

CULTIVO DE TEJIDO CARTILAGINOSO ARTICULAR: ACERCAMIENTO CONCEPTUAL

NATALIA MARÍA ZAPATA*
NATALIA JANET ZULUAGA*
SILVIA NATALIA BETANCUR*
LUIS ERNESTO LÓPEZ**

RESUMEN

Con los métodos disponibles en el momento para la reconstrucción de tejidos, la reparación de defectos del tejido cartilaginoso no ha sido alcanzada completamente. Por esta razón, se ha recurrido a la ingeniería de tejidos, que busca el desarrollo de estrategias para obtener sustitutos funcionales de tejido cartilaginoso, con el fin de ofrecer soluciones terapéuticas a pacientes con pérdida o falla de este tipo de tejido. En el presente estudio se hace una breve revisión de la anatomía, histología, fisiología y patología del tejido cartilaginoso y de las terapias usuales para su reparación, además de dar a conocer el papel cumplido por la ingeniería de tejidos y los biomateriales en el desarrollo de soluciones terapéuticas en este campo.

PALABRAS CLAVE: cartílago; lesiones; terapias; ingeniería de tejidos; biomateriales.

ABSTRACT

The currently available methods for tissue repair have not been able to restore completely functional cartilage tissue. For this reason, tissue engineering has developed strategies for fabricating cartilage

* Ingeniera Biomédica EIA-CES, Investigadora del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica EIA-CES (Gibec), Escuela de Ingeniería de Antioquia (EIA) y Universidad CES. nzapata@eia.edu.co; nzuluaga@gebarco.com.co; nbetancur@gebarco.com.co

** Biólogo, Universidad de Antioquia; Magíster en Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia. Jefe del Programa de Biología CES-EIA, director del Grupo de Investigación en Ingeniería Biomédica EIA-CES (Gibec) y docente de Ingeniería Biomédica EIA-CES. lelopez@ces.edu.co

substitutes in order to offer therapeutic solutions to patients that could suffer from any kind of cartilage disease. The purpose of this article was to review the anatomy, histology, physiology, pathology of cartilage, and the therapies commonly used for repairing this tissue. This article also shows the role established by tissue engineering and biomaterials in this field.

KEY WORDS: cartilage; injuries; therapies; tissue engineering; biomaterials.

1. INTRODUCCIÓN

Se ha encontrado que las lesiones aisladas y no tratadas del cartílago hialino articular pueden llevar a un daño grande del tejido y concluir fácilmente en el desarrollo de enfermedades degenerativas del tejido cartilaginoso, como es la osteoartritis temprana (Grunder *et al.*, 2004). Por esta razón, es importante generar estrategias que permitan la reparación de las lesiones del cartílago y se evite también el progreso de estas afecciones (Martin *et al.*, 2005).

Los métodos utilizados hasta ahora proponen diversas estrategias para la reparación de defectos del tejido cartilaginoso, entre las que cabe resaltar el uso de trasplantes de tejido autólogo (tejido del mismo paciente), heterólogo (tejido de un donante de la misma especie) o xenotrasplantes (tejido de un organismo de una especie diferente a la del receptor). Sin embargo, no es fácil encontrar donantes compatibles ni obtener un fragmento de tamaño y forma adecuados, lo que dificulta el uso generalizado de estas técnicas. Además, tanto el paciente como el donante se exponen a un alto riesgo de morbilidad e infección posteriores a la intervención quirúrgica, lo cual puede causar daño en la articulación afectada (Bryant y Anseth, 2001; Martin *et al.*, 2005).

Otro método usado es el implante de cartílago obtenido mediante el cultivo *in vitro* bidimensional, el cual produce una dediferenciación celular, caracterizada por la pérdida de la morfología y el patrón de expresión génica propio del tejido cartilaginoso (Masuda *et al.*, 2003; De la Fuente *et al.*, 2004; Gaissmaier *et al.*, 2005). Los resultados de varios estudios han sugerido que la encapsulación de condrocitos en diferentes biomateriales mantiene el fenotipo cartilaginoso *in vitro* por períodos de

tiempo largos. Éstos permiten la generación de una matriz extracelular compuesta por colágeno tipo II y agregán, lo que hace de este tejido un sustituto más funcional de cartílago, con ciertas similitudes al encontrado *in vivo* (Almqvist *et al.*, 2001; Masuda *et al.*, 2003; Saas *et al.*, 2004; Grunder *et al.*, 2004).

En el presente estudio se hace una breve revisión de la anatomía, histología, fisiología y patología del tejido cartilaginoso, además del papel de la ingeniería de tejidos y los biomateriales en el desarrollo de soluciones terapéuticas.

2. EL CARTÍLAGO

Según su histología, el cartílago se clasifica en cartílago hialino articular, cartílago hialino no articular, cartílago elástico y fibrocartílago. El cartílago hialino articular recubre la superficie articular de los huesos largos y la extremidad ventral de las costillas. Por su parte, el cartílago hialino no articular se encuentra en las fosas nasales, la tráquea y los bronquios. El cartílago elástico está presente en el pabellón de la oreja, el conducto auditivo externo, la trompa de Eustaquio y la laringe. Por último, el fibrocartílago hace parte de los discos intervertebrales y de la inserción de tendones o ligamentos en los huesos (Fankhauser, 2004).

El tejido cartilaginoso está compuesto por las células condrogénicas, los condroblastos y los condrocitos, los cuales presentan diferentes características de acuerdo con el tipo de cartílago en el que se encuentren. Los condrocitos comprenden entre el 1 % y el 2 % (v/v) del cartílago hialino articular humano. En la edad adulta, los condrocitos generalmente no se dividen y su función es ayudar



a mantener la integridad de la superficie articular mediante actividades sintéticas y catabólicas (Martin *et al.*, 2005).

El cartílago presenta una matriz extracelular compuesta de agua, gases, metabolitos, cationes y un conjunto de macromoléculas que incluyen colágeno tipo II y proteoglucanos. Entre estos últimos se encuentran el condroitin sulfato, el agregán y pequeñas cantidades de decorina, biglucano y fibromodulina, otros tipos de colágenos fibrilares, no fibrilares y moléculas no colagenosas adicionales (Martin *et al.*, 2004; Giroto *et al.*, 2003; Häuselmann *et al.*, 1994).

La presencia de colágeno tipo II es predominante. Esta molécula se sintetiza de dos formas, colágeno tipo IIA y IIB. El colágeno tipo IIA es sintetizado por las células mesenquimatosas y epiteliales de tejidos precartilaginosos y no cartilaginosos, mientras el tipo IIB es sintetizado sólo por los condrocitos. Por lo tanto, durante la diferenciación en tejidos en proceso de condrogénesis no se expresan los genes para el procolágeno tipo IIA, pero sí los de tipo IIB (Sandell *et al.*, 1991; Ng *et al.*, 1993).

Por otra parte, los proteoglucanos, debido a su carga negativa, atraen cationes de sodio (Na^+) y, por ende, moléculas de agua, hidratando la matriz del cartílago hasta un 80 %. Esto le confiere la resistencia característica frente a las fuerzas de compresión. Además, las cadenas laterales de glucosaminoglucanos forman enlaces electrostáticos con el colágeno, de esta forma, la sustancia básica y las fibras de la matriz forman una estructura molecular cruzada resistente a las fuerzas de tensión. Dentro de los proteoglucanos, el agregán es el más destacado (Hall *et al.*, 1996).

3. LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Clínicamente, las lesiones del tejido cartilaginoso se deben a defectos generalizados o a defectos focales. Los primeros afectan todo el tejido y se deben ante todo a la osteoartritis; los segundos comprometen una pequeña porción y se deben a

traumas en las articulaciones (Grunder *et al.*, 2004; Toegel *et al.*, 2007).

La integridad del cartílago articular se mantiene mediante la liberación regulada de hormonas, factores de crecimiento y citoquinas (tabla 1) producidas por los condrocitos, que a su vez regulan la división celular, la síntesis y la degradación de la matriz extracelular condrogénica. Cuando el cartílago articular se lesiona, se pierde el equilibrio proporcionado por los factores presentes en el tejido, lo cual genera una respuesta de los condrocitos que consiste en el incremento de la proliferación celular y de la síntesis de matriz en el sitio de la lesión. Sin embargo, esta respuesta es temporal y cesa muy pronto, posiblemente debido a la falta de una provisión constante de estos factores (Martin *et al.*, 2005; Buckwalter, 1998).

El suministro de factores de crecimiento y de diferenciación se realiza únicamente por difusión del fluido sinovial (Mankin, 1974); además, algunos de los proteoglucanos de la matriz tienen propiedades que pueden prevenir la adhesión celular, limitando así cualquier proceso de reparación. Lo anterior hace difícil la integración adecuada del tejido en reparación y el cartílago natural (Martin *et al.*, 2004; Mankin, 1974).

Después de una lesión, el cartílago articular tiene una capacidad muy limitada de autorregeneración, ya que no es penetrado por vasos sanguíneos ni linfáticos (Martin *et al.*, 2004; Bryant y Anseth, 2001). Este tejido puede degenerarse mucho antes de que los síntomas clínicos se hagan evidentes.

4. TERAPIAS PARA LA REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Entre las técnicas más utilizadas para la reparación de lesiones del cartílago articular se encuentran:

Las prótesis, por lo general, eliminan el dolor y restablecen en forma parcial la funcionalidad, pero su

durabilidad es limitada (Risbud *et al.*, 2001; Temenoff y Mikos, 2000). Por esto, principalmente para personas jóvenes, es importante identificar procedimientos alternativos para reparar, de forma permanente, las lesiones del cartílago o, por lo menos, para retrasar el implante de una articulación artificial.

La microfractura consiste en perforar la superficie subcondral para que las células progenitoras mesenquimatosas, provenientes de la médula, alcancen la lesión y formen la nueva matriz cartilaginosa. No obstante, el tejido regenerado carece de la estructura, composición, propiedades mecánicas y durabilidad del cartílago articular (Martin *et al.*, 2005).

Los autoinjertos y aloinjertos consisten en aislar periostio autólogo o heterólogo respectivamente y encajarlos a presión dentro de agujeros perforados en el lugar de la lesión para producir tejido cartilaginoso. No obstante, el principal limitante de este tipo de procedimientos es la disponibilidad y compatibilidad del tejido del donante y la morbilidad inducida en el paciente (Bryant y Anseth, 2001; Martin *et al.*, 2004).

La técnica de implante de condrocitos autólogos consiste en aislar enzimáticamente condrocitos articulares sanos, los cuales son expandidos por medio de un cultivo en monocapa y luego reinsertados en el sitio del defecto debajo del periostio. Las principales limitantes de esta técnica son el mecanismo de fijación del injerto y la confiabilidad de los métodos utilizados para evaluar la funcionalidad de los implantes *in vivo* (Martin *et al.*, 2005). Por lo anterior, la contribución de esta técnica en la reparación de defectos de cartílago está por definir (Beris *et al.*, 2005).

Otra forma prometedora de inducir la formación de cartílago es mediante la inyección local de factores de crecimiento, proteínas funcionales y factores de transcripción. Sin embargo, hay limitaciones en cuanto al mantenimiento de las concentraciones adecuadas en los sitios afectados durante los periodos requeridos. Igualmente, la aplicación directa de estas sustancias tiene una vida media muy corta. Entonces,

es importante que los factores de reparación puedan sintetizarse localmente de una forma sostenida y controlable en el sitio del defecto. Por lo tanto, los factores producidos de manera endógena pueden ser eficientes (Martin *et al.*, 2005; Schuler *et al.*, 2000). En la tabla 1 se mencionan los principales factores relacionados con la condrogénesis y el mantenimiento de la integridad del tejido cartilaginoso.

5. LA INGENIERÍA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO

El objetivo principal de la ingeniería de tejidos es buscar la aplicación de los principios de la ingeniería y de las ciencias de la vida en el desarrollo de sustitutos que restauren, mantengan o mejoren las funciones de un tejido específico (Langer y Vacanti, 1993). En particular, la ingeniería del tejido cartilaginoso busca generar implantes *in vitro* que puedan ser funcional y estructuralmente competentes a partir de células autólogas (Gaissmaier *et al.*, 2005).

El implante de tejido cartilaginoso generado *in vitro*, comparado con los procedimientos mencionados, permite mejor fijación y recuperación más eficiente de la actividad de la articulación. Para generar *in vitro* tejido cartilaginoso uniforme y de tamaño definido a partir de células humanas, es necesario primero identificar una fuente apropiada de células condrogénicas, ya que extraer una biopsia de una articulación significa causar un daño adicional a la superficie del cartílago. Segundo, definir los factores bioactivos requeridos por estas células, las características de las matrices de cultivo tridimensionales en las que las células se cultivan y la estimulación física que deben tener para facilitar el desarrollo y la maduración del cartílago en un ambiente controlado (Lee *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2005).

5.1 Fuentes celulares

Con el fin de solucionar los inconvenientes en cuanto a la fuente celular, se han propuesto algunas opciones, ya sea para aprovechar eficientemente una



Tabla 1. Factores relacionados con la condrogénesis y mantenimiento de la integridad del tejido cartilaginoso. (Au *et al.*, 2004; Ballock *et al.*, 1993; Enomoto-Iwamoto *et al.*, 1998; Herr *et al.*, 1996; Ignatz y Massague, 1986; Iwasaki *et al.*, 1997; Kato *et al.*, 1987; Kawasaki *et al.*, 1998; Leboy *et al.*, 1997; Lindahl *et al.*, 1987; Loeser *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2005; McQuillan *et al.*, 1986; Nugent y Edelman, 1992; Osborn *et al.*, 1989; Prins *et al.*, 1982; Trippel, 1995; Valcourt *et al.*, 1999).

Familia de factores	Sigla	Nombre en inglés	Aplicaciones
Factores transformantes del crecimiento tipo beta	TGF- β	<i>Transforming growth factors-β</i>	Permiten la formación del hueso endocondral. Permiten la regeneración de tejido después de una fractura. Favorecen la síntesis de colágeno tipo II y agregación. Contrarrestan los efectos inhibidores de los mediadores inflamatorios sobre la síntesis de proteoglucanos en el cartílago. Estimulan la síntesis de proteoglucanos en el cartílago defectuoso <i>in vivo</i> .
Proteínas morfogenéticas de hueso	BMP	<i>Bone morphogenic proteins</i>	Inducen el desarrollo de las yemas de las extremidades durante la embriogénesis. Participan en la formación ectópica de hueso. Favorecen la diferenciación de células mesenquimatosas a osteoblastos y condrocitos.
Factores del crecimiento de fibroblastos	FGF	<i>Fibroblast growth factors</i>	Regulan la mitosis, la diferenciación y expresión génica en varios tipos de células. Tienen efectos negativos sobre la depositación y acumulación de matriz extracelular. Promueven las actividades anabólicas y catabólicas en los condrocitos.
Insulina y factores de crecimiento de tipo insulinoide	IGF	<i>Insulin growth factors</i>	Modulan la producción de matriz extracelular en el cartílago. Inducen la síntesis y depositación de proteoglucanos Mantienen el metabolismo de los condrocitos. Estimulan la actividad sintética y mitótica en los condrocitos Inhiben el catabolismo de la matriz.
Factor de crecimiento epidermal	EGF	<i>Epidermal growth factor</i>	Estimula de forma sinérgica la síntesis de proteoglucanos. Induce la proliferación de los condrocitos.
Factor de crecimiento derivado de plaquetas	PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i>	Facilita la depositación de proteoglucanos, pero con menor eficiencia que los otros factores.

biopsia de cartílago articular o utilizar otras fuentes celulares que incluyen condrocitos de cartílago no articular o células madre mesenquimatosas (Martin *et al.*, 2005).

En el uso de condrocitos articulares humanos para este fin, se ha visto que su proliferación *in vitro* se limita y disminuye con la edad del paciente (Evans y Georgescu, 1983). Esta técnica requiere el aislamiento

de los condrocitos de su ambiente natural y luego su cultivo en monocapa, hasta alcanzar la cantidad de células apropiada, sin embargo, en este tipo de cultivo, los condrocitos rápidamente cambian su perfil biosintético a un fenotipo similar al de los fibroblastos (Masuda *et al.*, 2003; Schnabel *et al.*, 2002; De la Fuente *et al.*, 2004; Gaissmaier *et al.*, 2005); este fenómeno se conoce como dediferenciación

celular (Marijnissen *et al.*, 2000; Furukawa *et al.*, 1980; Takigawa *et al.*, 1987; Livne, 1994). Una vez que los condrocitos están dediferenciados, su capacidad de rediferenciación es muy pequeña (De Haart *et al.*, 1999). No obstante, cuando los condrocitos se transfieren a una matriz tridimensional, se ha visto que el perfil biosintético de estas células se estabiliza (Zaucke *et al.*, 2001; Häuselmann *et al.*, 1994; Bonaventure *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998).

Es posible obtener condrocitos a partir de cartílago hialino no articular mediante biopsias del cartílago de la nariz o las costillas, utilizando un procedimiento menos invasivo que la extracción de cartílago de una articulación. Además, debido a que el sitio de toma de la biopsia no está sometido a fuerzas compresivas, hay un menor riesgo de daño. Recientemente, se ha demostrado que en relación con los condrocitos articulares, los condrocitos humanos provenientes del septo nasal proliferan unas cuatro veces más rápidamente y tienen una mayor capacidad para generar tejido cartilaginoso después del cultivo en monocapa (Kafienah *et al.*, 2002). No obstante, se harían necesarios más datos de estudios *in vivo* para demostrar la funcionalidad de los condrocitos nasales en sitios donde normalmente se encuentra cartílago hialino articular (Martin *et al.*, 2005).

Una alternativa al uso de condrocitos diferenciados es el uso de células madre. Éstas tienen mayor capacidad de proliferación, mejor respuesta a los factores de crecimiento y potencial de diferenciarse en diversos tipos de células especializadas, incluso en personas de edad avanzada (Chen *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2005).

Para la ingeniería de cartílago se ha incrementado el uso de células madre provenientes de diferentes fuentes que incluyen médula ósea (Pittenger *et al.*, 1999; Awad *et al.*, 2004; Gurevitch *et al.*, 2003), hueso trabecular, tejido muscular, tejido adiposo (Awad *et al.*, 2004; Gurevitch *et al.*, 2003), membrana sinovial (De Bari *et al.*, 2001), entre otros. No obstante, su utilidad se ha visto limitada por la dificultad para ejercer un control preciso sobre su potencial de diferenciación (Martin *et al.*, 2005).

5.2 Los biomateriales

Las propiedades funcionales de un sustituto de cartílago obtenido por medio de la ingeniería de tejidos dependen en gran parte de la selección del biomaterial apropiado para la construcción de una matriz tridimensional. Los biomateriales utilizados en el diseño de matrices tridimensionales para la ingeniería de tejidos deben cumplir varios criterios, con el fin de maximizar las posibilidades de reparación exitosa. Entre estos criterios podemos encontrar la biodegradabilidad y biocompatibilidad del biomaterial, la capacidad de difusión para el transporte de nutrientes y metabolitos, la habilidad para regular la morfología celular que afecta la diferenciación y la presencia de ligandos bioactivos que proporcionen sitios de fijación para las células (Freed *et al.*, 1993; Awad *et al.*, 2004).

Uno de los obstáculos para la ingeniería del tejido cartilaginoso ha sido el desarrollo de una matriz de cultivo tridimensional que tenga las propiedades mecánicas que se requieren, tales como la capacidad para enfrentar los grandes esfuerzos de contacto y las tensiones de una articulación. Además, debe permitir el crecimiento de tejido funcional y las interacciones apropiadas entre las células y la matriz para estimular el crecimiento del tejido (Guilak *et al.*, 2001; Butler *et al.*, 2000). Es importante que estas matrices también permitan la obtención de tejidos de diferente grosor de acuerdo con el requerimiento *in vivo*, ya que el cartílago articular humano varía en grosor según su ubicación (Bryant y Anseth, 2001).

En la construcción de matrices para la regeneración de cartílago se han utilizado materiales como hidrogeles de alginato y agarosa, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polímeros de gelificación termorreversible, compuestos de la matriz extracelular y algunos materiales naturales y sintéticos utilizados como portadores. Diferentes hidrogeles a base de alginato (Cao *et al.*, 1998; Paige *et al.*, 1995), fibrina (Sims *et al.*, 1998; Silverman *et al.*, 1999), agarosa (Rowley *et al.*, 1999) y óxido de polietileno (Elisseeff *et al.*, 1999) se han utilizado para la encapsulación



de condrocitos y su posterior implantación *in vivo*. Sin embargo, estos materiales presentan algunas limitantes en cuanto a sus propiedades mecánicas (Awad *et al.*, 2004; Bryant y Anseth, 2001). Las células de cartílago cultivadas en esferas de alginato se han estudiado en modelos animales de conejo mediante su implantación en articulaciones que presentan daño estructural del cartílago y se ha logrado una reparación completa del defecto después de 6 meses de tratamiento (Fragonas *et al.*, 2000). En la tabla 2 se describen algunos de los materiales usados en la construcción de matrices tridimensionales para el cultivo de tejido cartilaginoso.

En algunos casos, el implante *in vivo* de sustitutos de cartílago construidos a partir de ingeniería de tejidos se puede facilitar con el uso de un material portador. Éste puede proporcionar fuerza a los biomateriales débiles, además de mantener las células dentro del sustituto. Un portador ideal debe ofrecer la posibilidad de ser moldeable en casi cualquier forma y su biodegradación no debe tener ningún efecto adverso sobre la viabilidad o el metabolismo celular (Freed *et al.*, 1994a; Marijnissen *et al.*, 2000). En la tabla 3 se encuentran materiales usados como portadores, uno natural y otro sintético, además de sus ventajas y desventajas.

6. CONCLUSIÓN

La comunidad científica mundial sigue en la búsqueda de tratamientos de las lesiones del cartí-

lago articular, lo que se evidencia en la diversidad de estrategias desarrolladas en los últimos años en este campo.

De los tratamientos usados en la actualidad el propuesto por la ingeniería de tejidos constituye la mejor opción por cinco razones básicas: (1) cuenta con diversidad de fuentes celulares y de biomateriales disponibles para experimentación, (2) la elección de la fuente celular y del biomaterial adecuados puede evitar la morbilidad y el rechazo del implante por parte del paciente, (3) las propiedades del tejido *in vitro* pueden llegar a ser muy similares a las del tejido *in vivo*, (4) el implante generado permite una mejor fijación y una recuperación más eficiente de la actividad de la articulación, (5) la técnica puede ser reproducible. Finalmente, es necesario realizar investigaciones locales que permitan apropiarse de estos avances en el campo de la ingeniería de tejidos cartilaginosos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al programa de Jóvenes Investigadores e Innovadores de Colciencias (convenio 111-2005), a la Escuela de Ingeniería de Antioquia –EIA–, a la Universidad CES, al doctor Francisco Valencia y sus colaboradores de la planta de faenado de la Central Ganadera de Medellín S.A. en Medellín, Colombia.

Tabla 2. Biomateriales usados en la construcción de matrices tridimensionales para cultivo de cartílago. (Almqvist *et al.*, 2001; Ameer *et al.*, 2002; Atala *et al.*, 1993; Atala *et al.*, 1994; Au *et al.*, 2004; Awad *et al.*, 2004; Aydelotte *et al.*, 1992; Benya y Schaffer, 1982; Bonaventure *et al.*, 1994; Breinan *et al.*, 2001; Bryant y Anseth, 2001; Bulpitt y Aeschlimann, 1999; Butler *et al.*, 2000; Cho *et al.*, 2004; Chubinskaya *et al.*, 2001; Girotto *et al.*, 2003; Gutowska *et al.*, 2001; Handley *et al.*, 1980; Häuselmann *et al.*, 1994; Kawamura *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1998; Marijnissen *et al.*, 2002; Masuda *et al.*, 2003; Mauck *et al.*, 2002; Murphy y Sambanis, 2001; Paige *et al.*, 1995; Paige *et al.*, 1996; Schneider *et al.*, 2004; Zaucke *et al.*, 2001)

Material	Ventajas	Desventajas
Alginato	Material natural inerte, biocompatible y biodegradable. Provee una viabilidad del 95 % en el cultivo de células condrocíticas. Mantiene el fenotipo de las células condrocíticas. Permite la formación de una matriz extracelular con propiedades fisicoquímicas y bioquímicas muy similares a las de la matriz del cartílago normal. No presenta contracción al implantarse. Permite fácil recuperación de células sanas embebidas en él. Permite la distribución homogénea de los condrocitos encapsulados en la matriz.	Presenta una reacción inflamatoria baja después de su implante <i>in vivo</i> . Posee propiedades mecánicas bajas.
Agarosa	Permite la recuperación del fenotipo diferenciado de condrocitos dediferenciados. Favorece el incremento de la síntesis de colágeno y proteoglicanos en el tiempo. Permite la inmovilización celular completa en una matriz inerte.	Posee propiedades mecánicas bajas. Presenta contracción después de implantado.
Polímeros de ácido glicólico y ácido láctico	Promueven el crecimiento de tejido cartilaginoso nuevo. Son adecuados para la reparación de fibrocartílago.	Las matrices deben ser fabricadas antes de sembrar las células, por lo cual se presenta una disminución de la densidad celular y del contenido de glucosaminoglicanos a medida que el espesor de la matriz aumenta.
Óxido de polietileno	Permite incrementar el espesor de la matriz tridimensional de cultivo y a su vez obtener una densidad celular uniforme. Favorece la producción de tejido cartilaginoso con composición bioquímica estable. Permite la distribución radial y longitudinal de los glucosaminoglicanos en el hidrogel.	Sus propiedades mecánicas son bajas.
Polímeros de gelificación termorreversible	Permiten la proliferación de condrocitos sin alterar el fenotipo celular. Favorecen la producción normal de colágeno II y agregan. Son biodegradables y biocompatibles. No necesitan tratamiento previo para su gelificación. Tienen una adecuada permeabilidad de moléculas pequeñas.	La producción de los componentes de la matriz es más lenta que con otros materiales.
Compuestos derivados de la matriz extracelular	Permiten la inmovilización de las moléculas de agua dentro del tejido. Ayudan a la movilidad y la diferenciación de los condrocitos. Permiten expresión de marcadores de diferenciación condrogénica. Tienen potencial para liberación de condrocitos en el tratamiento de defectos de cartílago. Contribuyen a una adecuada remodelación del tejido.	Algunos compuestos promueven la formación de fibrocartílago en lugar de cartílago hialino, lo que hace que las propiedades mecánicas de este sustituto sean inferiores a las de otros.



Tabla 3. Biomateriales portadores utilizados para el cultivo de cartílago. (Athanasiou *et al.*, 1996; Dahlberg y Kreicbergs, 1991; Freed *et al.*, 1994b; Gristina, 1987; Gurevitch *et al.*, 2003; Katoh y Urist, 1993; Marijnissen *et al.*, 2002; Rotter *et al.*, 1997; Verwoerd-Verhoef *et al.*, 1998)

Material	Ventajas	Desventajas
Matriz de hueso desmineralizada	Material natural inerte. Posee características inductivas y conductivas apropiadas para hueso y cartílago. Es una fuente natural de factores condrogénicos. Estimula la reparación osteogénica en fracturas y defectos segmentales. Es un material biodegradable compuesto por colágeno tipo I.	El tamaño de sus poros varía dentro de un rango muy alto. Puede transmitir agentes infecciosos. Puede inducir el deterioro de las propiedades mecánicas del tejido resultante.
Ácido poliláctico/ poliglicólico	Material sintético biodegradable. La degradación del biomaterial se da por hidrólisis. Permite la homogeneidad del tejido. Promueve la expresión de colágeno tipo II.	Las propiedades mecánicas varían de manera negativa, de conformidad con las modificaciones químicas que se les realicen.

BIBLIOGRAFÍA

- Almqvist K. F., Wang L., Wang J., Baeten D., Cornelissen M., Verdonk R., Veys E. M. and Verbruggen G. Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: Characteristics of the cells over a period of eight weeks. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2001, 60: 781-790.
- Ameer G., Mahmood T. A. and Langer R. A biodegradable composite scaffold for cell transplantation. *Journal of Orthopaedic Research* 2002, 20: 16-19.
- Atala A., Cima L. G., Kim W., Paige K. T., Vacanti J., Retik A. B. and Vacanti C. Injectable alginate seeded with chondrocytes as a potencial treatment for vesicoureteral reflux. *J Urol* 1993, 150: 745-747.
- Atala A., Kim W., Paige K. T., Vacanti C. A., Retik A. B. and Vacanti C. Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* 1994, 152: 641-643.
- Athanasiou K. A., Niederauer G. G. and Agrawal C. M. Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical application of polylactic acid/polyglycolic acid copolymers. *Biomaterials* 1996, 17: 93-102.
- Au A., Polotsky A., Krzyminski K., Gutowska A., Hungerford D. S. and Frondoza C. G. Evaluation of thermoreversible polymers containing fibroblast growth factor 9 (FGF-9) for chondrocyte culture. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* 2004, 367-372.
- Awad H. A., Wickham M. Q., Leddy H. A., Gimble J. M. and Guilak F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004, 25: 3211-3222.
- Aydelotte M. B., Schumacher B. L. and Kuettner K. E. Heterogeneity of articular chondrocytes. articular cartilage and osteoarthritis. (K. E. Kuettner, R. Schleyerbach, J. G. Peyron and V. C. Hascall eds.). New York: Raven Press, 1992; 237-249.
- Ballock R. T., Heydemann A. and Wakefield L. M. TGF-beta1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: Regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Developmental Biology*, 1993, 158: 414-429.
- Benya P. D. and Shaffer J. D. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982, 30: 215-224.
- Beris A., Lykissas M, Papageorgiou C. Georgoulis A. Advances in articular cartilage repair. *Injury, Int. J. Care Injured*, 2005, 36S, S14-S23.
- Bonaventure J., Kadhom N., Cohen-Solal L., Ng K. H., Lasselin C. and Freisinger P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994, 212: 97-104.

- Breinan H. A., Hsu H. P. and Spector M. Chondral defects in animal models: Effects of selected repair procedures in canines. *Clin Orthop Relat Res*, 2001, 391S: 219-230.
- Bryant S. J. and Anseth K. S. The effects of scaffolds thickness on tissue engineered cartilage in photocrosslinked poly (ethylene oxide) hydrogels. *Biomaterials* 2001, 22: 619-626.
- Buckwalter J. A. Articular cartilage: Injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998, 28(4): 192-202.
- Bulpitt P. and Aeschlimann D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1999, 152-169.
- Butler D. L., Goldstein S. A and Guilak F. Functional tissue engineering: the role of biomechanics. *J Biomech Eng* 2000, 122: 570-575.
- Cao Y., Rodriguez A., Vacanti M, Ibarra C., Arevalo C. and Vacanti CA. Comparative study of the use of poly(glicolic acid), calcium alginate and pluronics in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym* 1998, 9: 474-487.
- Chen G., Liu D., Tadokoro M., Hirochika R., Ohgushi H., Tanaka J. and Tateishi T. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells cultured in a cobweb-like biodegradable scaffold. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 322, 50-55.
- Cho J. H., Kim S. J., Park K. D., Jung M. C., Yang M. I., Han S. W., Noh J. Y. and Lee J. W. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer. *Biomaterials* 2004, 25: 5743-5751.
- Chubinskaya S., Huch K., Schulze M., Otten L., Aydelotte M. B. and Cole A. A. Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *J Histochem Cytochem* 2001, 49(10): 1211-1219.
- Dahlberg L. and Kreicbergs A. Demineralized allogeneic bone matrix for cartilage repair. *J Orthop Res* 1991, 9: 11-19.
- De Bari F., Dell'Accio F. and Tylzanowski P. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 2001, 44(8): 1928-1942.
- De la Fuente R., Abad J. L., García-Castro J., Fernández-Miguel G., Petriz J., Rubio D., Vicario-Abejón C., Guillén P., Gonzalez M. A. and Bernad A. Dedifferentiated adult articular chondrocytes: A population of human multipotent primitive cells. *Experimental Cell Research* 2004, 297: 313-328.
- De Haart M, Marijnissen W. J. and Van Osch G. J. Optimization of chondrocyte expansion in culture. Effect of TGF beta-2, bFGF and L-ascorbic acid on bovine articular chondrocytes. *Acta Orthop Scand* 1999, 70(1): 55-61.
- Elisseeff J., Anseth K., Sims D., McIntosh W., Randolph M. and Langer L. Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc Natl Acad Sci* 1999, 96: 3104-3107.
- Enomoto-Iwamoto M., Iwamoto M. and Mukudai Y. Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J Cell Biol* 1998, 140: 409-418.
- Evans C. H. and Georgescu H. I. Observations on the senescence of cells derived from articular cartilage. *Mech Ageing Dev* 1983, 22(2): 179-191.
- Fankhauser D. B. Cartilage histology lab. *Anatomy and physiology* 201. University of Cincinnati Clermont College, Batavia. 2004. Consultado en línea en: http://biology.clc.uc.edu/fankhauser/Labs/Anatomy_&Physiology/A&P201/Connective_Tissues/Cartilage.htm. Marzo 2005.
- Fragonas E., Valente M., Pozzi-Mucelli M., Toffanin R., Rizzo R., Silvestri F. and Vittur F. Articular cartilage repair in rabbits by using suspensions of allogenic chondrocytes in alginate. *Biomaterials*, 2000, 21:795-801.
- Freed L. E., Marquis J. C., Nohria A., Emmanuel J., Mikos A. G. and Langer R. Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers. *J Biomed Mater Res* 1993, 27: 11-23.
- Freed L. E., Marquis J. C. and Vunjak-Novakovic G. Composition of cell-polymer cartilage implants. *Biotechnol Bioeng* 1994, 43: 605-614.
- Freed L. E., Vunjak-Novakovic G., Biron R. J., Eagles D., Lesnoy D., Barlow S. and Langer R. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Biotechnology* 1994, 12: 689-693.
- Furukawa T, Eyre D. R., Koide S. and Glimcher M. J. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1980, 62: 79-89.
- Gaissmaier C., Fritz J., Krackhardt T., Flesch I., Aicher W. K. and Ashammakhi N. Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer culture



- and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials* 2005, 26: 1953-1960.
- Giroto D., Urbani S., Brun P., Renier D., Barbucci R. and Abatangelo G. Tissue specific gene expression in chondrocytes grown on three-dimensional hyaluronic acid scaffolds. *Biomaterials* 2003, 24: 3265-3275.
- Cristina A. G. Biomaterials-centered infection: Microbial adhesion versus tissue integration. *Science* 1987, 237: 1588-1595.
- Grunder T., Gaissmaier C., Fritz J., Stoop R., Hortschansky P., Mollenhauer J. and Aicher W. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads. *OsteoArthritis and Cartilage* 2004, 12: 559-567.
- Guilak F, Butler D. L. and Goldstein S. A. Functional tissue engineering: The role of biomechanics in articular cartilage repair. *Clin Orthop* 2001, 391: S295-S305.
- Gurevitch O., Kurkalli B. G. S., Prigozhina T, Kasir J., Gaft A. and Slavin S. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem Cells* 2003, 21: 588-597.
- Gutowska A., Jasionowski M., Morris J. E., Christler W. B., Yuehuei A. and Mironov V. Polymer formulations for cartilage repair. En: *Proceedings of the 27th Annual Meeting Transactions Society for Biomaterials*. Minneapolis: Society for Biomaterials, 2001, 566.
- Hall A. C., Horwitz E. R. and Wilkins R. J. The cellular physiology of articular cartilage. *Exp Physiol* 1996; 81: 535-545.
- Handley C. J., Brooks P. and Lowther D. A. Suppression of collagen synthesis by chondrocytes by exogenous concentrations of proteoglycan subunit. *Biochem Int* 1980, 1: 270-276.
- Häuselmann H. J., Fernandes R. J., Mok S. S., Schmid T. M., Block J. A., Aydelotte M. B., Kuettner K. E. and Thonar E. J. M. A. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 1994, 107:17-27.
- Herr G., Hartwig C. H. and Boll C. Ectopic bone formation by composites of BMP and metal implants in rats. *Acta Orthop Scand* 1996, 67(6): 606-610.
- Ignatz R. A. and Massague J. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1986, 261: 4337-4345.
- Iwasaki M., Le A. X. and Helms J. A. Expression of indian hedgehog, bone morphogenetic protein 6 and gli during skeletal morphogenesis. *Mech Dev* 1997, 69: 197-202.
- Kafienah W., Jacob M. and Demarteau O. Three-dimensional tissue engineering of hyaline cartilage: Comparison of adult nasal a and articular chondrocytes. *Tissue Eng* 2002, 8(5): 817-26.
- Kato Y., Iwamoto M. and Koike T. Fibroblast growth factor stimulates colony formation of differentiated chondrocytes in soft agar. *J Cell Physiol* 1987, 133:491-498.
- Katoh R. and Urist M. R. Surface adhesion and attachment factor in bone morphogenetic protein-induced chondrogenesis *in vitro*. *Clin Orthop* 1993, 295-304.
- Kawamura S., Wakitani S., Kimura T., Maeda A., Caplan A. I. and Shino K. Articular cartilage repair. Rabbit experiment with a collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand* 1998, 69: 56-62.
- Kawasaki K., Aihara M. and Honmo J. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle, and skin. *Bone* 1998, 23(3): 223-31.
- Langer R. and Vacanti J. *Tissue Engineering*. Science, New Series 1993, 260, 5110, 920-926.
- Leboy P. S., Sullivan T. A. and Nooreyazdan M. Rapid chondrocyte maturation by serum-free culture with BMP-2 and ascorbic acid. *J Cell Biochem* 1997, 66(3):394-403.
- Lee C. R., Grodzinsky A. J. and Hsu H. P. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *J Orthop Res* 2000, 18(5): 790-799.
- Lee C. R., Grodzinsky A. J., Hsu H. P. and Spector M. Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model. *J Orthop Res* 2003, 21: 272-281.
- Lindahl A., Nilsson A. and Isaksson O. G. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on colony formation of rabbit epiphyseal chondrocytes at different stages of maturation. *J Endocrinol* 1987, 115: 263-271.
- Liu H., Lee Y. M. and Dean M.F. Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads. *Biochim Biophys Acta* 1998, 1425: 505-515.
- Livne E. *In vitro* response of articular cartilage from mature mice to human transforming growth factor- β . *Acta Anat Basel* 1994, 149: 185-194.

- Loeser R. F., Pacione C. A. and Chubinskaya S. The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis & Rheumatism* 2003 48 (8): 2188-2196.
- Mankin H. J. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (First part). *N Engl J Med* 1974, 291(25): 1285-1292.
- Mankin H.J. The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis (Second part). *N Engl J Med* 1974, 291(25): 1335-1340.
- Marijnissen W. J. C. M., van Osch G. J. V. M, Aigner J., Verwoerd-Verhoef H. L. and Verhaar J. A. N. Tissue engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes in alginate, combined *in vivo* with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials* 2000, 21: 571-580.
- Marijnissen W. J. C. M., van Osch G. J. V. M., Aigner J., van der Veen S. W., Hollander A. P., Verwoerd-Verhoef H. L. and Verhaar J. A. N. Alginate as a chondrocyte-delivery substance in combination with a non-woven scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2002, 23 1511-1517.
- Martin I., Wendt D. and Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotech* 2004, 22(2): 80-86.
- Martin I., Schaefer D. and Dozin B. Repair of osteochondral lesions. 2000-2005. Landes Bioscience. Consultado en línea en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=eurekah>. Marzo 2005.
- Masuda K, Sah R. L., Hejna M. J. and Thonar E. J. M. A. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: The alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *J Orthop Res* 2003, 21:139-148.
- Mauck R. L., Seyhan S. L., Ateshian G. A. and Hung C. T. Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Ann Biomed Eng* 2002, 30: 1046-1056.
- McQuillan D. J., Handley C. J. and Campbell M. A. Stimulation of proteoglycan biosynthesis by serum and insulin-like growth factor-I in cultured bovine articular cartilage. *J Biochem* 1986, 240: 423-430.
- Murphy C. L. and Sambanis A. Effect of oxygen tension and alginate encapsulation on restoration of the differentiated phenotype of passaged chondrocytes. *Tiss Eng* 2001, 7(6): 791-803.
- Ng L. J., Tam P. P. L. and Cheah K. S. E. Preferential expression of alternatively spliced mRNAs encoding type II procollagen with a cysteine-rich amino-propeptide in differentiating cartilage nonchondrogenic tissues during early mouse development. *Dev Biol* 1993, 159: 403-417.
- Nugent M. A. and Edelman E. R. Transforming growth factor beta 1 stimulates the production of basic fibroblast growth factor binding proteoglycans in Balb/c3T3 cells. *J Biol Chem* 1992, 267: 21256-21264.
- Osborn K. D., Trippel S. B. and Mankin H. J. Growth factor stimulation of adult human articular cartilage. *J Orthop Res* 1989, 7: 35-42.
- Paige K. T., Cima L. G., Yaremchuk M. J., Vacanti J. P. and Vacanti C. A. Injectable cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1995, 96: 1399-1400.
- Paige K. T., Cima L. G., Yaremchuk M. J., Schloo B. L., Vacanti J. P. and Vacanti C. A. De novo cartilage generation using calcium alginate-chondrocyte constructs. *Plast Reconstr Surg* 1996, 97, 168-178.
- Pittenger M. F., Mackay A. M., Beck S. C., Jaiswal R. K., Douglas R., Mosca J. D., Moorman M. A., Simonetti D. W., Craig S. and Marshak D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 1999, 284, 5411, 143-147.
- Prins A. P., Lipman J. M. and McDevitt C. A. Effect of purified growth factors on rabbit articular chondrocytes in monolayer culture. II. Sulfated proteoglycan synthesis. *Arthritis Rheum* 1982, 25: 1228-38.
- Risbud M., Ringe J., Bhonde R. and Sittinger M. In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: Implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplantation*, 2001, 10, 755-763.
- Rotter N., Sittinger M., Hammer C., Bujia J. and Kastenbauer E. Transplantation of *in vitro* cultured cartilage materials: Characterization of matrix synthesis. *Laryngorhinootologie* 1997, 76: 241-247.
- Rowley J. A., Mablambayan G. and Mooney D. J. Alginate hydrogels as synthetic extracellular matrix materials. *Biomaterials* 1999, 20: 45-53.
- Saas J., Lindauer K., Bau B., Takigawa M. and Aigner T. Molecular phenotyping of HCS-2/8 cells as an *in vitro* model of human chondrocytes. *OsteoArthritis and Cartilage* 2004 12: 924-934
- Sandell L.J., Morris N., Robbins J. R. and Goldring M. B. Alternatively spliced type II procollagen mRNAs defined distinct populations of cells during vertebral development: differential expression of the amino-propeptide. *J Cell Biol* 1991, 114: 1307-1319.



- Schnabel M., Marlovits S., Eckhoff G., Fichtel I., Gotzen L., Vécsei V. and Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002, 10: 62-70.
- Schneider N., Lejeune J. P., Deby C., Deby-Dupont G. P. and Serteyn D. Viability of equine articular chondrocytes in alginate beads exposed to different oxygen tensions. *Vet J* 2004, 168: 167-173.
- Schuler F., Georgescu H., Niyibizi C. and Studer R. Increased matrix synthesis following adenoviral transfer of a transforming growth factor B1 gene into articular chondrocytes. *Journal of Orthopaedic Research* 2000, 18: 585.
- Silverman R. P., Passaretti D., Huang W, Randolph M. A. and Yaremchuk M. J. Injectable tissue-engineered cartilage using a fibrin glue polymer. *Plast Reconstr Surg* 1999, 103: 1809-1818.
- Sims C. D., Butler P. E., Cao Y. L., Casanova R., Randolph M. A., Black A., Vacanti C. A. and Yaremchuk M. J. Tissue engineered neocartilage using plasma derived polymer substrates and chondrocytes. *Plast Reconstr Surg* 1998, 101: 1580-1585.
- Takigawa M., Shirai E., Fukuo K., Tajima K., Mori Y. and Suzuki F. Chondrocytes differentiated by serial monolayer culture form cartilage nodules in nude mice. *Bone Miner* 1987, 2: 449-462.
- Temenoff J. and Mikos A. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage *Biomaterials* 2000, 21, 431-440.
- Toegel S., Huang W., Piana C., Unger F., Wirth M., Goldring M., Gabor F. and Viernstein H. Selection of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action. *BMC Molecular Biology* 2007, 8:13.
- Trippel S. B. Growth factor actions on articular cartilage. *J Rheumatol* 1995, 43: S129-S132.
- Valcourt U., Ronziere M. C. and Winkler P. Different effects of bone morphogenetic proteins 2, 4, 12, and 13 on the expression of cartilage and bone markers in the MC615 chondrocyte cell line. *Exp Cell Res* 1999, 251: 264-274.
- Verwoerd-Verhoef H. L., Bean J. K., van Osch G. J. V. M., ten Koppel P. G. J., Meeuwis J. A. and Verwoerd C. D. A. Induction *in vivo* of cartilage grafts for craniofacial reconstruction. *Am J Rhinol* 1998, 12: 27-31.
- Zaucke F., Dinser R., Maurer P. and Paulsson M. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. *J Biochem* 2001, 358: 17-24.