

SISTEMA CO-CULTIVO DE CONDROCITOS PARA LA OBTENCIÓN DE MATERIAL DE REEMPLAZO DE CARTÍLAGO ARTICULAR

CAMPO DE LA INVENCION

5

La presente invención se relaciona con el campo de la bioingeniería o reconstrucción de tejidos corporales. En particular, esta invención está dirigida a un método de cultivo de condrocitos normales, los condrocitos obtenidos por dicho método, material de terapia de cartílago articular, utiliza los condrocitos obtenidos por un método que permite
10 preservar el fenotipo de los condrocitos en cultivo y un método para determinar el efecto que tienen agentes de prueba sobre el cartílago articular.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Cada año se llevan a cabo aproximadamente un millón de cirugías en todo el mundo para reparar las articulaciones. Estas van desde procedimientos quirúrgicos de cadera y rodilla hasta de defectos cartilagosos. Las enfermedades originadas a partir de las articulaciones están asociadas con un gran número de complicaciones para aquellas
20 personas que las padecen. Por ejemplo, los defectos en cartílago y huesos juegan un papel primordial tanto en la patogénesis de la osteoartritis como en las condiciones post-traumáticas.

El sistema esquelético y sus elementos funcionales, las articulaciones, están compuestas de cápsula articular, membrana sinovial, ligamentos, hueso y cartílago
25 articular. Estos dos últimos han sido intensamente estudiados en los últimos años. La colágena es el principal componente de la matriz extracelular del hueso y cartílago. Las diversas formas de colágena dan propiedades únicas a estos dos tejidos, lo que les permite llevar a cabo sus funciones específicas en el sistema esquelético.

30 El hueso esta compuesto principalmente de colágena tipo I, la cual representa el 90% de su masa seca. Esta matriz de colágena esta mineralizada por precipitación con

cristales de hidroxapatita, lo que hace sólido y durable al hueso. Basado en las diferencias de estructura, el tejido óseo se puede subdividir en hueso cortical (la capa densa externa) y hueso trabecular (la parte menos densa con una microestructura característica que alberga a la médula ósea). La homeostasis del hueso y la renovación tisular son dependientes de dos tipos de células, los osteoblastos y los osteoclastos, responsables respectivamente, de la formación y resorción ósea.

El cartílago articular recubre los extremos articulares de los huesos de las articulaciones diartroideas. Es un tejido hipocelular, aneural, alinfático y avascular. Este tejido actúa como un material elástico que absorbe y distribuye las cargas y junto con el líquido sinovial contribuye a minimizar la fricción entre las superficies articulares. La matriz extracelular está compuesta principalmente de colágena tipo II, la cual representa el 60% de su masa seca. Debido a la abundante presencia de proteoglicanos (alrededor del 20% de su masa seca), el cartílago tiene un contenido de agua significativamente mayor que el hueso (70% contra 10%), lo que le confiere una relativa flexibilidad y de esta forma la capacidad de soportar distorsiones. Solamente un tipo de célula, el condrocito, es responsable del balance dinámico de la síntesis y degradación de matriz extracelular, lo cual involucra sistemas enzimáticos sumamente complejos.

El tejido óseo que se encuentra en íntima relación con el cartílago articular consiste en una capa delgada de hueso llamada placa subcondral. Bajo circunstancias normales el recambio de hueso y cartílago esta delicadamente balanceado, pero en condiciones patológicas puede cambiar este balance, promoviendo de esta forma cambios estructurales que conllevan finalmente al desarrollo de enfermedades esqueléticas.

En este sentido, la osteoartritis y la artritis reumatoide son enfermedades en las que se produce degradación del cartílago articular. Esto implica inflamación, dolor crónico y pérdida de flexibilidad y movilidad de la articulación. Debido a la desestabilización del balance entre degradación y síntesis del cartílago articular y hueso subcondral, el cartílago es degradado, y esto lleva de forma secundaria a una inflamación localizada de la articulación y la producción de citocinas y enzimas proteolíticas. La osteoartritis

está caracterizada por la pérdida progresiva de cartílago y anormalidades óseas que incluyen engrosamiento óseo, deformación y formación de quistes y osteofitos, lo cual es debido a la calcificación anormal del hueso en la articulación.

- 5 En particular, las lesiones del cartílago articular no sanan, o sanan sólo parcialmente bajo ciertas condiciones biológicas, debido a múltiples factores entre los que se incluyen: a) la poca capacidad del cartílago para regenerarse debido a que los condrocitos articulares pierden casi por completo su capacidad mitótica en el adulto, y b) la ausencia de nervios, vasos sanguíneos y un sistema linfático en el sitio de la
10 lesión. La limitada capacidad de reparación del cartílago articular resulta usualmente en la generación de cartílago modificado (fibrocartílago), que carece de la estructura y propiedades biomecánicas del cartílago normal.

Actualmente muchos métodos terapéuticos están siendo utilizados para resolver la
15 problemática de las lesiones o defectos en el cartílago articular; sin embargo, ninguna de esas terapias ha resultado en la regeneración exitosa del tejido cartilaginoso de forma tal que resista la carga normal de la articulación y la actividad física por períodos prolongados.

- 20 Los tratamientos más utilizados actualmente, van desde sintomáticos para aliviar el intenso dolor que aquejan a estos pacientes, en los que se emplea anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), los cuales tienen efectos secundarios como gastritis, úlcera gástricas e incluso insuficiencia renal; hasta en los casos que lo requiere, cirugía de reemplazo articular, los cuales además de costosos, frecuentemente es necesario
25 repetirlos cada cierto tiempo. Los nuevos medicamentos que se encuentran en el mercado como el VIOX, han tenido grandes efectos secundarios.

Otros procedimientos utilizados clínicamente para corregir las lesiones y degeneración de cartílago son el lavado y la remoción del cartílago dañado por artroscopia. El lavado
30 y la remoción artroscópica involucran la irrigación de la articulación con soluciones de cloruro sódico, Ringer o Ringer y lactato. El alivio temporal del dolor parece ser

resultado de la remoción de los restos de cartílago degenerativo, enzimas proteolíticas y mediadores inflamatorios. Esas técnicas proporcionan alivio temporal del dolor, pero tienen poco o ningún potencial para la curación posterior.

- 5 La estimulación de la reparación es llevada a cabo por medio de abrasión artroplástica o microfractura. La penetración en el hueso subcondral induce sangrado y formación de coágulos de fibrina que promueven una reparación inicial, sin embargo, el tejido formado es de naturaleza fibrosa y no es muy durable. El alivio del dolor es temporal ya que el tejido presenta degeneración, envaramiento y características de deterioro
10 conforme pasa el tiempo.

El trasplante directo de células o tejido en el sitio de la lesión, así como el reemplazo de la lesión con sustitutos biológicos o sintéticos actualmente se realiza en un pequeño porcentaje de intervenciones quirúrgicas. En 1994, Brittberg et al. reportaron tratamiento exitoso en lesiones de cartílago al implantar condrocitos autólogos, provenientes de un sistema de cultivo en monocapa. De acuerdo a sus reportes, la implantación de condrocitos autólogos involucra el procesamiento y expansión de condrocitos originarios de una biopsia de cartílago de paciente y el crecimiento de esas células en un implante terapéuticamente efectivo. En este procedimiento, los condrocitos autólogos en
15 suspensión, expandidos bajo el sistema de cultivo en monocapa fueron transplantados a la lesión osteocondral, la cual fue cubierta con una capa periostio. Esta estrategia tuvo un inmenso impacto sobre la cirugía ortopédica y se consideró un descubrimiento sensacional para la reparación de cartílago.
20

- 25 La compañía Genzyme tomo la iniciativa en la comercialización de un producto de ingeniería tisular, "Carticel", el cual fue el primero en recibir la aprobación de la FDA. Aunque los resultados clínicos a corto y mediano plazo parecen ser exitosos, este procedimiento tiene algunas desventajas que necesitan ser mejoradas. Los condrocitos maduros *in vivo* son de forma redondeada y sintetizan colágena tipo II, como elemento
30 fundamental de la matriz extracelular. Sin embargo, los condrocitos que crecen en monocapa tienden a asumir una morfología fibroblástica, pierden su habilidad para

formar matrices y sintetizan colágena tipo I predominantemente. Los condrocitos dediferenciados pueden exhibir fenotipo de condrocitos articulares solamente un número limitado de pasajes. De esta forma, es sumamente dudoso que las células fibroblásticas puedan re-expresar el fenotipo de condrocitos articulares después del transplante. Existe otro riesgo que es concerniente al hecho de que algunos condrocitos puedan escapar del sitio del injerto durante la inoculación debido a que son inyectados en suspensión.

Una estrategia es el crecimiento espacial de condrocitos acompañados con agregación celular mientras mantienen su fenotipo. Wakitani et al. efectuaron el cultivo de condrocitos de conejo encapsulados en un gel de colágena tipo I, y demostraron que el tejido recién formado adquirió firmeza después de un prolongado cultivo, ofreciendo de esta forma un resultado exitoso para el tratamiento de cartilago articular dañado de conejo *in vivo*. De esta forma, el método de cultivo utilizando colágena tipo I parece ser una estrategia prometedora para el transplante de condrocitos. La maduración de los condrocitos se acelera en los cultivos en tercera dimensión, aunque la proliferación celular está frenada debido a la limitación del suministro de nutrientes en el soporte. En el caso del transplante autólogo, el número de condrocitos obtenidos del paciente para cultivo es mínimo.

Existen, a la fecha dos propuestas para promover la agregación celular, las cuales se pueden categorizar en cultivos sin soporte y con soporte, utilizando para esto un gel o esponja porosa. Sin embargo, para iniciar el cultivo la adquisición de la fuente celular de la biopsia del paciente viene a ser controversial, desde el punto de vista de la cantidad de células que se obtienen inicialmente.

Al emplear un soporte estructural como sustituto temporal para la matriz extracelular se proporciona a las células un ambiente específico para el desarrollo en tercera dimensión. Han sido propuestos los cultivos en gel que utilizan materiales con baja y alta afinidad a los condrocitos, tales como agarosa, alginato y colágena tipo I, además de las esponjas porosas hechas de polímeros naturales de colágena, y polímeros

5 sintéticos de ácido poliglicólico (PGA) o ácido poliláctico-co-glicólico, que han sido aplicadas para mejorar la operación del sembrado celular y el suministro de oxígeno en el soporte.

5 Consecuentemente, existe una fuerte necesidad en el estado de la técnica de desarrollar una alternativa económica para tratar los defectos articulares osteoartríticos, que además permita que la regeneración de la articulación afectada sea lo más cercana posible a las condiciones *in vivo* y tan eficiente como sea posible. Por otra parte, existe también la necesidad de proporcionar transplantes, que sean cultivados bajo
10 condiciones lo más cercanamente posible a aquellas *in vivo*, y proporcionen un alto grado de biocompatibilidad. Finalmente, existe también la necesidad en el estado de la técnica de proporcionar composiciones, las cuales permitan el tratamiento del daño articular preferiblemente con técnicas que impliquen una invasión mínima.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Figura 1.A: Condrocitos dediferenciados a células tipo fibroblastos (flecha).
Figura 1.B: Condrocitos dentro de las perlas de alginato (flecha). Figura 1.C: Co-cultivo
20 de condrocitos encapsulados en perlas de alginato (flecha) y células condrocitos dediferenciados (estrella).

Figura 2. Los histogramas del citómetro de flujo y las gráficas fueron divididos en siete zonas (M1-M7), M1 representa la zona donde se situaron las células teñidas con CFSE que presentan alta intensidad de fluorescencia y M7 la zona donde se ubicaron las
25 células sin fluorescencia; cada zona consecutiva representa una disminución de la intensidad de la fluorescencia celular del 50%, con respecto a la zona precedente, lo que significa que cada zona representa una nueva división celular; A: Fluorescencia natural de los condrocitos, las células se situaron en M7, la zona sin fluorescencia;
30 B: Condrocitos teñido con CFSE, las células se desplazaron a la zona de mayor fluorescencia M1; C: Los condrocitos teñidos con CSFE después de 5 días de co-cultivo

muestran un desplazamiento hacia la zona M7 del histograma; D: Los condrocitos del cultivo control después de 5 días se mantuvieron entre las zonas M1 a M4 y presentaron un desplazamiento mínimo hacia la zona M7.

5 **Figura 3.** Fases de mitosis (estrellas) en co-cultivo de condrocitos. A: Profase, B: Metafase, C: Anafase, D: Telofase. E: La prueba de TUNEL para identificar muerte celular por apoptosis demostró muy pocas células positivas en el sistema de co-cultivo de condrocitos (estrella); F: Control positivo de TUNEL; G: Control negativo de TUNEL.

10 **Figura 4.** Expresión de colágena II en las perlas de alginato conteniendo condrocitos en el sistema de co-cultivo. El anticuerpo reconoció una proteína de 97 kDa y otra de 120 kDa. La proteína con menor movilidad electroforética posiblemente representa una forma nativa de la Colágena II. 1. Control positivo, cartílago normal; 2. Perlas de alginato del co-cultivo; 3. Perlas de alginato del cultivo control de; 4: Control negativo, células HeLa.
15

SUMARIO DE LA INVENCION

20 A la luz de lo descrito el objeto de la presente invención es:

Proporcionar un nuevo método para la producción de un implante de cartílago, dicho método consiste en encapsular condrocitos en perlas de alginato y cultivar los condrocitos encapsulados en presencia de una monocapa en semi-confluencia de
25 condrocitos dediferenciados (co-cultivo) y que, además, este método de co-cultivo permita:

- Obtener un implante de cartílago por el método arriba señalado.

- Utilizar el implante obtenido para preparar un producto farmacéutico que permita la regeneración o reparación de cartílago articular en un individuo con necesidad de dicha regeneración o reparación.
- 5
- Obtener condrocitos viables capaces de ser utilizados en el trasplante de cartílago articular.
 - Producir condrocitos no dediferenciados.
- 10
- Preservar el fenotipo de condrocitos cultivados.
 - Proporcionar un método para determinar el efecto de un agente de prueba sobre la matriz del cartílago. De acuerdo a este método, es posible obtener un tejido cartilaginoso al cultivar condrocitos encapsulados en perlas de alginato sobre una monocapa semi-confluyente de condrocitos dediferenciados y uno o más agentes de prueba que se encuentran en contacto con dicho tejido. El efecto del agente o agentes de prueba sobre el tejido con el cual estuvieron en contacto es llevado a cabo en presencia o ausencia de moduladores conocidos del tejido cartilaginoso. Después de haber observado en un agente de prueba alguna propiedad deseable, tal como la sobrerregulación de la producción de cartílago, la inhibición de la degradación de cartílago o el incremento de la degradación de cartílago, el agente de prueba puede ser identificado y entonces aislado o sintetizado químicamente para producir una droga terapéutica. De esta forma el presente método puede ser utilizado para hacer drogas útiles para el tratamiento terapéutico de tejidos cartilaginosos *in vitro* e *in vivo*. Como se utiliza aquí, un agente de prueba es definido como un compuesto químico que tiene un efecto modulador desconocido sobre el tejido cartilaginoso en la etapa de desarrollo del cartílago en la cual el agente de prueba es administrado. Una persona experta en el arte entenderá que el término agente de prueba es dependiente de múltiples factores incluyendo al menos el compuesto a ser probado y la etapa de desarrollo del cartílago en la cual el agente es probado.
- 15
- 20
- 25
- 30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Aislamiento de condrocitos

5

Los condrocitos fueron aislados a partir de cartílago articular de las rodillas y cadera de ratas Wistar macho (130–150 g de peso). El cartílago fue removido de los animales que fueron sacrificados utilizando una sobre dosis de anestesia, de acuerdo con las Guías de Investigación Nacional (NOM-062-ZOO-1999). El cartílago articular fue digerido durante 10 minutos en tripsina bovina al 0.02% (Research Organics, Cleveland, OH), en "solución A" (Glucosa 9.99 mM, KCl 2.95 Mm, NaCl 130 mM y Na₂HPO₄ 5.25 mM, en agua MiliQ, suplementada con gentamicina 50µg/ml y un pH final de 7.2-7.4), en oscuridad y agitación continua a temperatura ambiente (TA). Posteriormente el cartílago fue tratado durante 2 horas con Colagenasa tipo II al 0.02%, en la "solución A" a 37°C, en oscuridad y agitación continua. Las células obtenidas después de la digestión se filtraron a través de una malla de nylon de 50µm (PGC Scientific, Maryland, USA) y lavadas dos veces en "solución A" conteniendo EGTA 1mM, a pH 7.2–7.4. La pastilla celular se resuspendió en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO, In Vitrogen Corporation, Grand Island, NY, USA) conteniendo EGTA 1mM, a pH 7.2-7.4, la viabilidad de las células fue evaluada por la prueba de exclusión vital con azul de tripano.

10

15

20

Cultivo de condrocitos en monocapa

25

La suspensión de condrocitos se ajustó a una concentración de 3.5×10^4 células/ml, se sembró 1 ml de suspensión celular en un frasco de cultivo; inmediatamente se añadieron 10 mililitros de medio de cultivo DMEM complementado con 10% de suero fetal bovino y se cultivo a 37°C/5% CO₂ hasta alcanzar 40% de confluencia. Las observaciones de confluencia se llevaron a cabo utilizando un microscopio invertido Olympus IM con el objetivo 20x (Olympus, Japan).

30

Condrocitos teñidos con CFSE

Los condrocitos se aislaron de acuerdo al procedimiento previamente descrito. La pastilla celular se resuspendió en 1 ml de "solución A" conteniendo EGTA 1mM, pH 7.2-7.4, y se teñieron con 10 μ l de 5-carboxifluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), 0.5mM en "solución A", se incubaron por 10 minutos a 37 °C en baño María, agitándolas suavemente cada 2 minutos. Después de eso, las células se lavaron dos veces con 13 ml de medio de cultivo DMEM conteniendo EGTA 1mM, complementado al 10% con suero fetal bovino. Una alícuota de células se fijó en paraformaldehído al 4% en solución buffer de fosfatos salina (PBS) por dos horas, se lavó dos veces en PBS, se resuspendió en 200 μ l de PBS y se analizó al citómetro de flujo (Becton Dickinson FACS Calibur, San José, CA, USA), para obtener los valores basales de la intensidad de fluorescencia de las células recién teñidas. Una muestra de condrocitos aislados sin teñir se analizó previamente por citometría de flujo como control de la fluorescencia natural de las células.

Condrocitos en perlas de alginato

Las células teñidas con CFSE restantes fueron encapsuladas en alginato de calcio de la siguiente manera. La suspensión celular se ajustó a 2×10^6 y se añadió a un volumen igual de alginato de calcio al 2.4% (Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) en "solución A" para obtener una concentración final de 1×10^6 en alginato 1.2%. La suspensión de células/alginato fue goteada lentamente a través de una aguja calibre 22 en una solución de CaCl₂ 103 mM, en solución salina fisiológica (NaCl 150mM), para obtener los condrocitos encapsulados en las perlas de alginato. Las perlas de alginato se mantuvieron en la solución de CaCl₂ durante 10 minutos a TA para permitir gelificación del alginato, posteriormente las perlas se lavaron dos veces en "solución A" y dos veces en medio de cultivo DMEM.

Co-cultivo de condrocitos

Las perlas de alginato obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito se dividieron para obtener dos tipos de cultivo: cultivo experimental (co-cultivo) y cultivo control. Para el co-cultivo, aproximadamente sesenta perlas de alginato se añadieron al frasco de cultivo que contenía una monocapa de condrocitos dediferenciados, que había alcanzaron un 40% de confluencia. Para el cultivo control, las perlas de alginato se cultivaron en un frasco de cultivo sin monocapa de condrocitos dediferenciados. Ambos fueron cultivados durante 5 días a 37 °C/5% CO². El medio de cultivo se cambió conforme fue requerido.

Proliferación de condrocitos

Después de 5 días de cultivo, los condrocitos encapsulados en las perlas de alginato se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante dos horas, después de lo cual se lavaron dos veces en PBS. Los condrocitos se recuperaron al disolver de las perlas de alginato por incubación durante 20 minutos a TA en citrato de sodio 55mM en "solución A" conteniendo EGTA 1mM, pH 7.2-7.4. Posteriormente, los condrocitos se lavaron dos veces y se resuspendieron en "solución A". La suspensión celular se dividió en dos muestras para cada uno de los dos cultivos, experimental y control. Una muestra de ambos cultivos se centrifugó a 554g durante 10 minutos, se resuspendió en 200µl de PBS conteniendo EGTA 1mM y los condrocitos se analizaron por citometría de flujo para evaluar la división celular.

Fases de mitosis y apoptosis

Las segundas muestras de ambos cultivos se adhirieron sobre portaobjetos por medio del cytopsin (Cytospin 3, Shandon Lapshaw, Pittsburg, PA; USA). Dos tipos de pruebas se realizaron a los condrocitos adheridos a los portaobjetos: la técnica convencional de hematoxyline-eosine (HE) para identificar las fases de mitosis y la prueba de TUNEL para observar células apoptóticas.

Fenotipo de condrocitos

Para analizar si los condrocitos provenientes de los cultivos en perlas de alginato mantuvieron el fenotipo de condrocitos articulares, el tiempo de cultivo se extendió a 14 días para permitir el depósito de matriz extracelular y entonces se efectuó a las perlas de alginato la prueba de western blot para evaluar la expresión de colágena tipo II de acuerdo a la metodología descrita en 2005 por Gómez-Camarillo y Kouri. En cada carril del gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%), se cargaron 15 μ g de proteína proveniente de las perlas de alginato del co-cultivo, del cultivo control y de los controles positivo (cartilago articular normal de rata) y negativo (células HeLa), y enseguida fueron sometidas a electroforesis. Posteriormente se hizo la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La membrana de nitrocelulosa fue preincubada en leche en polvo descremada diluida en PBS/2% Tween, por 1 hora a TA, después de lo cual se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpos monoclonales contra colágena tipo II (1:200 en PBS/2% Tween, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA). Posteriormente se incubó por 1 hora con un anticuerpo secundario anti-ratón marcado con peroxidasa (1:3000 en PBS, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) La inmunoreacción se visualizó utilizando el sistema de detección por quimioluminiscencia Western blotting ECL+Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Buenos Aires, Argentina). Como control interno de la técnica, se efectuó la prueba de western blot para la expresión de actina, utilizando anticuerpos contra actina (1:250 en PBS/2% Tween, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se llevan a cabo utilizando técnicas estándar, las cuales son bien conocidas y rutinarias para aquellas personas expertas en la técnica. Los siguientes ejemplos son presentados para propósito ilustrativo y no se deben considerar de ninguna manera limitantes del alcance de esta invención.

EJEMPLO 1

Cultivo en monocapa y co-cultivo

- 5 Los condrocitos en suspensión se adhirieron a la superficie de frasco de cultivo a las 24 horas, pero retuvieron su morfología redondeada. A las 48 horas los condrocitos adoptaron una morfología semejante al fibroblasto y alcanzaron una confluencia del 40%, 72 a 96 horas después de sembrados (Fig. 1A). Una vez que se obtuvo la monocapa en semi-confluencia, se añadieron al frasco de cultivo los condrocitos
- 10 encapsulados en las perlas de alginato (Fig. 1B), para establecer el sistema de co-cultivo (Fig. 1C).

EJEMPLO 2

Proliferación de condrocitos

- 15 Tanto en el sistema de co-cultivo, como en el cultivo control se observó división celular desde el primero hasta el quinto día, sin embargo, en el cultivo control la división celular fue menor. En el sistema de co-cultivo, la división de los condrocitos fue sobresaliente en el quinto día de cultivo, en este tiempo se encontró mayor desplazamiento de los
- 20 condrocitos hacia la zona de menor fluorescencia en el histograma (Fig. 2).

EJEMPLO 3

Fases de mitosis y apoptosis

- 25 Después de cinco días fue posible identificar todas las fases de mitosis en los condrocitos de las perlas de alginato del co-cultivo (Fig. 3A-D), no se observaron condrocitos necróticos. Por un lado, la prueba de TUNEL presentó un bajo porcentaje de células apoptóticas, 0.03% en mil células contadas (Fig. 3E-G).

EJEMPLO 4

Fenotipo de condrocitos

En todos los casos (experimental y control) el fenotipo de los condrocitos se mantuvo como se demostró por la expresión de colágena II, presentado por la prueba de Western blot de las perlas de alginato después de cinco días de cultivo (Fig. 4). Además, las observaciones morfológicas también presentaron características de condrocitos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Akens MK, Hurtig MB. Influence of species and anatomical location on chondrocyte expansion. *BMC Musculoskelet Disord* 2005; 6:23.
2. Almqvist KF, Wang L, Wang J, Baeten D, Cornelissen M, Verdonk R, Veys EM, Verbruggen G. Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks. *Ann Rheum Dis* 2001; 60:781-90.
3. Aydelotte MB, Schmid TM, Greenhill RR, Luchene L, Schumacher BL, Kuettner KE. Synthesis of collagen by cultured bovine chondrocytes derived from different depths of articular cartilage. *Orthoped Res Soc Trans* 1991;16:26-34.
4. Bayliss MT, Venn M, Maroudas A, Ali SY. Structure of proteoglycans from different layers of human articular cartilage. *Biochem J* 1983; 209:387-400.
5. Benya PD, Padilla SR, Nimni ME. The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III and type I trimer, but not type II. Verifications by cyanogen bromide peptide analysis. *Biochem* 1977 Mar; 16: 865-72.
6. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215-24.
7. Boumediene K, Felisaz N, Pujol JP. Cell-cycle-dependent expression of transforming growth factor beta type I receptor correlates with differential proliferative effects of TGFbeta1 in articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 1998; 243:173-84.

8. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*. 1994; 331:889-95.
9. Buckwalter JA, Brown TD. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 423:7-16.
10. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Kimura JH, Hunziker EB. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functionally extracellular matrix. *J Orthop Res* 1992; 10:745-748.
11. Chacko S, Abbott J, Holtzer S, Holtzer H. The loss of phenotypic traits by differentiated cells. VI. Behavior of the progeny of a single chondrocyte. *J Exp Med* 1969; 130: 417-442.
12. Chaipinyo K, Oakes BW, van Damme MP. Effects of growth factors on cell proliferation and matrix synthesis of low-density, primary bovine chondrocytes cultured in collagen I gels. *J Orthop Res* 2002; 20:1070-8.
13. Cheung HS, Harvey W, Benya PD, Nimni H. New Collagen markers of depression synthesizes by rabbit articular chondrocytes in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 68: 1371-1378.
14. Deshmukh K, Kline WG. Characterization of collagen and its precursors synthesized by rabbit articular cartilage cells in various culture systems. *Eur J Biochem* 1976; 69: 117-123.
15. Gomez-Camarillo MA, Kouri JB. Ontogeny of rat chondrocyte proliferation: studies in embryo, adult and osteoarthritic (OA) cartilage. *Cell Res* 2005; 15:99-104.
16. Grimsrud CD, Romano PR, D'Souza M, Puzas JE, Reynolds PR, Rosier RN, O'Keefe RJ. BMP-6 is an autocrine stimulator of chondrocyte differentiation. *J Bone Miner Res* 1999; 14:475-82.
17. Guo J, Jourdan GW, McCallum DK. Culture and growth characteristics of chondrocytes-encapsulated in alginate beads. *Conn Tiss Res* 1989; 19:277-297.
18. Häuselmann HJ, Masuda K, Hunziker BE, Neidhart M, Mok SS, Michel AB, Thonar AJM. Adult human chondrocyte cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. *Am J Physiol* 1996; 271:C724-C752.

19. Hickey DG, Frenkel SR, Di Cesare PE. Clinical applications of growth factors for articular cartilage repair. *Am J Orthop* 2003; 32:70-76.
20. Jakob M, Demarteau O, Schafer D, Hintermann B, Dick W, Heberer M, Martin I. Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation in vitro. *J Cell Biochem* 2001; 81:368-77.
21. Kimura T, Hasui N, Ohsawa S. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long term cultures. *Clin Orthop Related* 1984; 186: 231-239.
22. Kouri JB, Abbud-Lozoya K. Criteria for TUNEL labeling in determining apoptosis in human osteoarthritis cartilage: Comment on the article by Aigner et al. *Arthritis Rheum* 2002; 46:2260-1.
23. Lee AD, Reisles T, Bader DL. Expansion of chondrocytes for tissue engineering in alginate beads enhance chondrocyte phenotype compared to conventional monolayer techniques. *Acta Orthop Scand* 2003; 74:6-15.
24. Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to interleukin-1beta. *J Cell Physiol* 1998; 176:303-13.
25. Loesser RF, Pacione CA, Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increase survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis and Rheum* 2003; 48:2188-2196.
26. Nixon AJ, Saxer RA, Brower-Toland BD. Exogenous insulin-like growth factor-I stimulates an autoinductive IGF-I autocrine/paracrine response in chondrocytes. *J Orthop Res* 2001; 19:26-32.
27. Pujol JP, Galera P, Pronost S, Boumediene K, Vivien D, Macro M, Min W, Redini F, Penfornis H, Daireaux M, et al. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) and articular chondrocytes. *Ann Endocrinol* 1994; 55:109-20.

28. Srivastava VM, Malesud CJ, Hough AJ, Bland JH, Sokoloff L. Preliminary experience with cell culture of human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum.* 1974 Mar-Apr; 17(2):165-9.
29. Thiion S, Bernbaum F. Culture and phenotyping of chndrocytes in primary culture. *Methods Mol Med* 2004; 100: 1-14.
30. Thomas JT, Grant ME. Cartilage proteoglycans aggregate and fibronectin can modulate the expression of type X collagen by embryonic chick chondrocytes cultured in collagen gels. *Biosci Rep* 1988; 8:163-171.
31. Trippel SB. Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol Suppl* 1995; 43:129-32.
32. Tschan T, Bohme K, Conscience-Egli M, Zenke G, Winterhalter KH, Bruckner P. Autocrine or paracrine transforming growth factor-beta modulates the phenotype of chick embryo sternal chondrocytes in serum-free agarose culture. *J Biol Chem* 1993; 268:5156-61.
33. Tsukazaki T, Usa T, Matsumoto T, Enomoto H, Ohtsuru A, Namba H, Iwasaki K, Yamashita S. Effect of transforming growth factor-beta on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 1994; 215:9-16.
34. van Susante JLC, Buma P, van Osch GJVM, Versleyen D, van der Kraan PM, van der Berg WB, Homminga GN. Culture of chondrocytes in alginate and collagen carrier gels. *Acta Orthop Scand* 1995; 66:549-556.
35. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg Br* 1989;71:74-80.
36. Weksler NB, Lunstrum GP, Reid ES, Horton WA. Differential effects of fibroblast growth factor (FGF) 9 and FGF2 on proliferation, differentiation and terminal differentiation of chondrocytic cells in vitro. *Biochem J* 1999; 342:677-82.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para la producción de un implante de cartílago que consiste en encapsular condrocitos en perlas de alginato y cultivar los condrocitos encapsulados en presencia de una monocapa en semi-confluencia de condrocitos dediferenciados.
- 10 2. Un implante de cartílago obtenido de acuerdo al método reclamado en la reivindicación 1.
- 15 3. El uso del implante de cartílago obtenido de acuerdo al método reclamado en la reivindicación 1, para preparar un producto farmacéutico para la regeneración o reparación de cartílago articular en un individuo con necesidad de dicha regeneración o reparación.
- 20 4. Un método para producir condrocitos viables capaces de ser utilizados en el trasplante de cartílago articular de acuerdo al método reclamado en al reivindicación 1.
- 25 5. Un método de cultivo celular para la producción de condrocitos no dediferenciados de acuerdo al método reclamado en al reivindicación 1.
- 30 6. Un método para preservar el fenotipo de condrocitos cultivados de acuerdo al método reclamado en al reivindicación 1.

7. Un método para determinar el efecto de un agente de prueba sobre una matriz de cartílago que comprende:

5 a) Encapsular condrocitos en perlas de alginato y su cultivo subsecuente en presencia de una monocapa en semi-confluencia de condrocitos dediferenciados.

b) Contactar uno o más agentes de prueba con el cultivo llevado a cabo en el paso.

10 c) Medir el efecto que tienen uno o más agentes de prueba sobre el cultivo contactado.

15

20

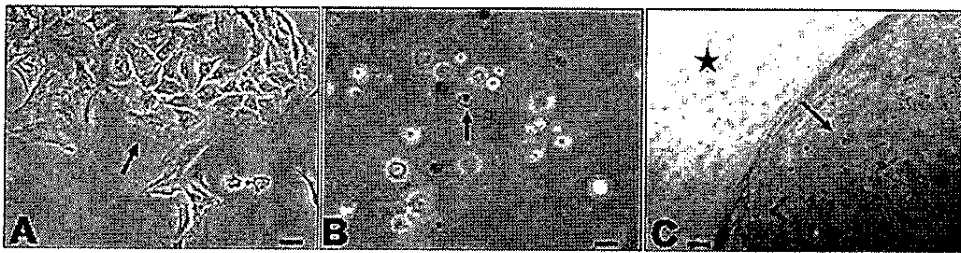
25

30

RESUMEN

La presente invención es relativa al campo de la ingeniería tisular, en particular al
5 reemplazo de tejido patológico en articulaciones (principalmente hueso y cartílago).
Para este propósito, la invención divulga un método para producir composiciones de
células, las cuales comprenden un sistema de co-cultivo de condrocitos en perlas de
alginato para obtener dichas composiciones celulares. Las composiciones celulares
10 pueden ser utilizadas para la producción de un material de trasplante de cartílago útil
para el tratamiento de la osteoartritis y enfermedades o defectos articulares.

Figura 1



A

Figura 2

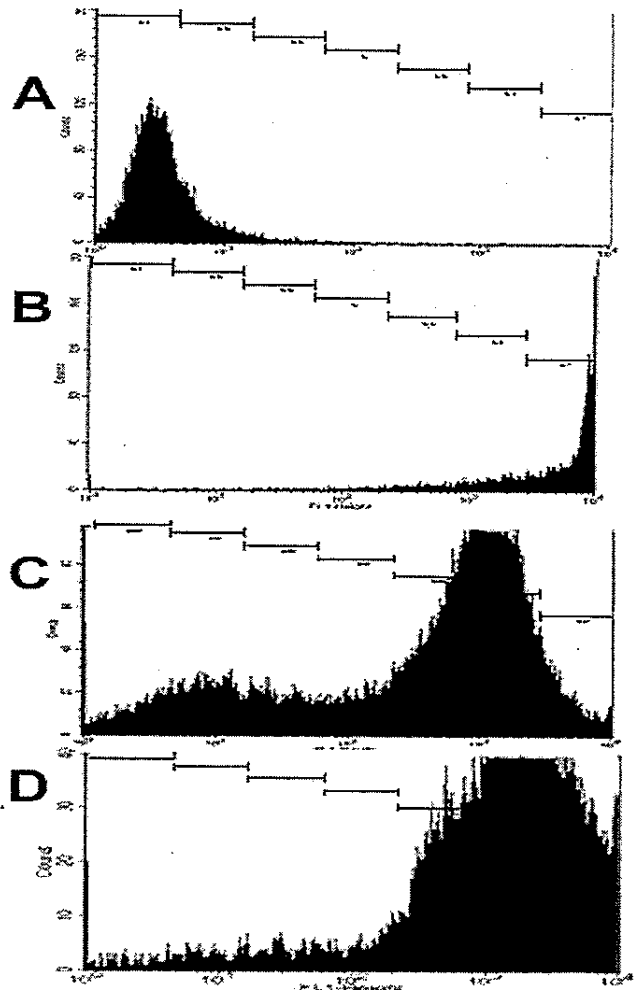
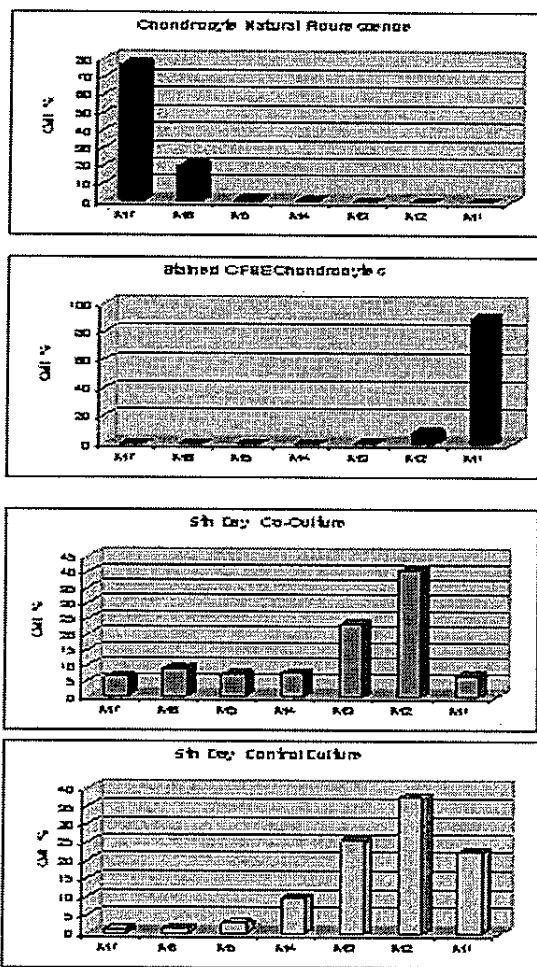


Figura 3

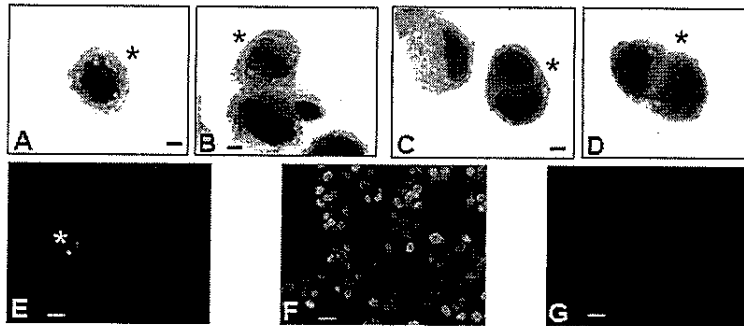


Figura 4

