.3276$

$H_a = \mu > 0.3276$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.3276 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	Gl	Diferencia de medias
TNF 10		2.007	5	0.0652500
EGF 5	*	9.742	5	0.3294833
LIF 5		1.999	5	0.0481500
IGF 20	*	3.176	5	0.0437000
VEGF 20	*	3.041	5	0.0276667
FGF 5	*	4.395	5	0.1375500

Tabla 20. Evaluación de la distribución t de *student* al día 9. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago elástico con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que solamente el TNF y LIF no aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

## DIA 11

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago elástico fue de 0.3426

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.3426$

$H_a = \mu > 0.3426$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.3426 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
TNF 10	*	9.842	5	0.1054667
EGF 5	*	18.085	5	0.2271167
LIF 5	*	4.893	5	0.1556833
IGF 20	*	5.000	5	0.0795500
VEGF 20	*	10.758	5	0.0607167
FGF 5	*	9.661	5	0.1877000

Tabla 21. Evaluación de la distribución t de *student* al día 11. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago elástico con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que todos los F.C. a este día aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

## DIA 13

El valor de la media ( $\mu$ ) para el medio s/rh con SFB al 10% (Normal) para el cartílago elástico fue de

0.5090

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 0.5090$

$H_a = \mu > 0.5090$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 0.5090 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
TNF 10		1.900	5	0.0283000
EGF 5	*	8.648	5	0.2646333
LIF 5	*	3.476	5	0.0373667
IGF 20		1.171	5	0.0259500
VEGF 20		1.278	5	0.0306833
FGF 5	*	3.997	5	0.0900667

Tabla 22. Evaluación de la distribución t de *student* al día 13. En esta tabla se muestran que factores de crecimiento a sus concentraciones óptimas aumentan la proliferación en los condrocitos de cartílago elástico con respecto a los no estimulados. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el LIF, FGF y EGF aumenta la proliferación de los condrocitos, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.01 calculada a 5 grados de libertad.

## **DISTRIBUCIÓN “t- STUDENT” PARA LA EVALUACIÓN DE PROTEINAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO PARA CARTILAGO ELASTICO.**

Para estas evaluaciones, se van ha plantear de manera opuesta las hipótesis nulas ( $H_0$ ) en cada caso, ya que los factores de crecimiento deben potenciar la síntesis de proteínas de matriz extracelular.

El valor de la media ( $\mu$ ) para  $p$ -Selectina ( $p$ -62) en el cartílago elástico tratada con medio DMEM-F-12 y SFB al 10% (Normal) fue de 23.683%.

Hipótesis

$$H_0 = \mu \leq 23.683\%$$

$$H_a = \mu > 23.683\%$$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

$t$  Student calculada ( $t_{0.95}$ )

$$T_c = (0.95, 2) = \pm 2.92$$

Valor de la prueba = 23.683 con $\alpha = 5\%$			
Factores de crecimiento	Valor de “t student”	GI	Diferencia de medias
EGF	-25.646	2	-19.48633
FGF	-10.541	2	-16.02633
IGF	-12.054	2	-10.16300

Tabla 23. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestra que ninguno de lo que factores de crecimiento aumentan la síntesis de  $p$ -62 con respecto a los no estimulados. Por lo que, se acepta  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que los factores de crecimiento no aumenta la síntesis de  $p$ -62 en el cartílago elástico, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.92 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ).

El valor de la media ( $\mu$ ) para Colágena tipo II en el cartílago elástico tratada con medio DMEM-F-12 y SFB al 10% (Normal) fue de 46.32%%.

Hipótesis

$$H_0 = \mu \leq 46.32\%$$

$$H_a = \mu > 46.32\%$$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

$t$  Student calculada ( $t_{0.95}$ )

$$T_c = (0.95, 2) = \pm 2.92$$

Valor de la prueba = 46.32 con $\alpha = 5\%$			
Factores de crecimiento	Valor de “t student”	GI	Diferencia de medias
EGF	-4.336	2	-6.34000
FGF	-16.989	2	-23.26333
IGF	-15.092	2	-25.92667

Tabla 24. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestra que ninguno de lo que factores de crecimiento aumentan la síntesis de colágena II con respecto a los no estimulados. Por lo que, se acepta  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que los factores de crecimiento no aumenta la síntesis de colágena II en el cartílago elástico, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.92 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ).

El valor de la media ( $\mu$ ) para Agrecano en el cartílago elástico tratada con medio DMEM-F-12 y SFB al 10% (Normal) fue de 41.33%.

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 41.33\%$

$H_a = \mu > 41.33\%$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

$t$  Student calculada ( $t_{0.95}$ )

$T_c = (0.95, 2) = \pm 2.92$

Valor de la prueba = 41.33 con $\alpha = 5\%$			
Factores de crecimiento	Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
EGF	-32.444	2	-30.65333
FGF	-7.887	2	-9.60667
IGF	-1.235	2	-3.75000

Tabla 25. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestra que ninguno de lo que factores de crecimiento aumentan la síntesis de agrecano con respecto a los no estimulados. Por lo que, se acepta  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que los factores de crecimiento no aumenta la síntesis de agrecano en el cartílago elástico, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.92 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ).

El valor de la media ( $\mu$ ) para S-100 en el cartílago elástico tratada con medio DMEM-F-12 y SFB al 10% (Normal) fue de 39.37%

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 39.37\%$

$H_a = \mu > 39.37\%$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

$t$  Student calculada ( $t_{0.95}$ )

$T_c = (0.95, 2) = \pm 2.92$

Valor de la prueba = 39.37 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento	Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias	
EGF	*	5.348	2	7.07333
FGF		2.243	2	7.64667
IGF	*	3.010	2	10.24333

\* Diferencia Significativa

Tabla 26. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestra que EGF y IGF-I aumentan la síntesis de S-100 con respecto a los no estimulados. Por lo que, que se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el EGF y IGF-I aumenta la síntesis de S-100 en el cartílago elástico, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.92 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ), excepto el FGF-2 el cual es menor.

## **DISTRIBUCIÓN “t- STUDENT” PARA LA EVALUACIÓN DE PROTEINAS DE MATRIZ EXTRACELULAR POR CITOMETRIA DE FLUJO PARA CARTILAGO HIALINO.**

Para estas evaluaciones, se van ha plantear de manera opuesta las hipótesis nulas ( $H_0$ ) en cada caso, ya que los factores de crecimiento deben potenciar la síntesis de proteínas de matriz extracelular.

El valor de la media ( $\mu$ ) para  $p$ -Selectina ( $p$ -62) en el cartílago elástico tratada con medio DMEM-F-12 y SFB al 10% (Normal) fue de 17.237%

Hipótesis

$$H_0 = \mu \leq 17.237$$

$$H_a = \mu > 17.237$$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

$t$  Student calculada ( $t_{0.95}$ )

$$T_c = (0.95,3) = \pm 2.3534$$

Valor de la prueba = 17.237 con $\alpha = 5\%$			
Factores de crecimiento	Valor de “t student”	GI	Diferencia de medias
EGF	-6.117	3	-7.77200
FGF	* 50.677	3	26.64050
IGF	* 4.703	3	15.80550

\* Diferencia Significativa

Tabla 27. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestra que el FGFb e IGF-I aumentan la síntesis de  $p$ -62 con respecto a los no estimulados y EGF. Por lo que, se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el FGFb e IGF-I aumenta la síntesis de  $p$ -62 en el cartílago hialino, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.3534 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ); y el EGF no aumenta la síntesis de  $p$ -62.

El valor de la media ( $\mu$ ) para Colágena tipo II en el cartílago elástico tratada con medio DMEM-F-12 y SFB al 10% (Normal) fue de 50.2875%

Hipótesis

$$H_0 = \mu \leq 50.2875\%$$

$$H_a = \mu > 50.2875\%$$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

$t$  Student calculada ( $t_{0.95}$ )

$$T_c = (0.95,3) = \pm 2.3435$$

Valor de la prueba = 50.2875 con $\alpha = 5\%$			
Factores de crecimiento	Valor de “t student”	GI	Diferencia de medias
EGF	-1.375	3	-7.30500
FGF	.658	3	3.33750
IGF	-2.674	3	-8.10750

Tabla 28. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestra que ninguno de lo que factores de crecimiento aumentan la síntesis de colágena II con respecto a los no estimulados. Por lo que, que se acepta  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que los factores de crecimiento no aumenta la síntesis de colágena II en el cartílago hialino, ya que los valores de t-student son menores que  $T_c$  de 2.34 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ).

El valor de la media ( $\mu$ ) para Agrecano en el cartílago elástico tratada con medio DMEM-F-12 y SFB al 10% (Normal) fue de 17.4175%

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 17.4175\%$

$H_a = \mu > 17.4175\%$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

$t$  Student calculada ( $t_{0.95}$ )

$T_c = (0.95, 3) = \pm 2.3435$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 17.4175 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
EGF	*	18.435	3	42.31250
FGF	*	6.143	3	21.11500
IGF	*	5.944	3	21.25500

Tabla 29. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestra que los 3 factores de crecimiento aumentan la síntesis de agrecano con respecto a los no estimulados. Por lo que, que se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que los factores de crecimiento aumenta la síntesis de agrecano en el cartílago hialino, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.34 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ).

El valor de la media ( $\mu$ ) para S-100 en el cartílago elástico tratada con medio DMEM-F-12 y SFB al 10% (Normal) fue de 56.0255%

Hipótesis

$H_0 = \mu \leq 56.0255\%$

$H_a = \mu > 56.0255\%$

Nivel de significación  $\alpha = 0.05$

$t$  Student calculada ( $t_{0.95}$ )

$T_c = (0.95, 3) = \pm 2.3435$

\* Diferencia Significativa

Valor de la prueba = 56.0255 con $\alpha = 5\%$				
Factores de crecimiento		Valor de "t student"	GI	Diferencia de medias
EGF	*	4.732	3	12.35200
FGF		.536	3	.28450
IGF		-1.020	3	-1.17800

Tabla 30. Evaluación de la distribución t de *student*. En esta tabla se muestra que EGF aumentan la síntesis de S-100 con respecto a los no estimulados, FGFb e IGF-I. Por lo que, que se rechaza  $H_0$  con  $\alpha = 5\%$  y en consecuencia se puede afirmar que el EGF aumenta la síntesis de S-100 en el cartílago hialino, ya que los valores de t-student son mayores que  $T_c$  de 2.92 (obtenido de la tabla de percentiles de la distribución  $t^*$ ), excepto el FGF-2 y IGF-I los cuales son menores que  $T_c$ .



## 12.- BIBLIOGRAFIA

1. Vacanti JP, Langer, R. Tissue engineering: the desing and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Tissue Eng* 1999; 354: s132-s134.
2. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioessays* 1995;17:1039-48.
3. Alberts, B. et al. Molecular Biology of the cell. 4<sup>a</sup> ed. 2002
4. Ham Arthur W. Tratado de histología. 7<sup>a</sup>. México: Interamericana,1976
5. Vega Alvarez JA y cols. Bioquímica y biología del cartílago articular. *Rev. Ortop Traumatol* 2002; 5: 391-400
6. Pineda K, Gerentes E, Starosta R. Caracterización morfológica y bioquímica de condrocitos *in vitro*. *INHRR*; 2004; 35: 1-11
7. Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH. The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med* 1998;76:275-88.
8. Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989;3:2042-51.
9. Kiani C, Chen L, Wu YJ, Yee AJ, Yang BB. Structure and function of aggrecan. *Cell Res* 2002;12:19-32.
10. Maldonado JG, Jaramillo HN. Factores de crecimiento I. *IATREIA* 1996; 9: 83-87.
11. Ganong FW. Fisiología Médica. 14a ed. México: Manual Moderno, 1994: 921p.
12. Barbeito C. y cols. Los factores de crecimiento. Aspectos básicos y potencialidades terapéuticas. *Analecta Veterinaria* 2005; 25 (1): 8-27.
13. Madry H, et al. Over expression of human IGF-I in chondrocyte transplantation. *Gene therapy* 2001; 8:1443-1449.

14. Arrieta Oscar, Sotelo Julio. Factores de crecimiento en tumores cerebrales: un blanco terapéutico. *Mensaje Bioquímico* 2005; 29: 29-41.
15. Garcia GA, y cols. Factor inhibidor de la leucemia y su papel en procesos fisiológicos y patológicos. *Med. UNAB* 2006; 9: 236-245.
16. Bosque Gómez AR. Proliferación vascular inducida por genes. *Rev Fac Med UNAM* 2001; 44 (1): 38-40.
17. Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi F. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: autocrine role during endochondral bone formation. *J Cell Sci* 2000;113: 59-69.
18. Ornitz MD, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001; 2 (3): 3005.1-3005.12.
19. Chua KH, et al. FGFb with human serum supplementation enhancement of human chondrocyte proliferation and promotion of cartilage regeneration. *Singapore Med J* 2007; 48 (4) 324-332.
20. Gospodarowicz D, Mescher LA. A comparison of the responses of cultured myoblasts and chondrocytes to fibroblasts and epidermal growth factors. *J Cell Physiol* 1977; 93: 117-128.
21. Kato Y, Gospodarowicz D. Growth requirements of low-density rabbit costal chondrocyte cultures maintained in serum-free medium. *J Cell Physiol* 1984; 120: 354-363.
22. Guillén SM, Mirabet LV y cols. Chondrocyte redifferentiation within platelet factors-rich plasma for articular chondroplasty. *Patología del aparato locomotor* 2005; 3(1): 13-23.
23. Maldonado JG, Jaramillo HN. Factores de crecimiento IV. *IATREIA* 1999; 12: 61-62.
24. Isogai et al. Comparison of chondrocytes in cartilage models. *Tissue Eng* 2006; 12(4): 691-703.
25. Schuiz M, Salem ZC. Reconstrucción auricular. *Cuad Cir* 2003;17: 75-85.

26. Pascual Garrido C. Terapias celulares para el tratamiento de las lesiones de cartílago en ortopedia y traumatología. *Rev Hosp Ital B. Aires* 2004; 24 (1): 30-32.
27. Sánchez-Sotelo J. Estado actual de las técnicas reparadoras del cartílago articular. *MC medical* 2007; 15(1): 1-5.
28. United Network for organ sharing. Critical data for 2000: U.S. facts about transplantation.
29. Pörtner, R., Nagel-Heyer, S., Geopfert, P., and N.M. Meenen. Bioreactor design for tissue engineering. *J Biosc and Bioeng* 2005, 100(3); 235-245.
30. Dib-Kuri A, et al. Transplantes de órganos y tejidos en México. *Rev Invest Clin* 2005; 57(2): 163-169.
31. Knight, Mark AF, Gregory, Evans. Tissue engineering: progress and challenges. *Am Soc Of Plast Surg* 2004; 114(2): 26e-37e
32. Langer R, and J.P. Vacanti. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
33. Kneser, U., Schaefer, D.J., Polykandriotis, E., and R.E. Horch. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006, 10(1):7-19.
34. Suth H, Fundamental concepts for the tissue engineering. *Biomater Reserch.* 1998, 2: 1-7.
35. Langer, Robert and Tirrell David. Designing materials for biology and medicine. *Nature* 2004; 428(6982):487-492.
36. Walgenbach KJ., Voigt M., Riabikhin AW. Et al. Tissue engineering in plastic reconstructive surgery. *Anat Rec* 2001; 263:372.
37. Cook, A.D. et al. Characterization and development of RGD-peptide-modified poly(lactic acid-co-lysine) as an interactive, resorbable biomaterial. *J Biomed Mater Res.* 1997; 35: 513-523.
38. Kelch, S. & Lendlein, A. Shape memory polymers. *Angew Chem Int Edn Engl* 2002; 41: 2034-2057.
39. Millar R, Brady JM, Cutright D. Biodegradable polymers. *J Biome Mater Res* 1977; 11: 711-714.

40. Heya T, Okada H, Ogawa Y, Toguchi H. Biopolymers. *Int J Pharm* 1991; 72: 194-205.
41. Couceiro Follence J, et al. Cultivo de condrocitos. *Rev Ortop Traumatol* 2002; 5: 436-447.
42. Jacob M, Dérmarteanu O y cols. Articular chondrocytes is enhanced by specific prostaglandins. *Rheumatology* 2004; 43(7): 852-857.
43. Liu G, Kawaguchi H, et al. Optimal factors for chondrocyte redifferentiation. *J Biol Chem* 2007; 10:1-16
44. Velasquillo C, et al. Diferenciación del cartílago articular y osteoartritis. *Reumatol Clin* 2007; 3(3): 52-55.
45. Cofan M, Fernández-Sola J. Cultivos Celulares: Utilidad en investigación biomédica. *Med Clin* 1992; 98: 782-789.
46. Mora G, Alvares E, Ripalda P, et al. Transplante meniscal: efecto sobre cartílago articular. Estudio experimental en corderos. *Mapfre medicina* 2002; 13(3): 180-185.
47. Capitán Guarnizo A, et al. Autoinjerto subcutáneo de cartílago neosintetizado. *Acta otorrinolaringol Esp* 2002; 53: 631-636.
48. Amiel GE, Yoo JJ, Kim BS, Atala A. Tissue engineering stents created from chondrocytes. *Journal of urology* 2001; 165(6, part 1 of 2): 2091-2095.
49. Vunjak-Novakovic G., Martin I., Obradovic B., Treppo S., Grodzinsky AJ., Freed LE. Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineering cartilage. *J Orthop Res* 1999;17:130-138.
50. Obradovic B, Martin I, Padera RF, Treppo S, Freed LE. Integration of engineering cartilage. *J Orthop Res* 2001; 19: 1089-1097.
51. Puelacher, D. And Vacanti CA. Tissue-engineered grow of cartilage: The effect of varying the concentration of chondrocytes ceded onto synthetic polymer matrices. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994, 23:49-56
52. Panossian, A, Ashiku S, Kirchhoff H, Randolph MA, and MJ Yaremchuk. Effets of cell concentration and grow period on articular and ear condrocyte

- transplants for tissue engineering. *Plastic and reconstructive surgery*, 2001, 108: 392-402.
53. Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mendelin J, et al. Analysis of 16 different metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in traumatic and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 691-697.
54. Chopra R, Anastassaiades T. Specificity and synergism of polypeptide growth factors in stimulating the synthesis of proteoglycans and an novel high molecular weight anionic glycoprotein by articular chondrocyte cultures. *J Rheumatol* 1998; 25:1578-84.
55. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Métodos histotecnológicos. Washington, D.C.: ARP y AFIP, 1995
56. Reyes Maldonado Elba, De la Vega Bravo Leonila. Manual de Citoquímica. México: IPN, 2007.
57. Marques de Cantú MJ. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. México: McGraw-Hill, 1996.
58. Pelletier et al. Cytokines and inflammation in cartilage degradation. *Rheumatic Dis Clinics North Amer.* 1993;19:545-568.
59. Akens et al. Influence of species and anatomical location on chondrocyte expansion. *BMC Musculoskeletal Disorders* 2005, 6:23
60. Schmal et al. bFGF influences human articular chondrocyte differentiation. [Cytotherapy](#). 2007;9(2):184-93.
61. Loeser et al. Basic fibroblast growth factor Inhibits the anabolic activity of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 in adult human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 2005; 52(12): 3910–3917.
62. Bujía et al. Effect of growth factors on cell proliferation by human nasal septal chondrocytes cultured in monolayer. *Acta Otolaryngol.* 1994;114(5):539-43