



Universidad Nacional Autónoma de México

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas y
Odontológicas

Instituto Nacional de Rehabilitación
“Dr. Luis Guillermo Ibarra Ibarra”

“Evaluación de la viabilidad y la capacidad condrogénica de los condrocitos
cadavéricos co-cultivados en un modelo tridimensional para la reparación de
cartílago articular”

Tesis que para optar por el Grado de:
Doctor en Ciencias Médicas

Presenta:

Dra. Anell Olivos Meza

Tutora:

Dra. María Cristina Velasquillo Martínez
Instituto Nacional de Rehabilitación

Responsable de la Entidad:

Dra. Margarita Valdés Flores
Instituto Nacional de Rehabilitación

México D.F a 16 de Enero de 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

| | |
|-------------------|-------|
| Introducción | 2 -10 |
| Proyecto de Tesis | 11-12 |
| Metodología | 13-21 |
| Resultados | 22-29 |
| Discusión | 30-33 |
| Conclusiones | 32 |
| Referencias | 34-38 |
| Anexo | 39-48 |

INTRODUCCION

Las lesiones condrales y osteocondrales son problemas de salud pública vistos comúnmente en la práctica clínica diaria. Estas lesiones se presentan principalmente en las grandes articulaciones sinoviales de carga como la rodilla y la cadera. Las articulaciones sinoviales están compuestas por cartílago hialino que cubre cada extremo de los huesos largos, lo cual les permite tener una movilidad libre, así como una estructura y función altamente especializada. Sin embargo, esto las hace susceptibles a múltiples patologías, particularmente enfermedades degenerativas como la osteoartrosis.¹

El origen embrionario del cartílago articular deriva del mesodermo, a partir del cual se forman todos los tejidos conectivos del sistema musculoesquelético. Cada tejido (cartílago, hueso y músculo) se diferencia bajo diferentes mecanismos, en el caso de la formación del cartílago articular es bien conocido que el factor de transcripción Sox-9 actúa como regulador clave. Gran parte de la embriogénesis recae en la diferenciación de las células troncales mesenquimales (CTM) residentes hacia el linaje celular requerido. La condrogenesis es un proceso de diferenciación coordinada en el cual las CTM se condensan y se diferencian a condrocitos, los cuales comienzan a secretar moléculas que forman Matriz Extracelular (MEC). Este proceso es iniciado por la señalización de hedgehog, el cual induce la activación de las proteínas morfogenéticas (BMPs) y dirige la diferenciación de las CTM hacia el linaje condrogénico. Sox-9 es el factor de transcripción clave en la diferenciación de los condrocitos que activa la expresión de diversos genes específicos como Col2a1, Acan y Comp.¹ Los condrocitos diferenciados expresan colágeno tipo II, agregano y proteína oligomérica de matriz (COMP); componentes esenciales de la MEC del cartílago hialino, los cuales le confieren las propiedades biomecánicas características de este tejido.

El cartílago articular es un tejido altamente especializado cuya función distribuir cargas y disminuir la fricción entre dos superficies articulares en contacto. En el adulto, el cartílago hialino está constituido por una población dispersa de condrocitos (2%) embebidos dentro de una matriz extracelular compuesta principalmente de dos tipos de macromoléculas, colágeno (II, IX y XI) y proteoglicanos (agrecano).^{2,9} A pesar de ser un tejido con un elevado metabolismo celular tiene una limitada capacidad de regeneración, debido a su carente aporte sanguíneo, baja celularidad y difícil acceso a las células troncales mesenquimales y factores de crecimiento apropiados.^{2,3,16} Las células condrales son los responsables de la síntesis y degradación de los componentes de la matriz extracelular, mientras que ésta última determina las cualidades funcionales del tejido. Los condrocitos expresan y mantienen las características fenotípicas de la línea condroide bajo el control de diversas señales moleculares.^{9,30}

Las lesiones condrales traumáticas son defectos del cartílago articular que suceden por lesiones deportivas frecuentemente.⁹ Dichas lesiones han sido encontradas hasta en un 63% de los pacientes sometidos a artroscopias de rodilla.⁹ En pacientes jóvenes, ocasionan un grado de incapacidad equiparable a pacientes con osteoartritis avanzada.¹⁶ Está bien establecido que el cartílago articular tiene limitada capacidad de reparación y cuando logra hacerlo, el nuevo tejido formado es estructuralmente diferente (fibrocartílago) y no posee las cualidades biomecánicas del cartílago nativo.

El tratamiento quirúrgico de las lesiones condrales es amplio. En general hay dos objetivos que se buscan para obtener mejoría clínica: llenar el defecto con tejido que tenga propiedades biomecánicas equiparables a las del cartílago articular y promover una integración exitosa al tejido original adyacente.³ Las microfracturas, la mosaicoplastía y el implante autólogo de condrocitos (ACI y MACI) son los principales procedimientos de restauración del cartílago

articular que han sido evaluados para la aplicación clínica mediante ensayos clínicos controlados.²⁵

La técnica de microfracturas descrita por Steadman y colaboradores es frecuentemente considerada como la primera opción de tratamiento para las lesiones condrales de espesor total debido a su naturaleza mínima invasiva, limitada morbilidad y bajo costo. La técnica consiste en hacer perforaciones en el hueso subcondral para ocasionar sangrado de la medula ósea que libere las células troncales mesenquimales y los factores de crecimiento apropiados para la reparación a través de la formación de un coágulo. Las células troncales indiferenciadas maduran y forman fibrocartílago con un porcentaje inferior de colágeno tipo II que proporciona menor resistencia biomecánica que el cartílago hialino, por lo que la reparación resulta ser defectuosa. Más aún, es frecuente que el tejido de reparación no se integre en la zona adyacente del cartílago normal debido a las propiedades antiadhesivas de la matriz extracelular del cartílago.^{25,28} Steadman y cols. reportaron que el 80% de 71 rodillas en pacientes con edad menor a 45 años, con lesiones aisladas postraumáticas tuvieron mejoría clínica en un seguimiento hasta de 7 años. Sin embargo, una revisión sistemática de 28 estudios recientes que involucraron 3,122 pacientes han reportado mejoría funcional a los 2 años de tratamiento, pero con durabilidad inconclusa más allá de los 24 meses de tratamiento.²⁵

La mosaicoplastia, también conocida como trasplante osteocondral autólogo (OATS por sus siglas en inglés) descrito por Hangody y cols. tiene como principio llenar la lesión condral de espesor total con múltiples taquetes osteocondrales tomados de la rodilla ipsilateral de una zona de “no carga” de los cóndilos femorales.^{25,26} Hangody y Fülecs estudiaron una serie de 831 pacientes con un seguimiento a 10 años reportando resultados buenos a excelentes en 92% de las lesiones en cóndilos femorales, 87% de los tratados en lesiones tibiales, 79% de

las lesiones en patela y 94% de las lesiones de tobillo. Las desventajas de esta técnica incluyen una limitada disponibilidad del tejido donador (1-4cm²), lesiones focales pequeñas y medianas, edad límite de 50 años como máximo de los pacientes que sean sometidos a esta técnica.²⁶

En 1994, Britberg y cols. describieron el Implante Autólogo de Condrocitos (ACI por sus siglas en inglés). Esta técnica involucra el cultivo de condrocitos posterior a la toma de biopsia de aproximadamente 200 a 300mg de tejido osteocondral de una zona de “no carga” de la rodilla e implantados bajo un parche periostico en el defecto condral. El procedimiento se realiza de forma artroscópica con la desventaja de requerir dos procedimientos (toma de biopsia e implante de condrocitos). Con el limitado número de condrocitos disponibles en el total de volumen del cartílago articular y el limitado tamaño de la biopsia, solamente es posible obtener un pequeño número de células para ser implantadas al paciente. Se requiere un promedio mínimo de 2 millones de células por cm² de área para poder reparar una lesión condral; tomando en cuenta esto, para el tratamiento restaurativo de una superficie articular completa de 120cm² serían necesarias 240 millones de células. Se calcula que es posible obtener 2 millones de condrocitos por cada gramo de biopsia tomada.³³ Por tal motivo, para obtener un número adecuado para la re-implantación, los condrocitos deben ser expandidos in vitro, en un proceso de varios subcultivos denominados pases durante los cuales las células se desdiferencian y pierden la capacidad condrogénica de formar cartílago hialino tras la re-implantación.³⁰ El tejido de reparación obtenido de esta técnica contiene componentes similares a los del cartílago hialino normal, pero aún biomecánicamente inferior.^{25,28}

Los resultados reportados del ACI han sido de buenos a excelentes en 51 de 61 pacientes con una media de seguimiento de 7.4 años. Sin embargo, en los estudios de revisión de mejor nivel de evidencia (IA) no se ha podido demostrar diferencia significativa entre los resultados

del ACI y las microfracturas en un promedio de seguimiento a 5 años.²⁵ Dadas las conclusiones de diversos estudios y debido a la carencia de superioridad en los tratamientos antes descritos, se recomienda la utilización de las microfracturas como técnica de elección debido a la disponibilidad, bajo costo y baja morbilidad comparado con las otras técnicas. Por otro lado, los resultados de estudios clínicos aleatorizados reportan que el trasplante osteocondral tiene mejores resultados que las microfracturas en casos específicos como atletas jóvenes con lesiones condrales pequeñas focalizadas.²⁵

Otro de los procedimientos de reparación de cartílago que ha tomado auge es el Implante de Condrocitos Autólogos basados en una Matriz (MACI por sus siglas en inglés). Los condrocitos se cultivan en una membrana de colágeno porcino tipo I/III y se ha demostrado que expresan marcadores extracelulares de matriz y otros marcadores encontrados en el cartílago articular normal.²⁹

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario de investigación que combina los conocimientos de las ciencias materiales con la biología celular y molecular, pudiendo ofrecer una alternativa eficaz para la reparación de las lesiones condrales, con el objetivo de restaurar la estructura completa y las propiedades del cartílago nativo a través del cultivo de células con potencial condrogénico (condrocitos y células troncales mesenquimales) evitando que se requieran dos procedimientos quirúrgicos.^{16,27}

Ingeniería de tejidos y desdiferenciación de condrocitos.

Durante varias décadas la ingeniería de tejidos ha sido la principal actividad dedicada a la reparación de las lesiones traumáticas o degenerativas del cartílago, para la cual es necesaria la presencia de tres elementos: células (condrocitos), factores de crecimiento y andamios (scaffolds). Los condrocitos del cartílago articular son células mesenquimales especializadas

encontradas exclusivamente en el cartílago, por lo que, cuando se pretende reparar este tejido la fuente más obvia para regenerarlo es a través de las células diferenciadas y especializadas o en aquellas que dan origen al linaje condral.²⁰ Sin embargo, el número de condrocitos obtenidos en biopsias es escaso, por lo que se requiere multiplicarlas en cultivo. Para solventar esta problemática, a través de la ingeniería tisular, los condrocitos son aislados de biopsias pequeñas de cartílago tomadas de zonas de “no carga” de la articulación, para posteriormente expandirlas *in vitro* y prepararlas para su implante dentro de la lesión.¹⁶

La principal limitante del cultivo de condrocitos en monocapa es que a través de múltiples repeticiones, cambia el patrón de síntesis de proteínas y la morfología celular, éste fenómeno es descrito en la literatura como *desdiferenciación*.^{5,9,15,20} La *desdiferenciación* de los condrocitos se caracteriza por múltiples cambios en el patrón de síntesis de colágeno tipo II a colágeno tipo I, en la expresión de los receptores de colágeno COL2A1 y COL1A2, cese en la producción de agregan y otros constituyentes que proporcionan las características mecánicas del cartílago *in vivo*.^{9,11,15-18} Debido a estas peculiaridades, se ha aplicado el análisis genético como marcador de *desdiferenciación*. Así, la pérdida del fenotipo de los condrocitos puede ser caracterizada por la expresión de dos isoformas de ARN: 1) RNA-IIA expresada en los pre-condrocitos y 2) RNA-IIB encontrada en los condrocitos del cartílago maduro.⁹ Estudios recientes en conejos, han demostrado que la morfología celular indica el estado de los condrocitos, observándose una forma redondeada en el caso de las células diferenciadas, mientras que los condrocitos en proceso de *desdiferenciación* reflejan una morfología estrecha y alargada con una elevada expresión de colágeno tipo I.^{15, 18}

La ingeniería del cartílago articular basada en las células es un enfoque prometedor, innovador, y multidisciplinario que utiliza los principios de la ingeniería y de las ciencias biológicas para la fabricación de sustitutos funcionales para la reparación o la sustitución del

cartílago dañado. Los principios básicos de la ingeniería de tisular utilizan una pequeña porción inicial de tejido del donador como una fuente de células (los condrocitos, los fibroblastos o las células madre), las cuales se aíslan y se expanden a un número clínicamente significativo, posteriormente se siembran para obtener una forma conveniente o un nuevo tejido; mientras se apoya su crecimiento y diferenciación mediante la adición de factores bioactivos apropiados.

El cultivo de condrocitos representa una importante alternativa para reparar el cartílago dañado. Con el objetivo de obtener cartílago similar al nativo, el proceso de desdiferenciación debe ser revertido, para lo cual diversas metodologías han sido estudiadas para retener o restaurar la expresión normal de genes y proteínas.¹⁹ La pérdida del fenotipo de los condrocitos ha sido documentada también por la carencia en la acumulación de proteoglicanos en la matriz extracelular, la cual normalmente debe contener moléculas de gran tamaño como agregano y ácido hialurónico y moléculas de menor tamaño como decorina y biglicano.² Algunos de los principales métodos para inducir la rediferenciación, son el cultivo celular en un ambiente tridimensional, dosificación de oxígeno a baja tensión, estimulación mecánica o la adición de factores de crecimiento, sin embargo, estos últimos tienen un costo elevado, lo que limita su uso en la ingeniería tisular.^{2,11,12,14.} Recientemente, se ha demostrado que el co-cultivo de condrocitos en segundo pase con condrocitos en cultivo primario estimula la recuperación del fenotipo y mejora el tejido formado.³⁰ Nazish y cols. demostraron en dos estudios que un número relativamente pequeño de condrocitos primarios (Pase 0) puede ser usado para inducir la rediferenciación de los condrocitos desdiferenciados (Pase 2) en un sistema de co-cultivo, describiendo que este proceso es estable y que las células rediferenciadas (rP2) aisladas del cocultivo eran capaces de formar cartílago hialino con una matriz extracelular rica en proteoglicanos y colágeno tipo II.² Otros autores también

han propuesto que el mecanismo de desdiferenciación puede ser reversible (Benya y Schaffer, 1982; Cheung y cols., 1976) y aunque los mecanismos precisos que controlan esta desdiferenciación no han sido establecidos, se cree que la rediferenciación es un proceso crítico para la reparación del cartílago articular dañado.³¹ Cuando los condrocitos son liberados del cartílago articular y expandidos en un cultivo monocapa pierden su morfología redonda característica y cambian su expresión de genes específicos de cartílago de colágeno II a colágeno I.³²⁻³⁴

PROYECTO DE TESIS

Título: Evaluación de la viabilidad y la capacidad condrogénica de los condrocitos cadavéricos co-cultivados en un modelo tridimensional para la reparación de cartílago articular.

RESUMEN

Introducción: Las lesiones articulares son en un gran problema de salud pública (60% de las artroscopias de rodilla). La ingeniería tisular es un abordaje útil en el área de la regeneración del cartílago articular. Sin embargo, la aplicación de ésta metodología tiene dos grandes obstáculos: número limitado de condrocitos en el tejido cartilaginoso sano para su cultivo (2%) y pérdida del fenotipo (desdiferenciación) de los condrocitos al cultivarse en monocapas. **Objetivo General:** Comparar mediante histología la calidad del tejido de neoformación obtenido del implante de constructos tridimensionales de condrocitos co-cultivados en Pase-2 y Pase-0 versus condrocitos No co-cultivados en un modelo in-vivo. **Metodología:** Se incluyeron dos grupos de donadores: vivos (DV) y cadavéricos (DC); seis sujetos en cada grupo con edades de 15 a 50 años. Se tomaron biopsias osteocondrales de las zonas de carga de la rodilla en ambos grupos, el cartílago se procesó para aislar los condorcitos. Las células en Pase-0 (P0) provenientes de donador cadavérico se congelaron un 50% y el resto se expandió hasta el Pase-2 (P2). Al inicio del Pase-2 a una parte de las células se les adicionó ácido ascórbico para formar una monocapa, el resto se expandió para obtención de pellet. Los constructos se formaron con un andamio de colágeno más una monocapa en Pase-2 sobre la cual se colocó un pellet de condrocitos co-cultivados ó condrocitos No-co-cultivados. Cada constructo se implantó en un ratón atómico y se extrajo a los 3 meses para la evaluación histológica del tejido neoformado. **Resultados:** La calidad

del tejido formado por los condrocitos co-cultivados fue mejor que la de los condrocitos no co-cultivados (4.37, DE \pm 4.71), existiendo diferencias aún dentro del grupo de los co-cultivos con mejor calidad del tejido neoformado de los co-cultivos con células criopreservados (9.57, DE \pm 1.27) comparado con los co-cultivos de las células recién aislados (8.71, DE \pm 3.98).

Conclusiones: El co-cultivo de condrocitos desdiferenciados y de condrocitos primarios mejora la calidad histológica del cartílago de reparación.

METODOLOGIA

1. Biopsias osteocondrales de Donador Cadavérico

Donadores cadavéricos provenientes del Banco de Tejidos Musculoesquelético y Piel Biograft de México con edades de 15 a 50 años fueron incluidos en éste estudio. Biopsias osteocondrales de 10 milímetros de diametro (COR; DePuy Mitek, Raynham, MA) fueron tomadas de la zona de carga de los condilos femorales de ambas rodillas. El procedimiento se realizó con técnica estéril por personal de procuración de Biograft. Una vez tomadas, las biopsias se colocaron en tubos con medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 GIBCO, Grand Island, NY) más antibiótico y antimicótico al 10%. Los tubos con las muestras fueron trasladados desde el hospital de fallecimiento el Instituto Nacional de Rehabilitación (INR) transportandose en una hielera a una temperatura promedio de 4°C.

2. Biopsias de Donador Vivo

Después de la aprobación del proyecto por el comité de Ética e Investigación Institucional, se invitaron a potenciales donadores de cartílago articular al estudio. Si los sujetos aceptaban se les solicitaba firma del consentimiento informado. Pacientes programados para reconstrucción del Ligamento Cruzado Anterior (LCA) con edades entre 18 y 50 años fueron incluidos en el proyecto para la obtención de condrocitos recién aislados (P0r).

Todos los pacientes fueron sometidos a anestesia regional. En posición de decúbito supino y con la rodilla a intervenir en flexión de 90°, previa realización de asepsia y aislamiento del área quirúrgica con campos estériles, se realizó un recorrido artroscópico de la rodilla para determinar las condiciones de las estructuras articulares, confirmar el diagnóstico prequirúrgico y descartar que existan criterios de exclusión que nos hicieran eliminar al

paciente del estudio. Una vez finalizado el recorrido artroscópico se inicia con la escotaduroplastia para visualizar la zona exacta de colocación del túnel femoral para la plastia de ligamento cruzado correspondiente, se tomo un taquete osteocondral de 4 milímetros (COR; DePuy Mitek, Raynham, MA) de la pared lateral de la escotadura en una zona de no carga (Fig. 1-A). La muestra se extrajo cuidadosamente para no causar danos en el cartílago articular (Fig. 1-B). La biopsia tomada corresponde a un taquete con pastila óse de aproximadamente 10mm de longitud para su adecuada manipulación (Fig. 1-C). Personal especializado del laboratorio de ingeniería tisular estuvo dentro de quirófano en espera de la muestra para transportarla hasta el laboratorio en donde sería procesada. Las muestras condrales serán depositadas en un tubo plástico estéril con medio de cultivo (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 GIBCO, Grand Island, NY) más antibiótico y antimicótico al 10%. Sellado y en condiciones estériles la muestra se transportó al laboratorio de ingeniería tisular del INR. Una vez realizada la escotaduroplastia, se procedió con el procedimiento para la plastia de LCA bajo la técnica convencional.



Fig. 1 A) Un taquete osteocondral de 4mm de diametro con profundidad de 10mm se obtuvo de la escotadura lateral de la rodilla intervenida. B) Las muestras fueron cuidadosamente extraídas sin manipular el cartílago para no causar dano condral. C) Todas las muestras incluyeron una pastila ósea que permitía una adecuada manipulación del tejido.

3. Aislamiento de los Condrocitos

Dentro de una campana de bioseguridad tipo II, los taquetes osteocondrales fueron lavados en tres ocasiones con PBS más antibiótico-antimicótico al 10% para eliminar el exceso de contenido graso y detritos. Se separo el cartílago del hueso con ayuda de un bisturí; el hueso se desechó, mientras que el cartílago se pico en fragmentos lo más pequeño posible para facilitar la digestión enzimática con colagenasa tipo II al 0.3% (Sigma, St Louis, MO, EUA) en medio de cultivo M199 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) durante un promedio de 5 horas

manteniéndose en agitación constante a temperatura ambiente. La suspensión celular se centrifugó a 12,000 RPM durante 12 minutos para obtener un botón celular; se desechó el sobrenadante, se resuspendió el pellet celular en medio de cultivo DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) enriquecido con 10% de suero humano y 1% de antibiótico antimicótico. Se realizó el conteo celular por dos investigadores independientes mediante la técnica de Azul Tripán en la cámara de Neubauer.

4. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular será evaluada mediante la tinción con azul Tripán, mientras que la determinación final de la expansión celular se llevará a cabo mediante el conteo de células por unidad de volumen con el uso de la cámara de Neubauer a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Células/mL} = \frac{\text{Número de células contadas}}{(\text{Superficie de conteo/mm}^2)(\text{Profundidad de la cámara/mm})(\text{Dilución})}$$

5. Expansión de los condrocitos cadavéricos

Una vez determinado el número de condrocitos primarios (P0) viables aislados de donador cadavérico, se tomó el 50% para cultivo y expansión sembrándose a una confluencia de 250,000 células en 25 milímetros de superficie (cajas T-25) en 5ml de medio (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 GIBCO, Grand Island, NY) adicionado con suero humano heterólogo al 10% y antibiótico-antimicótico al 1%. Al alcanzar una confluencia del 90%, los condrocitos se tripsinizaron y se sembraron hasta llevarlos al segundo pase (P2). Para dar inicio al pase-2, una parte de las células se sembró en cajas T-25 con 5ml de medio

(Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 GIBCO, Grand Island, NY) adicionado con suero humano heterólogo al 10% y antibiótico-antimicótico al 1% para pellet celular; mientras que la otra parte se sembró en cajas Petri 60x15mm adicionando 5ml de medio (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 GIBCO, Grand Island, NY) + suero humano heterólogo al 10% + antibiótico-antimicótico al 1% + ácido ascórbico (150mcg/50ml) para promover síntesis de matriz extracelular y formación de monocapa. Los cambios de medio se realizarán dos veces por semana o antes si éste se encontraba con cambios de coloración que indicaran alto metabolismo.

6. Criopreservación de condrocitos cadavéricos

El 50% de los condrocitos primarios aislados de los donadores cadavéricos se criopreservó en viales de 2ml con DMSO 10% y Suero Bovino Fetal (SBF) 10% a una densidad de 5×10^5 células por vial. Para su almacenamiento la temperatura se descendió de forma gradual; primero se colocó en refrigerador a 20°C durante 20 minutos, después los viales se movieron a -80°C durante 24 horas y finalmente las células se almacenaron en nitrógeno líquido a -280°C. Los condrocitos primarios criopreservados (P0c) se guardarán a esta temperatura hasta que los condrocitos en cultivo alcanzaron el Pase 2 (P2) para la realización del cocultivo en el andamio tridimensional.

7. Formación de constructos

Los condrocitos en Pase-2 sembrados en cajas T25 al alcanzar una confluencia del 90 al 100% se despegaron con tripsina y se centrifugaron para formar un pellet celular. Las células a las que se adicionó ácido ascórbico formaron una monocapa que se despegó sutilmente del fondo de la caja de Petri. Se cortaron fragmentos redondos con diámetro de 6mm de un

andamio tridimensional de aplicación clínica formado por fibras de colágeno tipo I y III de origen porcino (Geistlich Bio-Gide®). Por otro lado, el mismo día de la formación de constructos se solicitó muestra de cartílago de los donadores vivos de donde se obtuvieron condrocitos recién aislados en Pase-0 (P0r).

Se formaron los constructos en los tres grupos experimentales de forma similar, siendo la única variante el pellet de condrocitos el cual podía ser con células sin co-cultivar (P2) ó co-cultivadas (P2+P0c, P2+P0r). Sobre la monocapa se colocó el andamio de colágeno con la superficie porosa hacia la parte superior, encima de este se adicionó con una micropipeta de 200ul el pellet con 1.6×10^6 condrocitos en total. En los grupos co-cultivados la relación fue 3:1; es decir 1.2×10^6 condrocitos indiferenciados (P2) y 4×10^5 condrocitos primarios (P0). Una vez colocado el pellet, con los bordes de la monocapa se cubrió el andamio con células envolviéndolo en forma de “crepa”, formando así un constructo monocapa-andamio-pellet. Se adicionó medio de cultivo + suero humano 10% + antibiótico-antimicótico al 1% a la caja de petri en donde se formó el constructo, se guardó en incubadora a 37°C durante 4 días para promover la adherencia celular.

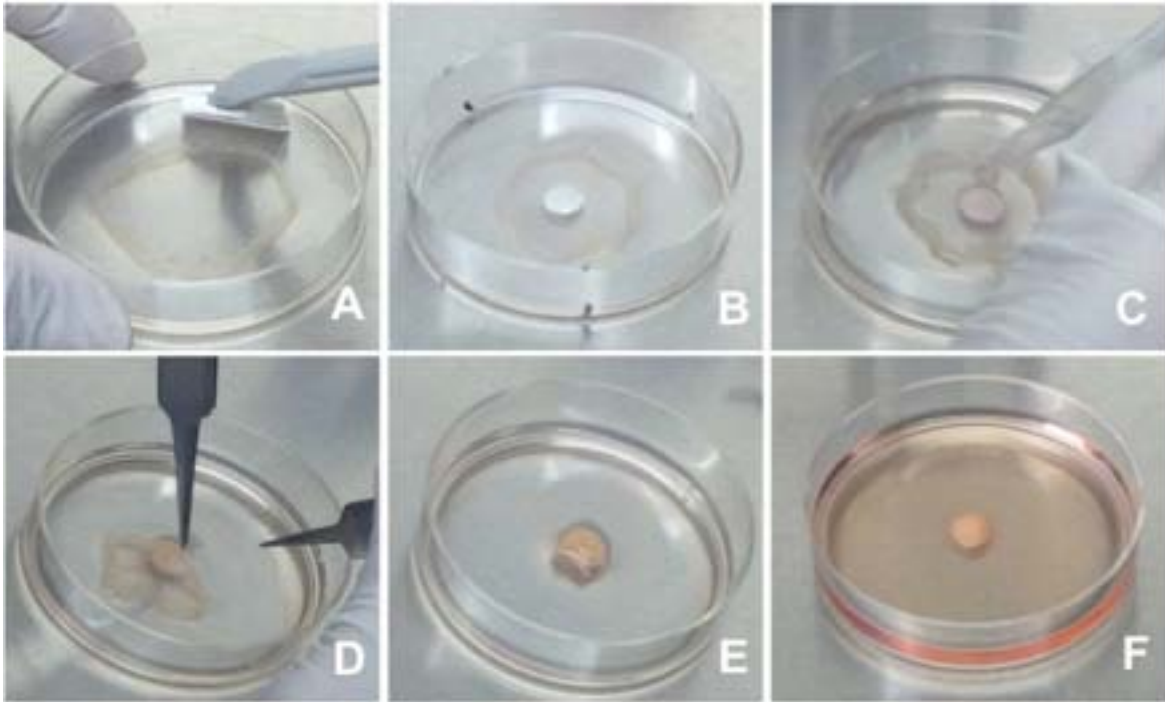


Fig. 2 Formación de constructos. A) Los bordes de la monocapa de condrocitos en Pase-2 se despegaron cuidadosamente del fondo de la caja de Petri. B) El andamio de colágeno de 6mm se colocó en el centro de la monocapa con la superficie porosa hacia arriba. C) El pellet celular de condrocitos co-cultivados o no co-cultivados se colocó sobre la superficie porosa del andamio de colágeno. D) Los bordes de la monocapa se traccionaron sobre el andamio con las células para envolverlo en forma de “crepa”. E & F) Una vez formado el constructo, se le adicionó 5ml de medio de cultivo + suero humano 10% + antibiótico-antimicótico 1% y se dejó dentro del incubador durante 4 días para promover la adherencia celular.

8. Implante de constructo en un modelo in-vivo

Con la premisa de evadir la respuesta antigénica se utilizaron ratones atímicos (NuNu) machos de 4 semanas de edad como bioreactores para el cultivo de los constructos. El procedimiento de implante se realizó bajo anestesia general con Isoflurano inhalado; todas

las cirugías se realizaron dentro de la campana de flujo laminar en el Bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación. Se realizó asepsia del dorso de los ratones, abordaje de aproximadamente 6 a 8mm, se diseco piel y tejido subcutáneo formando una bolsa en donde se introdujo un constructo en cada animal. Se cerró piel con un punto de sutura no absorbible (Dermalon 3-0). Los ratones se regresaron de inmediato a sus jaulas, separandose por grupos experimentales: P2, P2+P0r y P2+P0c. Después de 3 meses de implantados, los ratones fueron sacrificados (basados en la regulación de la norma: NOM-062-ZOO-1999) y el tejido neoformado fue extraído y procesado para histología. Las características macroscópicas como coloración, tamaño y consistencia fueron registradas y comparadas entre grupos.

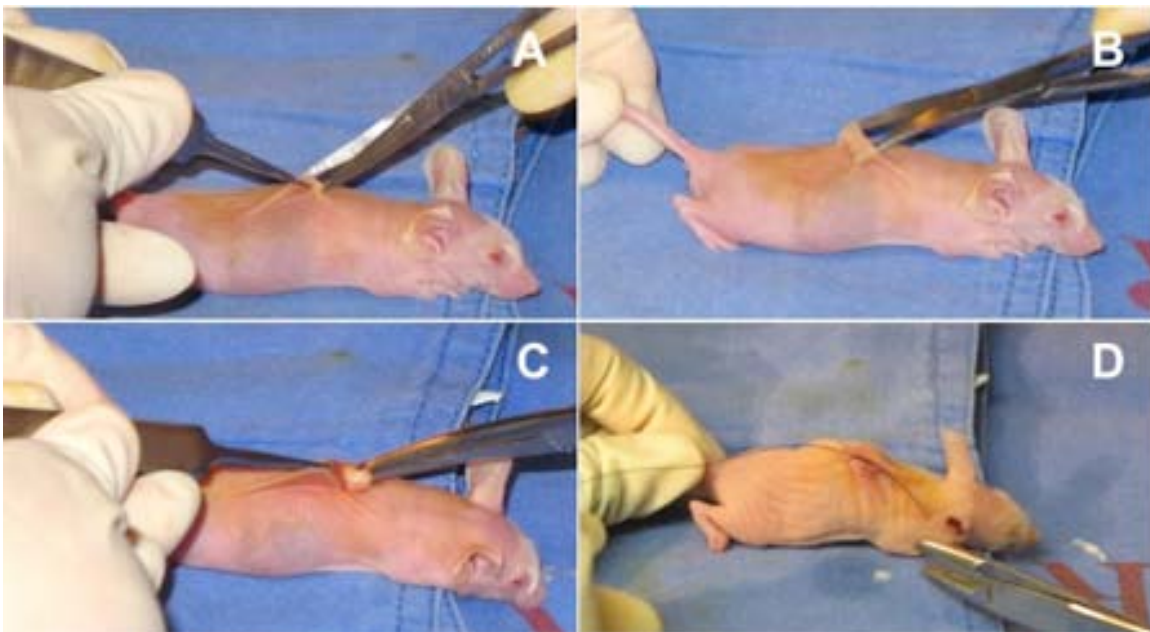


Fig. 3 Todas las cirugías se realizaron bajo anestesia general dentro de una campana con flujo laminar. A) Se realizó un abordaje de 6 a 8mm en el dorso del ratón. B y C) Se disecó el tejido celular subcutáneo formando una bolsa en donde el constructo fue implantado. D) La herida se suturo con puntos simples.

9. Plan de analisis de los resultados

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

RESULTADOS

Biopsias Osteocondrales de Donador Cadavérico (DC)

Se recibieron un total de treinta taquetes osteocondrales provenientes de seis donadores cadavéricos. Sin embargo, dos donadores fueron excluidos por haber presentado resultados serológicos positivos; uno a Virus Linfotrófico-T Humano (HTLV) y el segundo a sífilis, por lo que ocho taquetes provenientes de éstos donadores fueron también eliminados.

Todos los donadores pertenecieron al género masculino con una media de edad de los donadores fue de 30.5 años (rango de 15 a 41). Se obtuvo un promedio de 5.5 (± 1.91) taquetes osteocondrales por donador con un diámetro de 8.5 milímetros (± 1.0) cada taquete. Se cuantificó el peso del cartílago articular obtenido de las biopsias obteniéndose una media de 1.56 gramos (± 58.78) con 3×10^6 condrocitos viables ($\pm 1.16 \times 10^6$). Se obtuvo un promedio de 1,951 (± 70.3) condrocitos por milgramo de cartílago procesado. El tiempo medio de procesamiento del cartílago articular fue de 21.7 horas (± 6.13). Las causas de fallecimiento de los donadores fueron: falla hepática, tromboembolismo pulmonar, muerte cerebral y traumatismo craneoencefálico.

Las características macroscópicas del cartílago proveniente de los donadores cadavéricos fueron muy similares al cartílago articular sano: transparentes, azuladas y de consistencia firme; no se observaron deposiciones de cristales o dano condral en ninguna de las muestras.

Biopsias Osteocondrales de Donador Vivo (DV)

Un total de seis muestras de cartílago articular provenientes de la rodilla de cinco donadores vivos fueron incluidas. En distribución de género, tres donadores fueron hombres (60%) mientras que dos fueron mujeres (40%). Todos los donadores vivos tenían un diagnóstico de ruptura de Ligamento Cruzado Anterior (LCA) y fueron sometidos a reconstrucción

artroscópica del mismo, procedimiento en el cual se tomó la biopsia osteocondral. La edad media de los donadores fue de 32 (± 11.33) años. En este grupo el número de biopsias (1.4, ± 0.54) y el diámetro (4 mm) fue menor que el obtenido en los donadores cadavéricos. El peso promedio del cartílago obtenido por cada donador fue de 0.97 gramos (± 0.69) con 6×10^5 ($\pm 5 \times 10^5$) condrocitos viables. La media de condrocitos por miligramo de cartílago fue de 4,396 (± 2506). El tiempo entre la toma de biopsia y el procesamiento del tejido fue de 1.9 horas (± 0.54). Las características macroscópicas del cartílago fueron de tejido sano, sin presencia de lesiones o depósito de cristales.

Condrocitos de Donador Cadavérico versus Donador Vivo

Se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el tiempo de procesamiento del tejido (toma de biopsia al aislamiento de los condrocitos) entre el DC (21.7 horas) y el DV (1.9 horas) ($p=0.007$). Sin embargo, no se observó diferencia significativa en el número de condrocitos por miligramo de cartílago aislados de DC versus DV ($p=0.12$).

Viabilidad celular

Después del aislamiento, se determinó la viabilidad de los condrocitos mediante la técnica de Azul Tripán y cámara de Neubauer. El total de la superficie de cartílago procesado en los DC fue de 18.4 cm (6.2 grs), mientras que en el DV fue de 2.8 cm (0.48 grs) con 12×10^6 y 3×10^6 condrocitos viables, respectivamente.

Morfología Celular de los cultivos

La morfología de los condrocitos cambió de redonda o poliédrica en las células recién aisladas a fibroblástica en los cultivos Pase-1 y Pase-2, observándose un proceso de desdiferenciación a través de los pases.

Características macroscópicas del cartílago neo-formado

Después de tres meses de implantados en el ratón atímico, los constructos tridimensionales con condrocitos co-cultivados y no co-cultivados, se extrajó el tejido de neo-formación observándose en la mayoría reducción en su tamaño con respecto al original. La consistencia de los constructos cambió de blanda y viscosa a firme e indurada, muy parecida a la del cartílago articular; la superficie era regular y lisa pero la coloración fue amarillenta en los tres grupos.



Fig. 4 A) Tejido de neoformación en la región dorsal del ratón atímico después de 3 meses de implantado. B) Extracción del cartílago formado.

Morfología Celular del cartílago neo-formado

En el cartílago de reparación formado de los condrocitos co-cultivados con células criopreservadas o recién aisladas retuvieron su morfología redonda característica. Sin embargo, los condrocitos no-cocultivados mostraron un fenotipo fibroblástico en el tejido de reparación.

Evaluación del contenido de Glucosaminoglicanos (GAGs) en el tejido neoformado

Las características histológicas del tejido formado por las células co-cultivadas fueron muy parecidas a las del cartílago hialino con células redondas frecuentemente rodeadas de matriz extracelular; contrario al fibrocartílago con presencia de células alargadas o elípticas, matriz fibrilar y escasa en el tejido neo-formado por los condrocitos no co-cultivados. La estimación en el contenido de GAGs se realizó con tinciones de Safranina-O y Azul Alciano, observándose una mayor tinción en intensidad y extensión del tejido formado por los co-cultivos de condrocitos criopreservados (P2+P0c); tinción moderada en el co-cultivo de condrocitos recién aislados (P2+P0r); escasa o nula tinción en el tejido formado por las celular no co-cultivadas (P2) (Fig. 5).

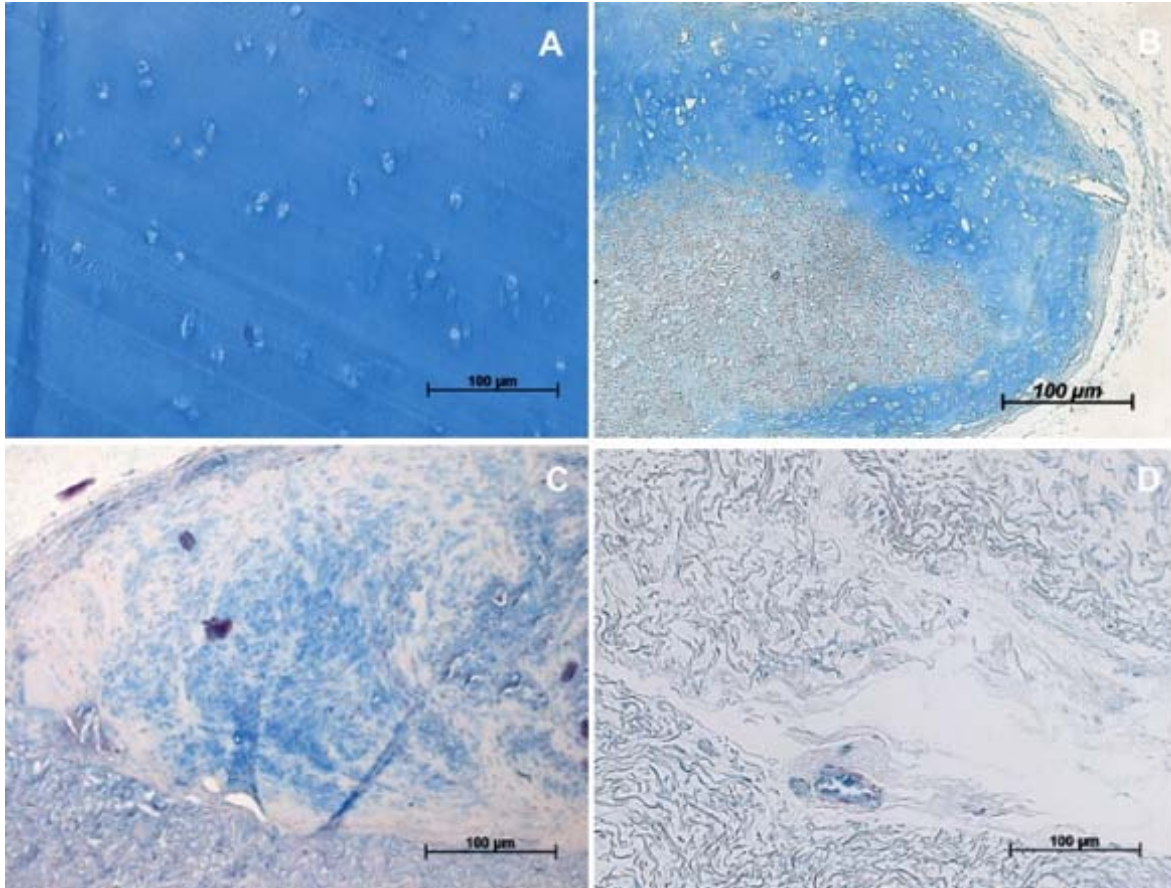


Fig. 5. A) Evaluación de la cantidad de GAGs mediante la tinción de Azul Alciano del cartílago articular (A) comparado y tejido neoformado de los grupos experimentales (B, C y D). B & C) La tinción es más intensa y con una mayor extensión en el tejido formado en los co-cultivos. D) Pequeñas zonas de concentración de GAGs, con tinción menos intensa en el tejido obtenido de células no co-cultivadas (P2).

Cáalidad del tejido neo-formado

Aunque en diferente cantidad, como se ilustra en las imágenes histológicas, se observó tejido de neo-formación en los tres tipos de constructos (co-cultivados y no co-cultivados). Sin embargo, las características estructurales en el tejido formado por las células co-cultivadas (criopreservadas y recién aisladas) fueron aparentemente mejores que las del grupo no co-

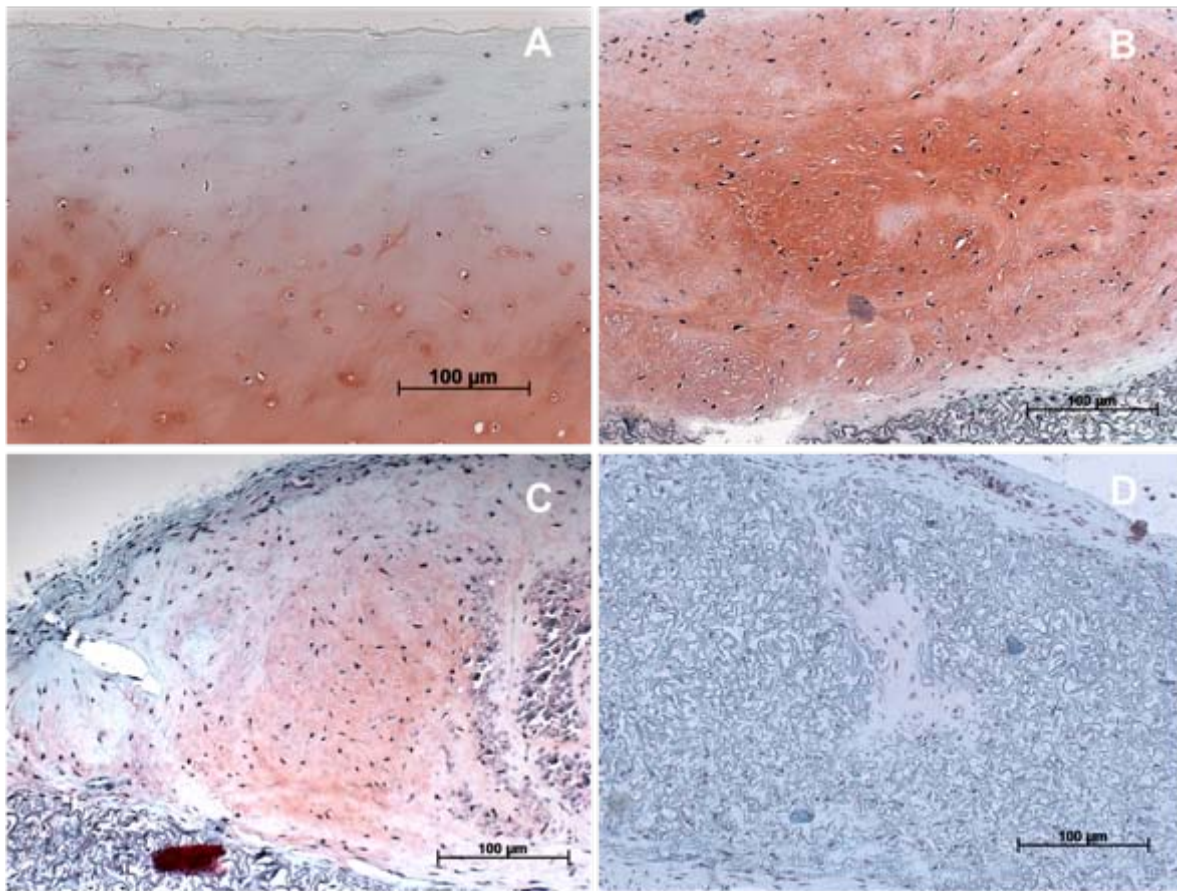
cultivado (P2). Se realizó cuantificación de la calidad histológica del tejido mediante la Escala Modificada de O'Driscoll (Tab. 1) evaluando las características estructurales del tejido neo-formado: morfología celular, tinción con Safranina-O e hipocelularidad. Adicional a esto se tomó en cuenta la facilidad de identificación del tejido al microscopio con diferentes objetivos (4X, 10X y 20X). El puntaje máximo observado en este estudio fue de 14 ($DE \pm 0.0$), lo cual correspondió al cartílago control de los mismos donadores, mientras que el resultado más bajo obtenido fue de 4.37 ($DE \pm 4.71$) en los condrocitos no co-cultivados (P2). Aunque en los condrocitos co-cultivados no se observó un puntaje similar al del cartílago hialino, sí se obtuvo un resultado mucho mejor que el de las células no co-cultivadas con una media de 8.71 ($DE \pm 3.98$) para el co-cultivo de recién aisladas (P2+P0r) y 9.57 ($DE \pm 1.27$) para el grupo de criopreservadas (P2+P0c). No se encontró diferencia significativa entre los co-cultivos ($p=0.053$) (Fig. 6).

2:

O'Driscoll Histological Score (modified)

| | | |
|----------------------------|--|---|
| | Hyaline articular cartilage | 4 |
| Cellular morphology | Incompletely differentiated mesenchyme | 2 |
| | Fibrous tissue or bone | 0 |
| Safranin-O staining | Normal or nearly normal | 3 |
| | Moderate | 2 |
| | Slight | 1 |
| | None | 0 |
| Hypocellularity | Normal cellularity | 3 |
| | Slight hypocellularity | 2 |
| | Moderate hypocellularity | 1 |
| | Severe hypocellularity | 0 |
| Microscopic Identification | Easy identification at 4x | 4 |
| | Easy identification at 10x | 3 |
| | Easy identification at 20x | 2 |
| | Difficult identification at 20x | 1 |
| | No identification of cartilage-like tissue | 0 |

Tab. 1. Escala Modificada de O'Driscoll con los rubros histológicos detallados a considerar en la evaluación del cartílago de reparación.



| Histological evaluation with the adapted O'Driscoll score | | | |
|---|------|------|-------|
| Group | Mean | SD ± | p |
| Control | 14 | 0 | |
| *P2 + P0c | 9.57 | 1.27 | <0.05 |
| P2 + P0f | 8.71 | 3.98 | >0.05 |
| *P2 | 4.37 | 4.7 | |

Fig. 6. Secciones histológicas tenidas con Safranina-O del cartílago control y el tejido neoformado de los constructos implantados en el modelo in-vitro. A) Biopsia de cartílago articular sano proveniente de la rodilla de donador cadavérico (14, DE±0.0); se observa tinción intensa en toda la zona proliferativa del tejido. B y C) Calidad de cartílago moderada observada en el tejido formado por los condrocitos en co-cultivo; criopreservados (9.57, DE±1.27) y recién aislados (8.71, DE±3.98). D) Deficiente tinción y escasa matriz

extracelular se observa en el tejido de reparación formado por el constructo con condrocitos en Pase-2 (no co-cultivados) (4.37, DE \pm 4.71).

DISCUSIÓN

A pesar de las diferentes fuentes celulares consideradas para la reparación de las lesiones condrales, los condrocitos continúan siendo la fuente de células de elección. Muchos de los estudios disponibles en la actualidad reportan la utilización de los condrocitos autólogos como opción terapéutica en la reparación del cartílago (Implante de Condrocitos Autólogos, ACI por sus siglas en inglés) con resultados clínicos buenos a largo plazo. Sin embargo, el uso de condrocitos aislados de donador cadavérico, ya sea frescos o congelados no ha sido reportado. La aplicación de esta estrategia podría cubrir muchas de las limitaciones de las aproximaciones terapéuticas para la reparación de las lesiones condrales mediante ingeniería tisular como el limitado número de condrocitos y el proceso de desdiferenciación en la expansión celular.

En este estudio, se demuestra la factibilidad para obtener condrocitos cadavéricos viables a pesar del tiempo entre el fallecimiento del donador, la toma de la biopsia y el aislamiento celular. Estos hallazgos sugieren la posibilidad de eliminar la necesidad del doble procedimiento quirúrgico que implica el ACI y la toma de biopsia del mismo paciente, reduciendo morbilidad, costos y tiempo.

Con la explotación de las señales parácrinas de los condrocitos primarios (P0) sobre las células desdiferenciadas (P2), fue posible demostrar, mediante histología, la formación de tejido con características muy cercanas a las del cartílago hialino en las células co-cultivadas. En contraste, el tejido formado por las células no co-cultivadas mostró predominantemente matriz fibrosa a pesar de su implante en un medio tridimensional.

La mayoría de los parámetros histológicos de la Escala de O'Driscoll, demostraron que el mejor tejido de reparación se formó en los grupos co-cultivados. Aunque los co-cultivos de células criopreservadas mostraron una escala mayor ($9.57, \pm 1.27$) al co-cultivo de células recién aisladas ($8.71, \pm 3.98$), no hubo diferencia estadísticamente significativa entre grupos. La mejor respuesta en el co-cultivo de células criopreservadas (P2+P0c) sobre el co-cultivo de recién aislados (P2+P0r) puede estar relacionado al origen de los condrocitos primarios (P0), en éste último grupo proceden de un donador diferente al de los condrocitos en Pase-2; es decir se trata de un co-cultivo alogénico pudiendo haberse presentado una respuesta inmunológica que disminuya el metabolismo celular. Estudios sobre la inmunología del cartílago articular reportan tres componentes como posibles fuentes de material antigénico: los condrocitos, las fibras de colágeno y los proteoglicanos de la matriz extracelular. Esto sugiere que las células del cartílago pueden tener antígenos de superficie específicos que activan reacciones del sistema inmune bajo ciertas condiciones. Gertzbein y cols. expusieron condrocitos aislados de epifisis de ratas a cultivos de linfocitos de cartílago alogénico o del mismo animal, cuando los linfocitos alogénicos se mezclaron con los condrocitos epifisarios la respuesta inmunológica fue más alta. En nuestro estudio, una respuesta inmune similar pudo ocurrir durante en los sistemas de co-cultivo, reduciendo la capacidad proliferativa y de formación de matriz extracelular.

Para trasladar estos resultados a la clínica, otros estudios deben ser realizados en relación a la respuesta inmune y la transmisión de enfermedades transmitidas por los co-cultivos alogénicos.

Una de las principales técnicas utilizadas en la actualidad para la reparación de las lesiones condrales con resultados buenos a mediano plazo es la técnica de Implante de Condrocitos, sin embargo esta técnica presenta aún el reto de requerir dos procedimientos quirúrgicos ya

que se trata de una técnica en la que se utilizan condrocitos autólogos. La evidencia en este estudio de la adecuada viabilidad de los condrocitos cadavéricos abre la posibilidad de anular la cirugía de toma de biopsia requerida en el implante autólogo. Por otro lado, las técnicas de implante de condrocitos reportadas en la actualidad utilizan el método de expansión celular para incrementar el número de condrocitos hasta el valor requerido para reparar una lesión condral, utilizando así condrocitos que han sido subcultivados en numerosas ocasiones (generalmente durante 4 pases) y condicionando a que éstos adquieran un fenotipo fibroblástico, expresen proteínas de fibrocartílago y por lo tanto la durabilidad del tejido sea menor con una deficiencia en la función biomecánica. Este estudio propone la realización de co-cultivos como método para evitar el proceso de desdiferenciación y mantener así la producción de matriz extracelular característica del cartílago hialino incrementando la durabilidad y las propiedades biomecánicas del mismo. El traslado de los resultados obtenidos en este estudio a la clínica proporcionaría los beneficios de mejora en la calidad del tejido de reparación de las lesiones condrales e incremento en la durabilidad del tejido de reparación de mediano a largo plazo en los pacientes con lesiones de cartílago focalizadas en articulaciones de carga de pacientes jóvenes que aún no son candidatos a un reemplazo protésico.

CONCLUSIONES

Es posible aislar condrocitos viables de donador cadavérico en muestras de cartílago hialino procesadas dentro de las primeras 48 horas desde la toma de la biopsia. No existe diferencia estadísticamente significativa entre el número de condrocitos aislados de donador cadavérico y de donador vivo. La criopreservación de condrocitos primarios aislados de donador cadavérico no altera la capacidad para formar cartílago parecido al hialino. El co-cultivo de

condrocitos desdiferenciados y de condrocitos primarios mejora la calidad histológica del cartílago neo-formado comparado con los condrocitos no co-cultivados.

Agradecimientos: Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación (SECITI) 086/2013. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) SALUD-2011-1-162387, PDCPN-2013-01-215138. Banco de Tejidos Musculoesquelético y Piel Biograft de México. Banco de Sangre del Instituto Nacional de Rehabilitación: QFB. Mónica Saldana, Dra. Cecilia Nieto, Dr. Miguel Cervera. Departamento de Bioterio del Instituto Nacional de Rehabilitación: MVZ. Hugo Lecona y MVZ. Javier-Perez.

REFERENCIAS

1. Responde D, Lee J, Hu Jerry, Athanasiou K. Biomechanics-driven chondrogenesis: from embryo to adult. *The FASEB J* 2012; 26: 3614-3624.
2. Ahmed N, Gan L, Nagy A, Zheng J, Wang Ch. Cartilage Tissue Formation Using Redifferentiated Passaged Chondrocytes *In Vitro*. *Tissue Engineering* 2009; 15 (3): 665-674.
3. Redman SN, Oldfield SF, Archer CW. Current strategies for articular cartilage repair. *European Cells and Materials* 2005; 9: 23-32.
4. Nestic D, Whiteside R, Brittberg M, Wendt D, Martin I, Mainil-Varlet P. Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Advanced Drug Delivery Review* 2006; 58: 300-322.
5. Holtzer J, Abbott J, Lash J, Holtzer A. The loss of phenotypic traits by differentiated cells in vitro. Dedifferentiation of cartilage cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1960; 46: 1533-42.
6. Poole R, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M and Lavery S. Cartilage Biology. Composition and Structure of Articular Cartilage. A Template for Tissue Repair. *Clin Orthop and Rel Res* 2001; 391S: S26-S33.
7. Kuo CK, Li WJ, Mauck RL, Tuan RS. Cartilage Tissue Engineering: its potential and uses. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18: 1864-73.
8. Darling EM, Kyriacos A, Athanasiou. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J of Orthop Res* 2005; 23: 425-432.
9. Marie-Freyria A and Mallein-Gerin F. Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Int J. Care Injured* 2011; 1-7.

10. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF et al. Stem Cell Mobilization. *J of Am Society of Hematology* 2003; 419-437.
11. Albrecht C, Tichy B, Nürnberger S, Hosiner S, Zak L et al. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2011; 19: 1219-1227.
12. Darling EM, Athanasiou KA. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *J of Orthopedic Research* 2005; 23: 425-432.
13. Lin Z, Willers C, Xu J, Zheng MH. The Chondrocyte: Biology and Clinical Application. *Tissue Engineering* 2006; 12(7): 1972-86.
14. Freyria AM, Mallen-Gerin F. Chondrocytes in adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors. *Int J. Care Injured* 2011; 5(35): 1-7.
15. Nadzir MM, Kino-Oka M, Maruyama N, Sato Y, Kim M. Comprehension of terminal differentiation and dedifferentiation of chondrocytes during passage cultures. *J. Biosci Bioeng* 2011: 1-7.
16. Albrecht C, Tichy B, Nürnberger S, Hosiner S, Zak L et al. Gene expression and cell differentiation in matrix-associated chondrocyte transplantation grafts: a comparative study. *Osteoarthritis and Cartilage* 2011; 19: 1219-27.
17. Chen KS, Tatarczuch L, Ahmend Y, Huang HH, Mirams M et al. Identification of light and dark hypertrophic chondrocytes in mouse and rat chondrocyte pellet cultures. *Tissue and Cell* 2010; 42: 121-28.
18. Gavénis K, Schmidt-Rohlfing B, Mueller-Rath R, Andereya S et al. In vitro comparison of six different matrix systems for the cultivation of human chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Animal Jun* 2006; 42: 159-67.

19. Darling EM, Pritchett PE, Evans BA, Superfine R, Zauscher S et al. Mechanical properties and gene expression of chondrocyte on micropatterned substrates following dedifferentiation in monolayer. *Cell Mol Bioeng* 2009; 2(3): 395-404.
20. Farooq-Rai M, Rachakonda PS, Manning K, Palissa C, Sittinger M et al. Molecular and phenotypic modulations of primary and immortalized canine chondrocytes in different culture systems. *Research in Veterinary Science* 2009; 87: 399-407.
21. Dehne T, Schenk R, Perka C, Morawietz L, Axel Pruss et al. Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene* 2010; 462: 8-17.
22. Cournil Henrionnet Ch, Huselstein C, Wang Yun, Galois L, Mainard D et al. Phenotypic analysis of cell surface markers and gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes during monolayer expansion. *Biorheology* 2008; 45: 513-526.
23. Schrobback K, Jacob Klein T, Crawford R, Upton Z, Malda J et al. Effects of oxygen and culture system on in vitro propagation and redifferentiation of osteoarthritic human articular chondrocytes. *Cell Tissue Res* 2011; 11: 1193-7.
24. Zhang F, Yao Y, Su K, Pang PX, Zhou R et al. Redifferentiation of dedifferentiated chondrocytes by adenoviral vector-mediated TGF- β 3 and collagen-1 silencing shRNA in 3D culture. *Annals of Biomedical Engineering* 2011: 1-13.
25. Safran MR, Seiber K. The Evidence for Surgical Repair of Articular Cartilage in the Knee. *JAAOS* 2010; 18(5): 259-266.

26. Hangody L, Vasarhelyi G, Hangody LR, Sükösd Z, Tibay G, Bartha L, Bodó G. Autologous osteochondral grafting-technique and long-term results. *Injury Int Care Injured* 2008; 39(S1): 32-39.
27. Ibarra C, Garciadiego D, Martínez V, Velasquillo C. Ingeniería de Tejidos y Osteoartritis. *Reumatol Clin* 2007; 3(3): 19-22.
28. Marsi-Daba M, Ibarra-Ponce de León JC, Lombardero Goldaracena G, Paasch-Martínez L. Current concepts of equine chondral repair. *Vet Mex* 2006; 37(3): 369-378.
29. Brittberg M. Cell Carriers as the Next Generation of Cell Therapy for Cartilage Repair: A Review of the Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation Procedure. *Am J Sports Med* 2009; 38: 1259-1271.
30. Giovannini S, Diaz-Romero J, Aigner T, Heini P, Mainil-Varlet P, Nestic D. Micromass Co-culture of human articular chondrocytes and human bone marrow mesenchymal stem cells to investigate stable neocartilage tissue formation in vitro. *European Cells and Materials* 2010; 20: 245-259.
31. Darling EM, Pritchett PE, Evans BA, Superfine R, Zauscher S, Guilak F. Mechanical properties and gene expression of chondrocytes on micropatterned substrates following dedifferentiation in monolayer. *Cell Mol Bioeng* 2009; 2(3): 395-404.
32. Haudenschild DR, McPherson JM, Tubo R, Binette F. Differential Expression of Multiple Genes During Articular Chondrocyte Redifferentiation. *The Anatomical Record* 2001; 263: 91-98.
33. Bian L, Zhai DY, Mauck RL, Burdick JA. Coculture of Human Mesenchymal Stem Cells and Articular Chondrocytes Reduces Hypertrophy and Enhances Functional Properties of Engineered Cartilage. *Tissue Eng* 2011; 17(7): 1137-1145.

34. Engelhardt M, Bertz H, Afting M, Waller CF, Finke J. High-Versus Standard-Dose Filgrastim (rhG-CSF) for Mobilization of Peripheral-Blood Progenitor Cells From Allogeneic Donors and CD34+ Immunoselection. *Am Society Clin Oncol* 1999; 17(7): 2160-2172.

ANEXO

Se anexa como artículo parte de los resultados de la totalidad del proyecto, correspondiente a la técnica de aislamiento de condrocitos, determinación de viabilidad y estandarización de la formación de un constructo tridimensional.



Original Article With Video Illustration

Follow-up of a New Arthroscopic Technique for Implantation of Matrix-Encapsulated Autologous Chondrocytes in the Knee

Clemente Ibarra, M.D., Aldo Izaguirre, M.D., M.Sc., Enrique Villalobos, M.D., M.Sc., Maria Masri, D.V.M., Ph.D., Germán Lombardero, D.V.M., Ph.D., Valentin Martinez, B.S., Cristina Velasquillo, Ph.D., Anell Olivos Meza, M.D., Victor Guevara, M.D., and Luis G. Ibarra, M.D.

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the clinical and sequential imaging follow-up results at a mean of 36 months after an arthroscopic technique for implantation of matrix-encapsulated autologous chondrocytes for the treatment of articular cartilage lesions on the femoral condyles. **Methods:** Ten patients underwent arthroscopic implantation of autologous chondrocytes seeded onto a bioabsorbable scaffold. The patients were evaluated clinically using a visual analog scale (VAS) for pain and International Knee Documentation Committee (IKDC), Lysholm, and Tegner scores. Magnetic resonance imaging (MRI) T2-mapping and magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) evaluations were also performed. Second-look arthroscopic evaluation using the International Cartilage Repair Society (ICRS) grading classification was performed at 12 months. **Results:** Compared with their preoperative values, at 36 months mean values \pm standard deviation for the VAS scale for pain were 6.0 ± 1.5 to 0.3 ± 0.4 . Improvement in clinical scores between preoperative values and 36-month follow-up values in subjective IKDC scores was 46.9 ± 18.5 to 77.2 ± 12.8 ; in Lysholm scores, it was 51.8 ± 25.1 to 87.9 ± 6.5 , and in the Tegner activity scale it was 2.9 ± 1.7 to 5.9 ± 1.9 . Mean T2 mapping and MOCART scores improved over time to 38.1 ± 4.4 ms and 72.5 ± 10 , respectively. Mean ICRS score by second-look arthroscopy at 1 year was 10.4 ± 0.1 . **Conclusions:** All clinical scores improved over time compared with the preoperative values. Clinical results are comparable with MRI T2 mapping and ICRS evaluations, suggesting that this arthroscopic technique for cell-based cartilage repair is efficacious and reproducible at a mean of 36 months of follow-up. **Level of Evidence:** Level IV, therapeutic case series.

Articular cartilage lesions are present in more than 60% of knee arthroscopic procedures, and they have been shown to affect the quality of life.^{1,2} Regenerative techniques for cartilage repair based on cultured autologous chondrocytes offer hyaline-like cartilage repair, in comparison with reparative procedures that lead to fibrous tissue of inferior quality and

less durability.³⁻⁵ These cell-based approaches may also produce less morbidity at the donor site compared with osteochondral autografts, which are frequently used for bigger lesions.⁶

In the original technique described for autologous chondrocyte implantation (ACI), a flap of periosteum was sutured over the cartilage lesion, and chondrocytes in suspension were injected under the periosteal flap through an open approach. To minimize complications associated with open ACI, research has been focused on better options to deliver and ensure the permanence of chondrocytes at the repair site.⁷⁻⁹ Matrix-seeded autologous chondrocyte implantation (MACI) and similar techniques address some of the potential limiting factors of ACI. By using an absorbable scaffold to allow cells to adhere and produce extracellular matrix, permanence of cells at the repair site could be obtained and complications related to the periosteal patch could be reduced.^{10,11}

Several methods of cell-scaffold fixation have been reported. Erggelet et al.¹² used transosseous sutures. Herbert et al.¹³ tested a biodegradable polylactide pin

From Orthopedic Sports Medicine and Arthroscopy Division and Tissue Engineering, Cell Therapy, and Regenerative Medicine Unit (C.I.), Orthopedic Sports Medicine and Arthroscopy Division (A.I., E.V., A.O.M., V.G.), Tissue Engineering, Cell Therapy, and Regenerative Medicine Unit (V.M., C.V.), (L.G.I.), National Institute of Rehabilitation; National Polytechnic Institute (C.I.); Mexico School of Veterinary Medicine (M.M., G.L.), National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico.

Supported by a grant received from the National Council of Science and Technology from Mexico (CONACyT 115542). The authors report that they have no conflicts of interest in the authorship and publication of this article.

Received May 6, 2013; accepted February 25, 2014.

Address correspondence to Clemente Ibarra, M.D., Av-Mexico Xochimilco 289, Mexico City, Mexico 14289. E-mail: clementebarra@yahoo.com

© 2014 by the Arthroscopy Association of North America

0749-8063/13296/\$36.00

<http://dx.doi.org/10.1016/j.arthro.2014.02.032>

that requires precise perpendicular insertion on the subchondral bone. Others have used fixation using fibrin glue or self-adherence of the cell scaffold to the subchondral bone.¹²⁻¹⁷

The advent of new procedures for articular cartilage repair has increased the need for accurate noninvasive methods for objective evaluation of the repair. Magnetic resonance imaging (MRI) is currently being used for structural evaluation of cartilage repair.¹⁸ Normal articular hyaline cartilage shows a predictable spatial variation in T2 relaxation time with depth at MRI, with an increase in T2 values from the subchondral bone to the articular surface. This normally correlates with the microscopic collagen organization and orientation seen in normal articular cartilage. Increased T2 values are most commonly associated with cartilage damage.¹⁸ MRI T2 mapping values of the repair tissue compared with the surrounding normal cartilage can be used to determine the integrity and quality of the treatment. The MOCART scoring system is a qualitative measuring tool widely used for cartilage repair. This method evaluates the degree of defect filling, integration, quality, structure, signal, subchondral lamina, and subchondral bone as well as the presence of complications after cartilage repair.¹⁹

The purpose of this study is to evaluate the clinical and sequential imaging follow-up results at a mean of 36 months after an arthroscopic technique for implantation of matrix-encapsulated autologous chondrocytes to treat articular cartilage lesions in the knee.

We hypothesized that arthroscopic implantation of matrix-encapsulated autologous chondrocytes can result in significant improvement in clinical and MRI evaluation by T2 mapping and MOCART and close-to-normal cartilage formation seen at second-look arthroscopy after treatment of articular cartilage lesions on the femoral condyles, maintaining a stable improvement over time.

Methods

After institutional review board evaluation and approval of this pilot study, patients with a symptomatic full-thickness cartilage lesion on either femoral condyle, patients scheduled for arthroscopic anterior cruciate ligament (ACL) reconstruction or treatment of a meniscal lesion who were between 18 and 50 years of age were considered to be candidates for the study. Exclusion criteria included any type of arthritis, previous total meniscectomy, previous treatment of the chondral lesions, treatment for competitive athletes, and failure to adhere to a strict rehabilitation protocol. The patients signed an informed consent before surgery and were included when a full-thickness cartilage lesion was identified during arthroscopy. Patients underwent an index surgical procedure during which ACL or meniscal lesions were treated and osteochondral biopsy samples were obtained for chondrocyte

isolation. A conventional rehabilitation program for the index procedure was conducted. During this time, cells were isolated and expanded in culture in a laboratory at the National Institute of Rehabilitation. A second surgical procedure was performed between 6 and 8 weeks after the first operation.

By this time, patients had no pain, had mild swelling, and had recovered full extension and more than 110° of knee flexion. Arthroscopic cell-polymer scaffold implantation was performed followed by a strict rehabilitation protocol. Clinical evaluation was performed preoperatively at 3, 6, 12, 18, 24, and 36 months, as was MRI evaluation using T2 mapping and MOCART scores. Second-look arthroscopy was performed at 12 months for ICRS classification. No biopsy specimens were obtained at this time.

Surgical Technique

Index Procedure and Cartilage Biopsy

Patients included in the study were those with preoperative full-thickness articular cartilage lesions diagnosed by MRI or patients with ACL or meniscal injuries in whom full-thickness articular cartilage lesions were identified during the index procedure and who had previously signed an informed consent. In either case, during the first surgical procedure, the full-thickness articular cartilage lesion was assessed and measured with an arthroscopic probe. Three 4 × 10 mm osteochondral cylinder biopsy specimens were obtained from a non-weight-bearing area adjacent to the intercondylar notch using an osteochondral graft harvester (COR; DePuy Mitek, Raynham, MA). The osteochondral cylinders were placed in a sterile container with transport media containing antibiotics/antimycotic agents and sent out for chondrocyte isolation, in vitro expansion, and cell-polymer scaffold formation as described previously.⁹

Chondrocyte Isolation, in Vitro Expansion, and Cell-Scaffold Construct Preparation. The 3 4-mm-diameter osteochondral cylinders obtained during the index or first surgical procedure were transported to a good manufacturing practice laboratory facility located in the surgical area of the National Institute of Rehabilitation. There, under sterile conditions in a laminar flow hood, cartilage was separated from bone by sharp dissection. Cartilage fragments were then digested in class I collagenase, cells were counted, and viability was assessed. Chondrocytes were then seeded onto a T-75 culture flask at a minimum density of 300,000 cells per 100 mg with culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12 GIBCO, Grand Island, NY) and 1% antibiotic-antimycotic agents and supplemented with 10% autologous patient serum. A sample of the cell suspension was sent to a laboratory in a different institution for microbiological evaluation (bacteria,

fungi, and *Mycoplasma*) for quality control. Cells were expanded in culture until 90% to 100% confluence was present. Cells were then trypsinized, evaluated, and reseeded for cell expansion until passage 2. At the beginning of the second passage, culture flasks were supplemented with ascorbic acid. Samples of culture media were intermittently obtained for microbiological analysis. Once the culture flask was 90% to 100% confluent, chondrocyte pellets were seeded onto 8-mm-diameter collagen-based bioabsorbable scaffold disks and then encapsulated in extracellular matrix, as described by Masri et al.⁹ and cultured in vitro for 1 additional week to allow cell adherence to the collagen scaffold (Restore Orthobiologic Soft Tissue Implant; DePuy Orthopaedics, Warsaw, IN) and extracellular matrix production.

Arthroscopic Implantation of Matrix-Encapsulated Autologous Chondrocytes. Eight-millimeter-diameter and 2- to 4-mm-thick cell-scaffold disk constructs were received in a sterile container with culture medium. The number of disks available depended on the lesion size. One additional disk was always received and available for implantation. For an 8- to 10-mm lesion, 1 disk was used; if the lesion is 2 cm², 2 discs can be used. For this pilot study, just patients with 1 cm² single chondral lesions were included. With the patient supine on the operating table and under regional anesthesia, the knee was prepared and draped in a conventional manner. A tourniquet was placed around the proximal thigh, although normally it was not insufflated. A conventional longitudinal anterolateral portal was established for arthroscopic examination of the joint using a superolateral portal for irrigation. Under direct vision, an oblique anteromedial portal was established over the lesion (if medial) to have perpendicular access. This allowed for medial-lateral or proximal-distal extension of the portal if needed. If the lesion was on the lateral femoral condyle, the anterolateral portal could be extended proximally or distally to allow perpendicular access, or a new portal could be established. In neither case did the portals exceed 10 mm. The articular cartilage injury was then identified, measured, and prepared for treatment, using straight and angled curettes to remove damaged unstable cartilage edges and the calcified layer of cartilage on the bottom, trying to cause the least possible damage to the subchondral bone.

Construct Implantation and Fixation for Femoral Condyle Lesions. The lesion was measured with an arthroscopic probe. An 8-mm-diameter tamper and a sharp osteochondral harvester were used to shape the lesion in a circular fashion. To determine the center of the lesion, a superficial mark was made with the drill bit at the site visually considered the center. A 5-mm arthroscopic probe was then used to measure the distance from the edge of the lesion to the created

mark in 4 quadrants, and the best site was determined. A 2-mm hole was drilled at the determined center, and a 2.3-mm bioabsorbable suture anchor (MINILOK, Depuy Mitek, Raynham, MA) with No. 2-0 PDS suture (Ethicon, Somerville, NJ) was inserted through the anteromedial or anterolateral portal (Fig 1A). Stability was tested by pulling on the sutures (Fig 1B). At the same time, the cell-scaffold disk was prepared on the side table. An 8-mm transparent cannula was then inserted through the portal directly over the lesion, and the sutures from the anchor were pulled outside the joint through an arthroscopic cannula. The anchor sutures were passed through the construct before entering the cannula. A self-locking arthroscopic sliding knot was tied, the water flow pump was eliminated, and the construct was inserted through the cannula into the joint by simply pulling on the post under direct vision (Fig 1C). Once the construct was sitting in place at the bottom of the lesion, the knot was tightened by pulling on the wrapping limb of the suture, and 2 additional half-hitch knots were tied with the assistance of a knot pusher (Fig 1D). The sutures were then cut flush to the knot and the cannula was retrieved. Stability of the implant was then tested with the probe, and the knee was taken through a range of motion to verify the stability and permanence of the implant at the repair site (Video 1, available at www.arthroscopyjournal.org).

Rehabilitation Protocol

After implantation, patients were included in a very strict rehabilitation protocol that started the same day of the procedure with cryotherapy, continuous passive motion from the first day after surgery up to 8 weeks (6 to 8 hours/d), no weight bearing for 8 weeks, and progressive open-chain strengthening after a first isokinetic evaluation at 3 months after surgery. Continuous passive motion was started from 0° to 60° of flexion the same day of surgery in patients with femoral condyle lesions, adding 10° per day until 90° of flexion was obtained in the first week. Ten degrees of flexion were added at each subsequent week. Patients were allowed to return to sports activities after 12 months and when isokinetic evaluation reported 90% of strength of the contralateral extensor and flexor muscles of the knee.

Clinical Evaluation

For efficacy, clinical evaluation was performed by the 2 treating surgeons and recorded by a clinical sports medicine fellow at 3, 6, 9, 12, 18, 24, and 36 months using a visual analog scale (VAS) for pain, subjective and objective International Knee Documentation Committee (IKDC) forms, Lysholm knee score, and Tegner activity scale. For safety, adverse events were recorded, and they were graded as mild when they did

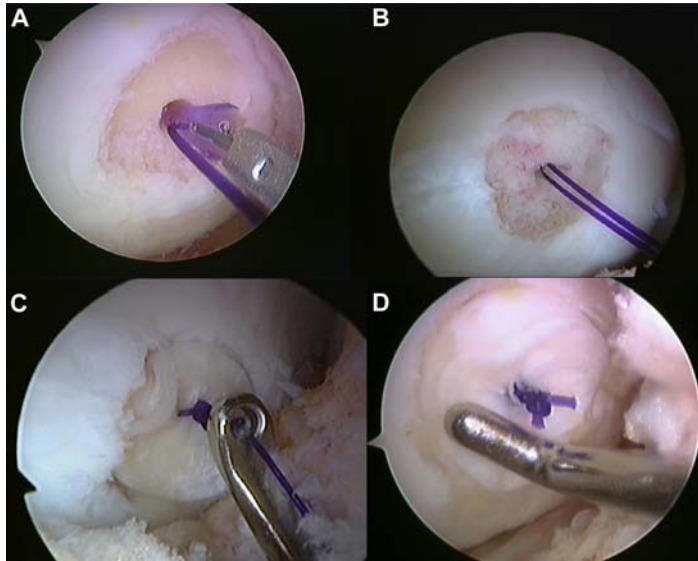


Fig 1. Procedure of arthroscopic chondrocyte implantation for femoral condyle lesions. (A) After debridement, a 2-mm hole is drilled in the center of the lesion and a 2.3-mm bioabsorbable suture anchor with No. 0 PDS suture (Ethicon, Somerville, NJ) is inserted. (B) Stability of the anchor is tested by pulling on the sutures. (C) The sutures are pulled outside the joint and passed through the construct. A self-locking arthroscopic sliding knot is tied, the water flow pump is eliminated, and the construct is inserted through the cannula into the joint by simply pulling on the post under direct vision. Once the construct is sitting at the bottom of the lesion, 2 additional half-hitch knots are tied with the assistance of a knot pusher. (D) The remainder of the suture is cut and the construct is tested for stability.

not require a surgical procedure (inflammation, effusion, mild pain) or severe if they required hospitalization or a surgical procedure to improve. Any severe adverse event was considered failure of treatment.

Imaging Evaluation

MRI evaluation was performed preoperatively and before cell-construct implantation using T2-mapping and MOCART scores and at 3, 6, 12, 18, 24, and 36 months postoperatively. MRI was performed on a 1.5 Tesla clinical imaging system (GE Healthcare, Milwaukee WI), using an 8-channel HD knee array (GE Healthcare). Standard morphologic MRI evaluation was performed using a fast spin echo sequence in the axial, sagittal, and coronal planes. Images were acquired with repetition time of 1800 to 1450 ms, echo time of 30 to 40 ms, echo train length of 6, and spatial resolution of $256 \mu\text{m}$ (frequency) \times $256 \mu\text{m}$ (phase) \times 3 mm at 2 excitations.

The qualitative evaluation of cartilage repair was performed by 2 independent radiologists using the magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) scoring system.¹ The score consists of 9 variables: (1) degree of defect repair, (2) integration of border zone, (3) surface of the repair tissue, (4) structure of the repair tissue, (5) signal intensity of the repair tissue, (6) subchondral bone, (7) subchondral lamina, (8) adhesions, and (9) effusion.

T2 mapping (FuncTool 4.5.1, GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) was performed to assess the biochemical integrity of native and repaired

cartilage. The color map is coded to capture T2 values ranging from 25 to 95 ms. Quantitative T2 mapping was performed using a multislice multiecho pulse sequence. Eight echoes were sampled: sequential multiples of the first echo time (10 to 11 ms) at a repetition time of 800 ms and in-plane resolution of $384 \mu\text{m}$ (frequency) \times $256 \mu\text{m}$ (phase) \times 3mm at 2 excitations. Data sets were analyzed (FuncTool 4.5.1; GE Healthcare). T2 values were calculated taking a region of interest (ROI) (2 to 6 mm) within a fixed area in the center of the repair (named ROI6) and normal cartilage (named ROI3).²⁰

Arthroscopic Evaluation

Second-look arthroscopy was performed in all patients at 12 months, and 3 experienced arthroscopic surgeons performed evaluation using the ICRS classification system by independently watching the surgical video. No biopsy samples were obtained from the repair site for ethical reasons.

Statistical Analysis

Dimensional data were expressed as means and standard deviation or range, or both. Qualitative data were presented in absolute numbers or percentages, or both. The Wilcoxon signed-rank test for paired samples was used to compare before and after preoperative clinical and MRI values to 36 month follow-up and comparisons against MRI controls of healthy cartilage. $P < .05$ was considered significant. For agreement evaluation of independent observers in ICRS cartilage repair assessment, we used the intraclass correlation coefficient.

Results

Demographics

Ten patients with full-thickness articular cartilage lesions on the femoral condyles who had completed at least 2 years of follow-up were included in this study. Mean age was 35.05 years (23 to 48 years). Eight patients were men (80%) and 2 were women (20%); the mean defect size was 1.0 cm² (\pm 0.0). Eight patients had lesions on the medial femoral condyle (80%) and 2 had lesions on the lateral femoral condyle (20%). Body mass index was calculated, with a mean of 25 (\pm 3.9).

Clinical Assessment

All patients improved significantly over time on all clinical scales compared with their preoperative scores. A statistically significant improvement was observed in the VAS for pain from preoperative evaluation to the latest follow-up. The Lysholm knee score improved consistently as did the IKDC subjective score and the Tegner activity scale (Table 1).

Imaging Evaluation

MRI T2-mapping values improved over time from the first evaluation to the last follow-up (Table 2; Figs 2 and 3). Moreover, when comparing control values to tissue repair at the 36-month follow-up, the T2 values were not significant ($P = .23$). MOCART score images of the repaired area showed improvement over time, with mean values of 40.0 \pm 16.2 at 3 months, 68.89 \pm 14 at 12 months, and 68.5 \pm 11 and 72.5 \pm 10 after 36 months (Table 2; Fig 4). The intraclass correlation coefficient for T2 mapping was 0.67 and for MOCART it was 0.63.

Second-Look Arthroscopic Assessment

Second-look arthroscopy was performed at 12 months. The repaired lesion assessed with the ICRS classification was "nearly normal," with a mean of 10.38 \pm 0.79. The intraclass correlation coefficient for these measurements was 0.702 (Fig 5). No complications or severe adverse events were related to the second-look arthroscopic procedure.

Safety

No implant-specific severe adverse events were recorded for any of the 10 patients. Typical postoperative swelling and effusion resolved uneventfully after a period of 4 to 6 weeks. No postoperative fever,

signs of infection or repeated interventions occurred. We found no hypertrophy of the grafts. There were no deaths.

Discussion

All patients in this study improved significantly on all clinical grading scales progressively over time, reaching a stable improvement after 12 months, and maintaining that improvement for a mean of 36 months and in 1 patient up to 48 months. The repair tissue that filled the cartilage lesions with this new arthroscopic technique for ACI also improved over time as assessed by MRI T2 mapping and the MOCART score. This improvement reached a significant level at 12 months, consistent with the findings of the second-look arthroscopy performed at the same time, which found "close to normal" tissue. However, subsequent MRI evaluations showed further improvement in the imaging quality of the repair tissue, approaching the characteristics of the surrounding normal cartilage. These findings support our initial hypothesis.

In this prospective study, we found steady improvement in the subjective perception of pain and function in the knee as observed with Lysholm and IKDC scales at a mean of 36 months. Participation in sports improved in our patients but did not reach preinjury state. Several conditions may cause this finding. First, our rehabilitation protocol in these patients did not allow for contact sports in the first year after implantation, and we did not include competitive athletes in this cohort.

ACI has shown short, midterm, and long-term clinical efficacy as an open procedure.^{21,22} Although there is a relative paucity of published literature in arthroscopic delivery of chondrocytes, there is increasing interest in this process. Filardo et al.^{4,5,16} used an arthroscopic technique to deliver autologous chondrocytes in patients with chondral lesions of the knee using a self-adherent scaffold to subchondral bone as the fixation method. Good clinical results were found in 89% of the patients. Ebert et al.⁸ showed efficacy and safety with an arthroscopic matrix-induced ACI technique using fibrin glue implant fixation to the subchondral bone. They showed improvement in clinical and MRI findings at the 24-month follow-up in 20 patients, with 1 failure seen by MRI.

Table 1. Clinical Results

| Scale | Preoperative Values | 12-Month Follow-Up | 24-Month Follow-Up | 36-Month Follow-Up | <i>P</i> Value |
|-----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| VAS | 6 \pm 1.5* | 0.7 \pm 0.9 | 0.3 \pm 0.5 | 0.3 \pm 0.4* | .005* |
| Lysholm | 51.8 \pm 25.1* | 80.7 \pm 11.9 | 92 \pm 9.3 | 87.9 \pm 6.5* | .005* |
| Subjective IKDC score | 46.9 \pm 18.5* | 66.3 \pm 14 | 76.5 \pm 13.3 | 77.2 \pm 12.8* | .01* |
| Tegner activity scale | 2.9 \pm 1.7* | 3.8 \pm 1.8 | 5.8 \pm 2.1 | 5.9 \pm 1.9* | .007* |

IKDC, International Knee Documentation Committee; VAS, visual analog scale (pain).

*All comparisons were conducted with the Wilcoxon signed-rank test contrasting preoperative values to 36-month follow-up.

Table 2. Magnetic Resonance Imaging Results

| MRI Evaluation | 3-Month Follow-Up | 12-Month Follow-Up | 24-Month Follow-Up | 36-Month Follow-Up | P Value |
|-----------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-------------------|
| T2 values repair ROI | 53.7 ± 10.7* | 39.5 ± 3.5 | 40.4 ± 6.2 | 38.1 ± 4.4* [†] | 0.01* |
| T2 values control ROI | 36.03 ± 5.1 | 35.9 ± 3.1 | 35.0 ± 3.3 | 36.6 ± 5.2 [†] | 0.23 [†] |
| MOCART score | 40.0 ± 16.2* | 68.8 ± 14 | 68.5 ± 11 | 72.5 ± 10* | 0.01* |

MOCART, Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue; ROI, region of interest.

*Wilcoxon signed-rank test was conducted in before and after comparisons in repair tissue ROI and MOCART score from 3-month follow-up to 36-month follow-up.

[†]Wilcoxon signed-rank test was used to compare repair ROI to control ROI.

Although some authors use the intrinsic adherence of the scaffolds or fibrin glue to paste the scaffolds to subchondral bone, others rely on other types of fixation.^{7,8,12,13,15} Herbert et al.¹³ described bioabsorbable pins as a fixation method for cell-less scaffolds used for cartilage repair. In an in vitro model, they found that the biomechanical strength of pin fixation was superior to suturing to the adjacent cartilage and that the angle of pin insertion was critical to avoid damage to the tibial surface. We believe that the use of absorbable mini-anchors in the subchondral bone of the femoral condyles provides sufficient pullout strength to the construct and avoids the risk of damage to the tibial surface. The soft consistency of our 10 mm scaffold allows it to adapt to the curvature of the condyle against the subchondral bone at the bottom of the defect with a single point of fixation. Arthroscopic implantation of matrix-encapsulated autologous chondrocytes under direct vision with fluid flow using an arthroscopic pump

has been shown in an animal model.⁹ Although perforation of the subchondral bone can be of concern, the number of blood cells coming from bone marrow through 1 drill hole may be insignificant in contrast to the number of cells in our construct (5×10^6 cells). Moreover, blood from the subchondral bone can be occluded by 1 of the collagen disks that is used as a cell-less scaffold deep to our cell-seeded construct, thus not affecting the quality of each construct.

Our study showed that the repair tissue after arthroscopic delivery of matrix-encapsulated chondrocytes resembles normal cartilage based on T2 mapping MRI. This finding is consistent with other studies. Various authors have described repair tissue maturation after cartilage lesion treatment. After about 12 to 18 months, the signal intensity of the repaired tissue contains less fluid and looks more like native hyaline cartilage, especially after chondrocyte implantation treatment.^{20,21} In a long-term study of patients treated with

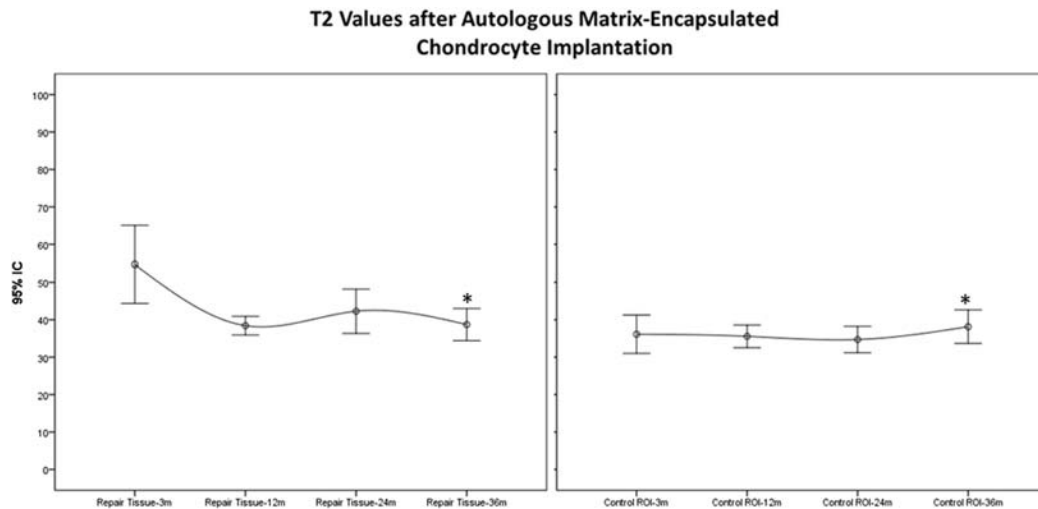
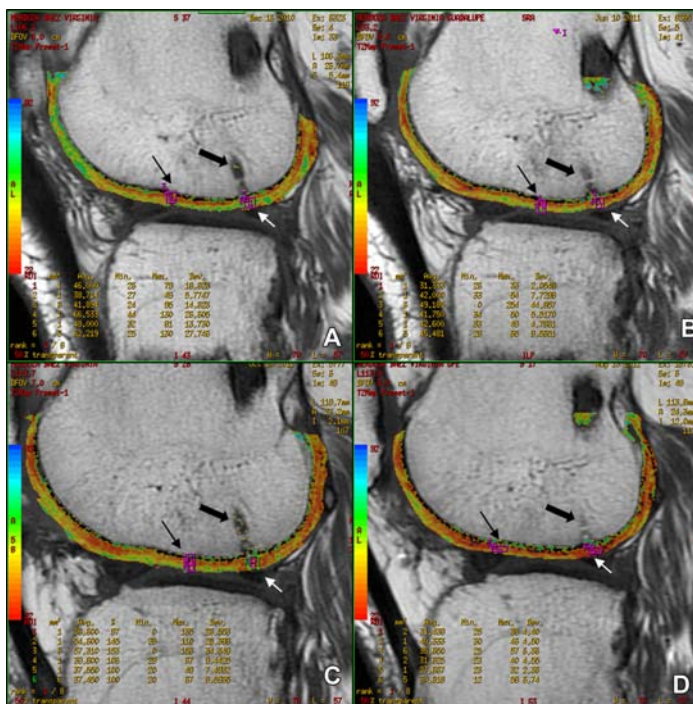


Fig 2. Magnetic resonance imaging (MRI) T2 mapping values of the repaired tissue improved over time. At 3-month follow-up, mean T2 values were 53 ms, reaching 38 ms at 36-month follow-up. Normal control values have a mean of 36.6 ms. *When we compared the repair tissue region of interest (ROI) at 36 months versus control ROI, no statistical difference was detected ($P = .23$).

Fig 3. T2 mapping of the lateral femoral condyle in a patient after arthroscopic matrix-encapsulated chondrocyte implantation over time; the region of interest 6 (ROI6) represents the total width of the repair tissue, which shows progressive decline of its T2 values. (A) One-month after implantation; (B) 6 months after implantation; (C) 12 months after implantation; (D) 24 months after implantation. The white arrow is the region of interest (ROI) of the repair tissue; the thick black arrow shows the minianchor firmly fixed to the subchondral bone; and the thin black arrow shows the ROI of the control tissue. The color map on the left of each image indicates the range of T2 values. Green to blue values represent higher T2 values; in contrast, yellow to red values represent lower T2 values. The mean values of normal cartilage range from 30 to 40 ms.



MOCART Values after Arthroscopic Autologous Matrix-Encapsulated Chondrocytes

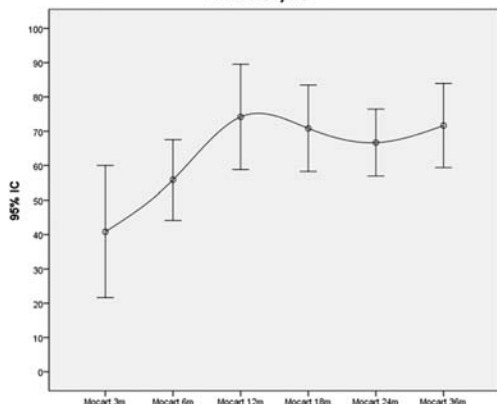


Fig 4. Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) values also showed an improvement of the repaired area over time, with mean values of 40.8 at 3 months, reaching values greater than 70 at 12 months of follow-up. (IC, confidence interval.)

ACI using delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage as the primary outcome, Vasiliadis et al.²³ found that repair tissue was not different from normal cartilage.

From a morphologic point of view, our study shows that maturation of the tissue takes 12 months and after that it remains stable at values greater than 70 MOCART points. Others have found similar findings using scaffolds for chondrocyte implantation. Trattnig et al.²⁴ and Welsch et al.²⁵ found that after 52 weeks, MOCART values ranged around 70 to 73 points. Ebert et al.⁸ reported an excellent graft infill score in 90% of their patients after 24 months. Filardo et al.¹⁶ found that after 7 years of implantation there were perfect morphologic results in filling of the defect in 57% of patients, integration in 62% of patients, surface in 50% of patients, structure in 43% of patients, intensity in 43% of patients, subchondral lamina in 45% of patients, subchondral bone in 38% of patients, absence of adhesions in 95% of patients, and absence of effusion in 86% of patients. These findings should be viewed with caution, as stated in a recent systematic review; although improved MRI scores and sequences are being used more often, the correlation with subjective knee scores needs to be improved.¹⁸

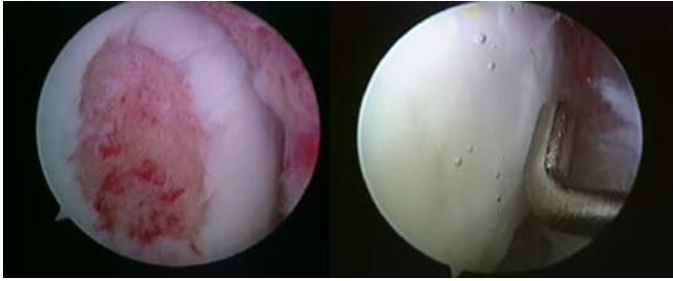


Fig 5. Second-look arthroscopic evaluation was performed in all patients 12 months after the arthroscopic autologous matrix-encapsulated chondrocyte procedure. Repaired tissue was evaluated with the International Cartilage Repair Society (ICRS) grading classification, with values close to normal (mean, 10.38).

Limitations

The small number of patients, lack of randomization, small size of the lesions, length of follow-up reported, and lack of biopsy samples for histologic examination as an outcome measure are limitations in this study.

Conclusions

All patients improved in all clinical scores over time compared with their preoperative values. Clinical results are comparable with MRI T2-mapping and ICRS evaluations, suggesting that this arthroscopic technique for cell-based cartilage repair is efficacious and reproducible at a mean of 36 months' follow-up.

References

- Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: Study of 25,124 knee arthroscopies. *Knee* 2007;14:177-182.
- Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: A review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997;13:456-460.
- Zellner J, Mueller M, Krutsch W, et al. Arthroscopic three-dimensional autologous chondrocyte transplantation with navigation-guided cartilage defect size assessment. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012;132:855-860.
- Filardo G, Kon E, Berruto M, et al. Arthroscopic second generation autologous chondrocytes implantation associated with bone grafting for the treatment of knee osteochondritis dissecans: Results at 6 years. *Knee* 2012;19:658-663.
- Filardo G, Kon E, Di Martino A, et al. Second-generation arthroscopic autologous chondrocyte implantation for the treatment of degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2012;20:1704-1713.
- Hjelle K, Solheim E, Strand T, Muri R, Brittberg M. Articular cartilage defects in 1,000 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 2002;18:730-734.
- Vascellari A, Rebuzzi E, Schiavetti S, Coletti N. Implantation of matrix-induced autologous chondrocyte (MACI) grafts using carbon dioxide insufflation arthroscopy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2013.
- Ebert JR, Fallon M, Ackland TR, Wood DJ, Janes GC. Arthroscopic matrix-induced autologous chondrocyte implantation: 2-year outcomes. *Arthroscopy* 2012;28:952-964.e1-2.
- Masri M, Lombardero G, Velasquillo C, et al. Matrix-encapsulation cell-seeding technique to prevent cell detachment during arthroscopic implantation of matrix-induced autologous chondrocytes. *Arthroscopy* 2007;23:877-883.
- Gomoll AH, Probst C, Farr J, Cole BJ, Minas T. Use of a type I/III bilayer collagen membrane decreases reoperation rates for symptomatic hypertrophy after autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med* 2009;37(suppl 1):20S-23S.
- Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. ACI and MACI. *J Knee Surg* 2012;25:17-22.
- Erggelet C, Sittinger M, Lahm A. The arthroscopic implantation of autologous chondrocytes for the treatment of full thickness cartilage defects of the knee joint. *Arthroscopy* 2003;19:108-110.
- Herbert M, Zelle S, Rosenbaum D, et al. Arthroscopic fixation of matrix-associated autologous chondrocyte implantation: Importance of fixation pin angle on joint compression forces. *Arthroscopy* 2011;27:809-816.
- Brittberg M. Cell carriers as the next generation of cell therapy for cartilage repair: A review of matrix-induced autologous chondrocyte implantation procedure. *Am J Sports Med* 2010;38:1259-1271.
- Bekkers JE, Tsuchida AI, Malda J, et al. Quality of scaffold fixation in a human cadaver knee model. *Osteoarthritis Cartilage* 2010;18:266-272.
- Filardo G, Kon E, Di Martino A, Iacono F, Marcacci M. Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation: A prospective 7-year follow-up study. *Am J Sports Med* 2011;39:2153-2160.
- Cortese F, McNicholas M, Gillogly S, Abelow S, Gigante A, Coletti N. Arthroscopic delivery of matrix-induced autologous chondrocyte implant: International experience and technique recommendations. *Cartilage* 2012;3:156-164.
- de Windt TS, Welsch GH, Brittberg M, et al. Is magnetic resonance imaging reliable in predicting clinical outcome after articular cartilage repair of the knee? A systematic review and meta-analysis. *Am J Sports Med* 2013;41:1695-1702.
- Marlovits S, Singer P, Zeller P, Mandl I, Haller J, Trattnig S. Magnetic resonance observation of cartilage repair tissue (MOCART) for the evaluation of autologous

- chondrocyte transplantation: Determination of interobserver variability and correlation to clinical outcome after 2 years. *Eur J Radiol* 2006;57:16-23.
20. Theologis AA, Schairer WW, Carballido-Gamio J, Majumdar S, Li X, Ma CB. Longitudinal analysis of T1p and T2 quantitative MRI of knee cartilage laminar organization following microfracture surgery. *Knee* 2012;19:652-657.
 21. Welsch GH, Mamisch TC, Marlovits S, et al. Quantitative T2 mapping during follow-up after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation (MACT): Full-thickness and zonal evaluation to visualize the maturation of cartilage repair tissue. *J Orthop Res* 2009;27:957-963.
 22. Peterson L, Vasiliadis HS, Brittberg M, Lindahl A. Autologous chondrocyte implantation: A long-term follow-up. *Am J Sports Med* 2010;38:1117-1124.
 23. Vasiliadis HS, Danielson B, Ljungberg M, McKeon B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocyte implantation in cartilage lesions of the knee: Long-term evaluation with magnetic resonance imaging and delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging technique. *Am J Sports Med* 2010;38:943-949.
 24. Trattnig S, Ba-Ssalamah A, Pinker K, Plank C, Vecsei V, Marlovits S. Matrix-based autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: noninvasive monitoring by high-resolution magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging* 2005;23:779-787.
 25. Welsch GH, Mamisch TC, Zak L, et al. Evaluation of cartilage repair tissue after matrix-associated autologous chondrocyte transplantation using a hyaluronic-based or a collagen-based scaffold with morphological MOCART scoring and biochemical T2 mapping: Preliminary results. *Am J Sports Med* 2010;38:934-942.

ARTHROSCOPY TECHNIQUES

Have you been to www.arthroscopytechniques.org lately? Check it out; we now publish *three* video tech notes a week!