

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EFFECTO DE LOS COMPUESTOS OSTEODEX Y CATDEX EN EL
CULTIVO PRIMARIO DE CONDROCITOS DE CARTÍLAGO
HUMANO. ESTUDIO IN VITRO COMPARATIVO**

POR

DR. RODRIGO GONZÁLEZ CANDELARIA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN TRAUMATOLOGÍA Y ORTOPEDIA**

AGOSTO 2022

EFFECTO DE LOS COMPUESTOS OSTEODEX Y CATDEX EN EL CULTIVO
PRIMARIO DE CONDRÓCITOS DE CARTÍLAGO HUMANO. ESTUDIO IN VITRO
COMPARATIVO

Aprobación de tesis:



Dr. C. Mario Alberto Simental Mendía
Director de la Tesis



Dr. Med. Víctor Manuel Peña Martínez
Director del Servicio o Departamento



Dr. Med. Santiago de la Garza Castro
Coordinador de Enseñanza



Dr. Med. Carlos Alberto Acosta Olivo
Coordinador de Investigación



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A mis padres, Martha Hilda Candelaria Villarreal y Ricardo González Salinas.

A mis tíos, José Narciso Candelaria Villarreal y Mayela Gerardina Candelaria Villarreal.

A mi novia, Laura Marcela González Villarreal.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer instancia al Dr. C. Mario Alberto Simental Mendía por sus conocimientos y apoyo en el desarrollo de este trabajo de tesis.

Mi agradecimiento también va dirigido hacia mi alma máter, el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González y el Servicio de Ortopedia y Traumatología, por el honor de pertenecer y cursar mi adiestramiento durante estos 4 años.

Por último, quiero agradecer a mi familia, mis amigos, mis compañeros de generación y mi novia por su apoyo 24/7 durante estos 4 años en los que se presentaron múltiples desafíos y situaciones en los que tuve que elegir el trabajo por encima de compromisos.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
LISTADO DE ABREVIATURAS	9
CAPÍTULO I	10
1. RESUMEN.....	10
CAPÍTULO II	12
2. INTRODUCCIÓN.....	12
2.1 Definición.....	12
2.2 Epidemiología	12
2.3 Patofisiología.....	13
2.4 Diagnostico.....	14
2.5 Tratamiento	16
2.6 Lesiones condrales y uso de ingeniería tisular.....	17
2.7 Características del cultivo de condrocitos articulares.....	18
2.7.1 Uso de suero bovino fetal y suero autólogo	19
2.7.2 Medios libres de suero enriquecidos con factores de crecimiento	20
2.7.3 Limitaciones de los medios libres de suero.....	21
2.7.4 Compuestos OsteoDex y CatDex	21
CAPÍTULO III	23
3. HIPÓTESIS	23
CAPÍTULO IV.....	24
4. OBJETIVOS	24
4.1 Objetivo General.....	24
4.2 Objetivos Específicos	24
CAPÍTULO V.....	25
5. MATERIAL Y MÉTODOS	25
5.1 Diseño del estudio	25

5.2	Método de reclutamiento	25
5.3	Obtención y cultivo de los condrocitos	26
5.4	Establecimiento de los grupos experimentales	27
5.5	Proliferación celular.....	27
5.6	Migración celular	28
5.8	Cálculo y Tamaño de la Muestra.....	29
5.9	Análisis estadístico.....	29
	CAPÍTULO VI.....	30
6.	RESULTADOS.....	30
6.1	Características de las muestras obtenidas de donadores.....	30
6.2	Determinación del medio de cultivo control.....	30
6.3	Ensayo de viabilidad con los compuestos ODX y CatDex	31
6.4	Ensayo de migración con los compuestos ODX y CatDex.....	34
	CAPÍTULO VII.....	40
7.	DISCUSIÓN.....	40
	CAPÍTULO VIII.....	44
8.	CONCLUSIÓN	44
	CAPÍTULO IX.....	45
9.	LIMITACIONES.....	45
	REFERENCIAS.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Valores de luminiscencia para las diferentes concentraciones de ODX.	
.....		34
Tabla 2.	Valores de luminiscencia para las diferentes concentraciones de CatDex.	
.....		34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gonartrosis.....	14
Figura 2. Lesión del cartílago patelar.....	15
Figura 3. Viabilidad Celular de Opti-MEM, D MEM/F12 y PBS.....	32
Figura 4. Viabilidad celular de CatDex y ODX.....	33
Figura 5. Ensayo de migración celular con CatDex.....	36
Figura 6. Representación gráfica del análisis de migración con ODX (porcentaje de área medida desprovista de condrocitos)	37
Figura 7. Ensayo de migración celular con CatDex.	38
Figura 8. Representación gráfica del análisis de migración con CatDex (porcentaje de área medida desprovista de condrocitos).	39

LISTADO DE ABREVIATURAS

FGF-2: Factor de crecimiento de fibroblastos-2

IGF-1: Factor de crecimiento dependiente de insulina

PDGF-bb: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PRP: Plasma rico en plaquetas

ODX: Osteodex

Catdex: Dextrano catiónico

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

Opti-MEM: Medio esencial mínimo

SBF: Suero bovino fetal

URL: Unidades relativas de luminiscencia

PTOA: Osteoartritis postraumática

OA: Osteoartritis

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

FVS: Fracción vascular estromal

ICA: Implantación de condrocitos autólogos

PBS: Tampón fosfato salino

CAPÍTULO I

1. RESUMEN

Introducción: Las lesiones de cartílago articular tienen una alta prevalencia de progresión a patologías degenerativas, produciendo distintos grados de incapacidad dependiendo del grado de profundidad de la lesión. Su tratamiento implica un gran desafío por la complejidad del ambiente de las articulaciones. Actualmente se busca imitar este ambiente haciendo uso de distintos tipos de cultivos celulares, por lo que en este estudio se plantea evaluar la eficacia de los compuestos Osteodex (ODX) y CatDex como suplemento para el medio de cultivo en condrocitos humanos.

Material y métodos: Se emplearon cultivos primarios de condrocitos humanos procedentes de muestras de cartílago articular de características osteocondrales. Se establecieron 5 grupos de tratamiento por cada molécula a analizar (CatDex u ODX): un grupo control tratado únicamente con medio basal y 4 grupos de tratamiento con diferentes concentraciones de las moléculas, con medio de cultivo sin SBF. La proliferación de los condrocitos cultivados bajo las distintas condiciones anteriormente señaladas fue evaluada por medio de un ensayo colorimétrico a través de la reducción de la sal de tetrazolio MTT. La migración celular se evaluó utilizando la técnica “*wound healing assay*”.

Resultados: Los valores obtenidos de viabilidad celular para ODX arrojaron una diferencia no significativa, no así para CatDex, ODX mostró ser superior al control,

y no así CatDex. En comparación con el área desprovista de condrocitos medida para ODX, los valores obtenidos para CatDex fueron mayores lo que implica una menor migración celular, de las 0 h y a las 48 h hubo una diferencia del 5.5% en 1.0 μM , seguido por el grupo 0.25 μM con una diferencia de 7.5% y el grupo que presentó menor diferencia fue el de 0.5 μM con 4%, por lo tanto, hubo mayor migración en el grupo 0.25 μM .

Conclusión: Se sugiere superioridad de ODX sobre CatDex para inducir migración celular de condrocitos. En las pruebas de viabilidad celular ODX también fue superior.

CAPÍTULO II

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Definición

La lesión del cartílago articular es el daño a la estructura del cartílago ubicado en los extremos de los huesos que forman las articulaciones sinoviales, el cual dependiendo de la gravedad estimulará una respuesta distinta, pudiendo generar: daño celular y de la matriz extracelular, alteración visible limitada o visible en el cartílago articular y hueso subcondral (Buckwalter et al., 2004).

2.2 Epidemiología

En un estudio llevado a cabo en Polonia en donde se realizaron 25,124 artroscopias de rodilla se encontraron lesiones del cartílago articular en el 60%, de las cuales 29% eran por OA (Widuchowski et al., 2007). En otro estudio retrospectivo donde se realizaron 31,000 artroscopias, se encontró una incidencia del 63% de lesiones en el cartílago articular (Bhosale et al., 2008).

Las lesiones se encuentran con mayor frecuencia en el cóndilo femoral (43-58 %), y la mayoría de ellas se ubican en el cóndilo medial (Merkely et al., 2018).

La osteoartrosis (OA) afecta a 27 millones de estadounidenses (Tuan et al., 2013).

Existe un riesgo del 75% de OA postraumática (PTOA) después de una lesión articular. La PTOA es responsable del 12% de la OA en la población de Estados Unidos (Schenker et al., 2014).

La artrosis es una de las causas más incapacitantes a nivel mundial, en 2008 aproximadamente 30 millones presentaban la enfermedad y se espera que este número incremente a 60 millones en Estados Unidos (Tatman et al., 2015).

2.3 Patofisiología

En la clínica se observan lesiones traumáticas, que pueden llegar o no a dañar la médula ósea. En aquellas en las que aún se mantiene preservada la función de sintetizar matriz extracelular la reparación es viable, lo cual es distinto cuando existe involucro de la médula ósea. Al estar la médula comprometida la respuesta del tejido no logra imitar la matriz extracelular, existiendo mayor cantidad de colágeno 1 no adecuado para llevar a cabo apropiadamente funciones biomecánicas (Carballo et al., 2017).

Las lesiones del cartílago articular son complejas y difíciles de reparar debido principalmente a la escasa capacidad de este tejido para auto regenerarse, produciéndose un tejido cicatricial con características histológicas y biomecánicas inferiores al cartílago original (Carballo et al., 2017). Esto puede llevar a que la articulación presente cambios degenerativos como osteoartrosis de forma temprana (Insall, 2018). En la OA existe un daño por desgaste en el cartílago articular,

condrocitos hipertróficos, al igual que engrosamiento de la membrana sinovial, remodelación del hueso subcondral e inflamación crónica (Li et al., 2017).

2.4 Diagnóstico

La resonancia magnética es la modalidad de elección para obtener imágenes del cartílago y es valiosa para diagnosticar con precisión la lesión del cartílago sin proceder a la artroscopia. La resonancia magnética se utiliza para evaluar la morfología, cambios en el cartílago articular, como heterogeneidad de la señal, fisuras o pérdida de cartílago. La evaluación del hueso subcondral también es posible con resonancia magnética (Merkely et al., 2018).

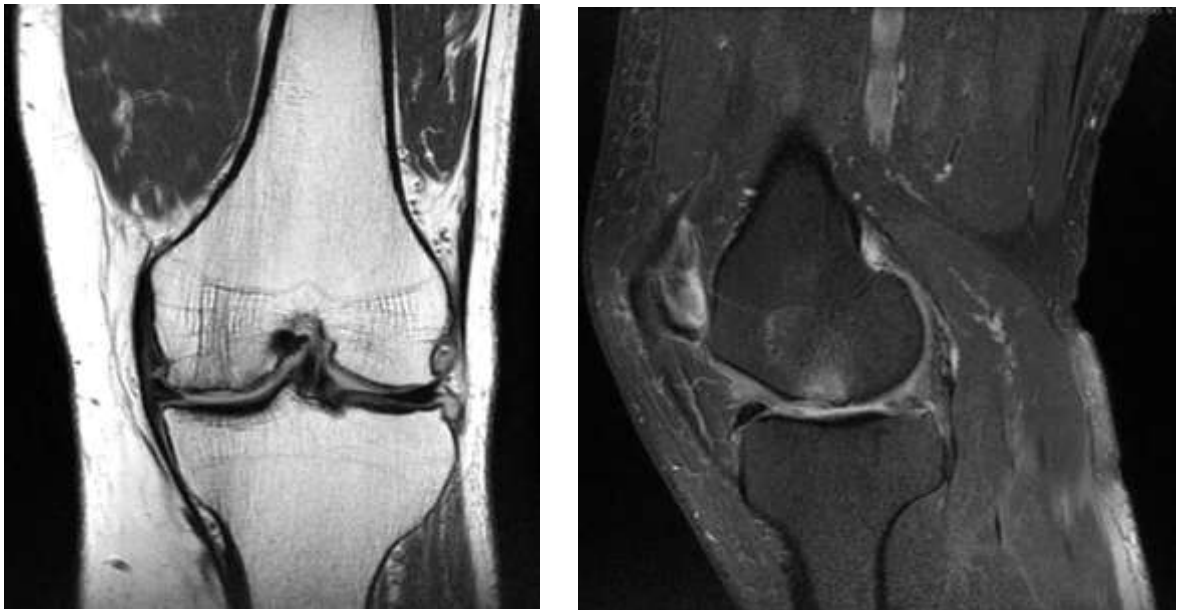


Figura 1. Masculino de 61 años con diagnóstico de gonartrosis primaria. Se observa

los datos de osteoartrosis del cóndilo medial tanto en el corte coronal como sagital.

En la figura 1 se observa un ejemplo de resonancia magnética simple de un paciente de 61 años con diagnóstico de gonartrosis primaria de lado izquierdo en el que se muestra pérdida de la integridad del cartílago del cóndilo medial, por otro lado, en la figura 2 se aprecia una rodilla derecha por el mismo método de imagen con un ejemplo de lesión del cartílago patelar secundario a luxación recidivante de rótula en un masculino de 21 años.

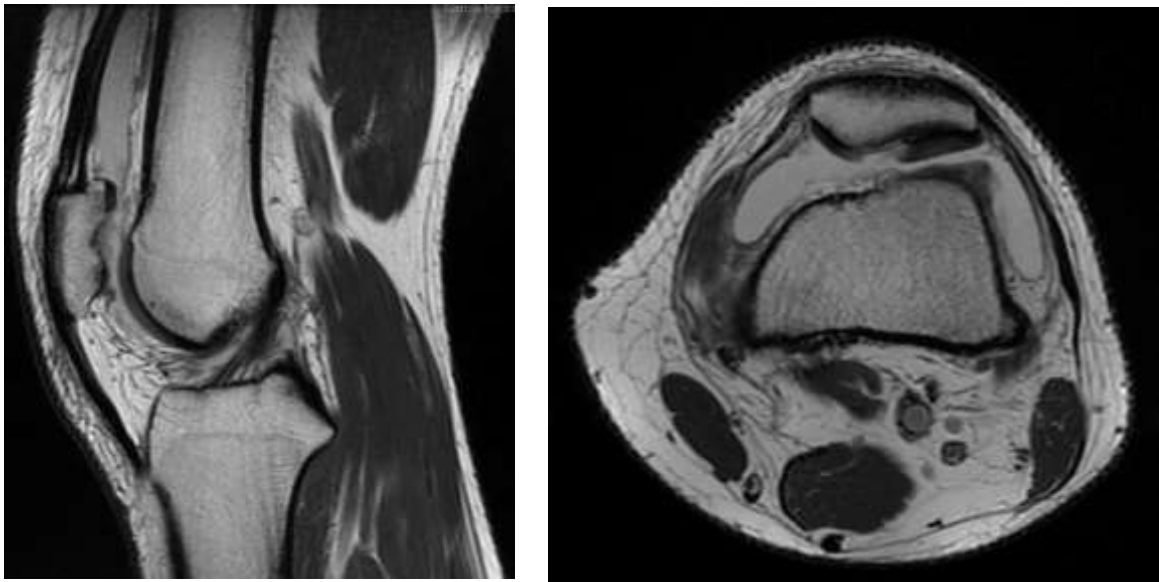


Figura 2. Masculino de 21 años con antecedente de 3 luxaciones previas de rótula izquierda, en la imagen de la izquierda se evidencia lesión del cartílago patelar. En el lado derecho se muestra un corte axial de la lesión condral patelar.

La evaluación artroscópica es una herramienta valiosa no solo para evaluar la

articulación (defecto de cartílago, menisco, ligamentos cruzados, membrana sinovial), pero también permite una intervención inmediata en el punto de atención. (Merkely et al., 2018).

2.5 Tratamiento

Existen diferentes técnicas de reparación como microfracturas, nanofracturas, mosaicoplastia, trasplante de aloinjerto osteocondral e implantación de condrocitos autólogos (ICA) (Vilchez et al., 2009).

Las terapias no quirúrgicas se usan para controlar los síntomas, la discapacidad y retardar la progresión de los cambios degenerativos asociados con la rotura del cartílago articular. Las técnicas clínicas más utilizadas para los defectos del cartílago son desbridamiento artroscópico y reparación por estimulación de la médula, trasplante directo de células o tejido en un defecto de cartílago y/o reemplazo del defecto con andamios/sustitutos biológicos o sintéticos. (Simon et al., 2018).

Los polímeros y el metal se pueden usar para: evitar fricción articular, restablecer las propiedades viscoelásticas y lubricantes locales, simular las propiedades físicas y mecánicas, estabilizar los cambios degenerativos, eliminar crepitación, evitar contacto hueso con hueso y actúa como una capa libre de dolor. (Simon et al., 2018).

2.6 Lesiones condrales y uso de ingeniería tisular

Recientemente surgió la ingeniería de tejidos en la que científicos, ingenieros y médicos aplican herramientas de una variedad de campos para construir sustitutos biológicos que pueden imitar tejidos con fines de diagnóstico e investigación y pueden reemplazar tejidos patológicos y lesionados (Berthiaume et al., 2011).

El papel de las fuerzas mecánicas durante la morfogénesis y el patrón tisular está bien establecido, y las cuestiones físicas ahora se consideran tan importantes como los factores químicos en las diferentes etapas del desarrollo de los tejidos (Armiento et al., 2018).

La implantación de condrocitos autólogos es una técnica que implica la expansión *in vitro* (por eso se cataloga como ingeniería de tejidos) y la reimplantación *in vivo* de condrocitos autólogos (Marlovits et al., 2006). Para llevar a cabo la ICA se realiza una artroscopia diagnóstica y toma del cartílago, posteriormente se cultivan durante 6 semanas para su propagación. Lo siguiente es la cirugía de implantación, donde se produce un desbridamiento del tamaño del defecto del cartílago, después se realiza recolección de la solapa del periostio y fijación de la aleta e inyección de las células cultivadas, esto antes del cierre de la última sutura (Mata et al., 2015).

El ICA es una técnica que está indicada para la reparación de defectos del cartílago sintomáticos del fémur distal en pacientes que han tenido una respuesta inadecuada a una artroscopia previa o procedimiento de reparación quirúrgica (Mata et al., 2015).

En el estudio IMPACT (Instant Mesenchymal Stromal Cells Product accompanying Autologous Chondron Transplantation) se usó adhesivo de fibrina gelificante in situ que contenía condrocitos autólogos. Se realizó el llenado completo del defecto y la integración con el tejido circundante observado con resonancia magnética a los 12 meses después de la cirugía, además en la segunda artroscopia y a la evaluación histológica se encontró formación de tejido de tipo hialino en el sitio del defecto (Armiento et al., 2017).

2.7 Características del cultivo de condrocitos articulares

Los cultivos celulares han sido de utilidad para estudiar la diferenciación y activación de condrocitos, y en vía de obtener mejores resultados se han utilizado matrices artificiales con alginato, colágenos o agarosa. Sin embargo, extraer las células de la matriz implica un desafío, otro de los problemas observados ha sido la tendencia de estas células de diferenciarse a fibroblastos (Gosset et al., 2008).

Lo primero es obtener las células, esto se hace mediante una biopsia de cartílago que se transporta en tampón fosfato salino (PBS) y se suplementa con antibióticos que previenen el crecimiento bacteriano. Para liberarlos de su matriz se agregan colagenasas (se puede reforzar con agitación) y para eliminar fibroblastos se usa tripsina al 0.25%, también se suplementa con suero bovino fetal (SBF). Después se pasa por un filtro de nylon (Gosset et al., 2008).

Existen los cultivos bidimensionales (2D) y los tridimensionales (3D), a diferencia de

los primeros, los 3D favorecen el fenotipo (rediferenciación). El 2D se realiza sembrando las células en placas normalmente usando medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de SBF con antibióticos. Se mantienen en una atmósfera controlada con un 5% de CO₂ y una humedad relativa del 100%. Alcanzándose 80-90% de confluencia, se lavan con PBS y se tratan con tripsina 0.25% en PBS durante 5 minutos a 37°C, después se despegan de la superficie, facilitando su resuspensión en medio de cultivo fresco y posterior fragmentación en subcultivos a menor densidad. Esto hasta obtener un número adecuado de condrocitos para la implantación (Caron et al., 2012).

Los cultivos en 3D son llevados a cabo con las células embebidas alguna matriz o andamio como: agarosa, adhesivo de fibrina, perlas de alginato, geles de polímeros sintéticos o comprimiendo en gránulos por centrifugación (Caron et al., 2012).

Actualmente, se han probado distintas formas de mejorar los cultivos celulares. Un estudio desarrollado en la Universidad de Pittsburgh utilizó co-cultivos para evaluar el potencial regenerativo de las preparaciones derivadas de tejido adiposo, concluyendo que las preparaciones procesadas mecánicamente pueden ser más eficaces que aquellas con una preparación de fracción vascular estromal (FVS) (Kokai et al., 2022).

2.7.1 Uso de suero bovino fetal y suero autólogo

Las condiciones clásicas de cultivo de condrocitos requieren SBF como medio de

soporte, debido a que provee de factores de crecimiento, hormonas, proteínas de unión y transporte, factores de unión y propagación, aminoácidos adicionales, vitaminas y oligoelementos, ácidos grasos y lípidos, inhibidores de proteasa que son necesarios para el crecimiento y proliferación celular (Van der Valk et al., 2018).

Sin embargo, los condrocitos están privados de suero en condiciones naturales, manteniendo su homeostasis interna únicamente por medios autocrinos y paracrinos, por lo que exponerlos a este medio conduce a la producción de algunas respuestas no fisiológicas por parte del condrocito (Malpeli et al., 2004). Así mismo, su aplicación en humanos tiene un riesgo de respuesta inmunogénica contra las proteínas animales y transmisión de infecciones (prion or viral) (Shao et al., 2013).

Aunque la sustitución del suero animal con suero autólogo humano aborda estos problemas, el suero autólogo tiene un suministro limitado y debe cumplir con ciertas características, por lo que pudiera resultar inconveniente su uso en algunas ocasiones (Shao et al., 2013). Por lo anterior, la producción de cultivos de condrocitos libres de suero o enriquecidos con otros factores ha ganado interés entre la comunidad científica en la última década.

2.7.2 Medios libres de suero enriquecidos con factores de crecimiento

Previamente se han desarrollado otros medios de suplementación enriquecidos con factores de crecimiento para mejorar la calidad de la fase de expansión de los condrocitos en cultivo. El factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) (Mandl et

al., 2004), factor de crecimiento dependiente de insulina (IGF-1) (Sah et al., 1994; van Osch et al., 1998) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-bb) (Kamil et al., 2007; Schmidt et al., 2006) en combinación con un medio libre de suero han probado ser superiores al suero autólogo con respecto a la proliferación condral. Del mismo modo, estudios previos han demostrado que el uso de plasma rico en plaquetas (PRP) tiene un efecto positivo en cuanto a la proliferación y rediferenciación celular condral en estudios *ex vivo* (Jeyakumar et al., 2017).

2.7.3 Limitaciones de los medios libres de suero

Al eliminar el suero se demanda alto grado de pureza de los reactivos además de que existe una menor proliferación celular debido a que se enlentece el cultivo por la cadencia de factores proliferativos, también está el hecho de que no hay disponibilidad y son más caros (González et al., 2009).

2.7.4 Compuestos OsteoDex y CatDex

OsteoDex (ODX) es un novedoso polibifosfonato bifuncional citotóxico dirigido al tejido óseo, es decir, una construcción de polímero. El hecho de que sea un polímero facilita la posibilidad de incorporar múltiples cualidades deseadas. Ha mostrado superioridad al estándar de oro, el ácido zolendrónico respecto a actividad antitumoral y mineralización ósea en estudios preclínicos y en ensayos clínicos controlados fase 2A (Holmberg et al., 2010).

El ODX se ha utilizado con éxito para el manejo de metástasis óseas por carcinoma prostático avanzado, mostrando una buena tolerabilidad y poca toxicidad (Daubine et al., 2011; Thellenberg-Karlsson et al., 2016). No se ha utilizado previamente en células condrales, sin embargo, sabemos por estudios previos que los bifosfonatos no nitrogenados poseen propiedades que aumentan la síntesis de matriz extracelular condral, la síntesis de colágeno y el contenido de proteoglicanos (Le Goff et al., 2011; Saviola et al., 2012). Por lo anterior, hipotetizamos que este nuevo polibifosfonato posee propiedades inherentes que podrían resultar en un aumento de estas capacidades al exponerse en medio de cultivo para los condrocitos.

Por otra parte, CatDex es una construcción macromolecular polidispersa con un peso molecular de 55kD y una cadena principal de carbohidratos con múltiples grupos laterales de guanidina acoplados covalentemente que se distribuyen a lo largo de las cadenas de carbohidratos. Tiene una carga electrostática catiónica con un amplio rango de pH y es hidrofílica. CatDex ha demostrado una eficacia antitumoral potente en varias líneas celulares tumorales, especialmente de tumores de vejiga urinaria (Márquez et al., 2002; Márquez et al., 2004), así como actividad antimicrobiana (infecciones bajas del tracto urinario y como medicación oral antibacteriana) sin efectos significativos respecto a efectos adversos, citotoxicidad celular o alteración de la morfología celular (Escamilla-García et al., 2017) y actualmente se le están buscando otros posibles usos. Nunca se han expuesto previamente a células condrales, pero tanto ODX como CatDex ya se encuentran comercializados y distribuidos para su utilización.

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS

La utilización de los componentes Osteodex (ODX) y CatDex como suplemento para el medio de cultivo de condrocitos humanos es comparable con los métodos estándares de medios de cultivo suplementados con suero bovino fetal evaluado mediante pruebas de viabilidad y migración celulares.

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- Evaluar la eficacia de los compuestos Osteodex (ODX) y CatDex como suplemento para el medio de cultivo en condrocitos humanos.

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar la viabilidad celular mediante un ensayo de luminiscencia comparándolo con un grupo control a diferentes concentraciones de los compuestos.
- Evaluar la migración celular en un ensayo de cicatrización de heridas mediante depleción de una monocapa celular confluyente.

CAPÍTULO V

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Diseño del estudio

Es un estudio experimental, prospectivo y comparativo.

Respecto a las consideraciones éticas, el presente protocolo fue enviado para su autorización al Comité de Ética y Comité de Investigación de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL).

El estudio se realizó en el Servicio de Banco de Huesos y Tejidos (BHT) del Servicio de Ortopedia y Traumatología de la Facultad de Medicina y el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” de la UANL, Monterrey, Nuevo León, México.

5.2 Método de reclutamiento

Se obtuvieron muestras de cartílago articular a partir del material biológico de los aloinjertos estructurales de fémur distal y tibia proximal pertenecientes al BHT. Para el estudio se requirió la obtención de 9 aloinjertos de donadores para el posterior aislamiento y cultivo de condrocitos, cuyos criterios de inclusión fueron que provinieran de donadores sanos mayores de 40 años y de género indistinto. Se

excluyeron aquellos injertos de donadores que resultaran contaminados durante el proceso de procuración de los tejidos. Se eliminaron aquellas muestras que resultaran dañados durante la manipulación del injerto. No fue necesaria en ningún momento la identificación de los donadores de los aloinjertos. La base de datos generada en este estudio solo contiene el género y la edad del donador del que se obtuvo el aloinjerto y el resto de los parámetros celulares y de laboratorio.

5.3 Obtención y cultivo de los condrocitos

Se emplearon cultivos primarios de condrocitos humanos procedentes de muestras de cartílago articular de características osteocondrales. La obtención y el cultivo de los condrocitos se llevó a cabo mediante varios ciclos de digestiones enzimáticas. Se maceró el cartílago en pequeños trozos y se sometió a digestión enzimática, empleando tripsina/EDTA al 0.25% (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Posteriormente, la digestión sigue con al menos 2 ciclos de colagenasa tipo II 2 mg/mL (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) a 37°C en agitación constante. Las células contenidas en el sobrenadante se sedimentan por centrifugación a 1800 rpm por 5 minutos. Los condrocitos fueron suspendidos en medio de cultivo opti-MEM suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y gentamicina (0.05 mg/mL) y se cultivaron inicialmente en botellas de cultivo de 75 cm² a 37°C en un ambiente al 5% de CO₂ y una humedad relativa del 100%. No se utilizaron células con más de dos pasajes de cultivo.

5.4 Establecimiento de los grupos experimentales

Para el cultivo celular, se emplearon placas de 12 pozos (Costar® Corning Incorporated, Corning, NY, USA) a una densidad de 2×10^5 células por pozo. El medio de cultivo basal a emplear fue Opti-MEM o DMEM/F12 (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de SBF (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) y 50 µg/mL de Gentamicina (Laboratorios Química SON'S, Cholula, Puebla, MEX); todo en un ambiente al 5% de CO₂ y una humedad relativa del 100%. Posterior a ello, se establecieron 5 grupos de tratamiento por cada molécula a analizar (CatDex u ODX): un grupo control tratado únicamente con medio basal y 4 grupos de tratamiento con medio de cultivo sin SBF con concentraciones de 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 µM de cada molécula. De cada grupo se obtuvieron muestras a las 0, 24 y 48 h de cultivo para realizar extracción de ARN total y además se almacenó el medio de cultivo sobrenadante a -80°C para su posterior análisis.

5.5 Proliferación celular

La proliferación de los condrocitos cultivados bajo las distintas condiciones anteriormente señaladas fue evaluada por medio de un ensayo colorimétrico a través de la reducción de la sal de tetrazolio MTT (bromuro de 3-(4, 5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio). La reducción del MTT (color amarillo) se lleva a cabo en células metabólicamente activas a través de enzimas deshidrogenasas, lo que da como resultado la producción intracelular de formazán (color púrpura) el cual puede

ser cuantificado espectrofotométricamente. Los condrocitos fueron cultivados en placas de 96 pozos durante 24 h. Posteriormente, las células se incubaron con el reactivo de MTT de 2-4 h hasta la formación de un precipitado púrpura visible. Luego se añade el reactivo de detergente y se incuba de 2-4 h en la oscuridad. Por último, se mide la absorbancia en cada pozo a una longitud de onda de 570 nm.

5.6 Migración celular

Se evaluó utilizando la técnica “*wound healing assay*” al crear en un ambiente estéril un área libre de células en los cultivos mediante daño mecánico de la monocapa en una zona confluyente utilizando una punta de pipeta nueva de 200 μ L para todos los casos, la cual se colocó firme y perpendicularmente a la superficie a 90 grados de ésta, para producir una herida vertical (Rodriguez et al., 2005). Luego se aspiraron los detritos celulares y se colocó medio de cultivo contra la pared generada en la herida realizada para evitar el desprendimiento adicional de células. El procedimiento se realizó en todos los casos por la misma persona. El espacio libre de células generado se evaluó y se tomaron fotografías a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de cultivo bajo microscopía de luz en fase de contraste a 10X y 50X. Las imágenes obtenidas se enviaron a un ordenador personal cargado por el programa Image J. Se transformaron las imágenes a escala de grises y se estimó el porcentaje del área desprovista de condrocitos. Se tomó una foto inicial después de realizar la herida, la cual fue utilizada como referencia para el análisis.

5.8 Cálculo y Tamaño de la Muestra

El cálculo se realizó de una manera no probabilística con un muestreo por conveniencia debido a que es la primera vez que se realiza un protocolo de estas moléculas sobre cartílago articular y solo se utilizaron los aloinjertos necesarios para cubrir la generación de los grupos controles y experimentales.

5.9 Análisis estadístico

Se realizó utilizando el programa computacional SPSS versión 21.0 para Mac®. Estadística descriptiva. Se obtuvo media, desviación estándar, IC al 95%, resultado mínimo y resultado máximo para cada parámetro de medición incluido en el presente estudio. Para las variables categóricas se utilizó la prueba de chi-cuadrada. Para la estadística inferencial se realizaron pruebas de correlación paramétrica (ANOVA y t student) de dos colas, para determinar si existen diferencias significativas entre los resultados promedio obtenidos entre los distintos grupos para cada parámetro de medición. De la misma forma se realizaron pruebas de t student de dos colas para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de cada parámetro de medición paramétrico entre los distintos grupos del estudio, tomando como significativo un valor de p inferior a 0.05.

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

6.1 Características de las muestras obtenidas de donadores

Las muestras de cartílago articular obtenidos provinieron de un total de 9 donadores (5 hombres y 4 mujeres) del Banco de Hueso y Tejidos, con una media de edad de 64.1 ± 6.8 años y con un IMC de 29.14 ± 3.17 . Los donadores fueron procurados dentro del periodo comprendido de enero de 2019 a diciembre de 2021. Dos muestras de cartílago de dos donadores no pudieron ser incluidos dentro del estudio debido a la contaminación microbiana de los injertos.

6.2 Selección del medio de cultivo control para los ensayos

Para seleccionar el medio de cultivo apropiado que se utilizaría como control en los ensayos de viabilidad. Se cultivaron 50,000 células por pozo con los medios de cultivo Opti-MEM y DMEM/F12, adicionando un grupo control sin medio de cultivo solo con PBS (*phosphate-buffered saline*).

El medio de cultivo con mayor cantidad de unidades relativas de luminiscencia (URL) fue el Opti-MEM, con un total de $106,415.0 \pm 701.5$ URL, el medio de cultivo DMEM/F12 obtuvo $66,836.0 \pm 2,577.0$ URL y el PBS $23,091.0 \pm 269.4$ URL. Debido a que el Opti-MEM fue el medio de cultivo con mayor viabilidad celular, se decidió

utilizar como medio de cultivo de control (Figura 1).

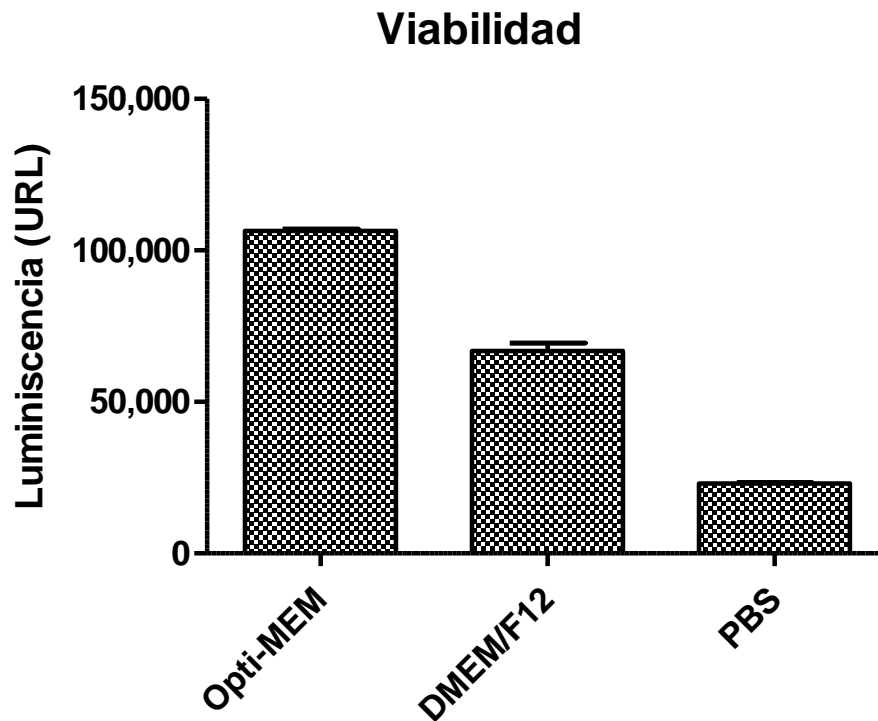


Figura 3. Viabilidad Celular de Opti-MEM, DMEM/F12 y PBS.

6.3 Ensayo de viabilidad con los compuestos ODX y CatDex

El ensayo de viabilidad con ODX y CatDex a múltiples concentraciones de 0.25 μM , 0.5 μM , 1.0 μM y 2 μM fue realizado a la par con el medio de cultivo de Opti-MEM. Los valores obtenidos de luminiscencia para ODX arrojaron una diferencia no significativa. Como se puede apreciar en la Tabla 1, las medias fueron menores a concentraciones mayores, el grupo de concentración de 1.0 μM fue el que alcanzó una desviación estándar menor y un intervalo de confianza más estrecho en

comparación con los demás grupos, por otro parte las mediciones a 2 μM obtuvieron desviaciones muy elevadas (25,167) y también mostraron el intervalo de confianza más amplio de los 4 grupos (63,004-143,097).

En la Tabla 2 se describen los valores de luminiscencia para CatDex, que demuestran una diferencia significativa ($p < 0.001$). Al igual que para ODX las medias fueron menores a concentraciones mayores. La tendencia de las desviaciones estándar y de los intervalos de confianza fue de ser menores a mayor concentración, a excepción del grupo de 1.0 μM que presentó una desviación estándar mayor que los grupos de 0.25 μM y 0.5 μM .

En la Figura 2 se puede observar que ODX mostró ser superior al control, y no así CatDex.

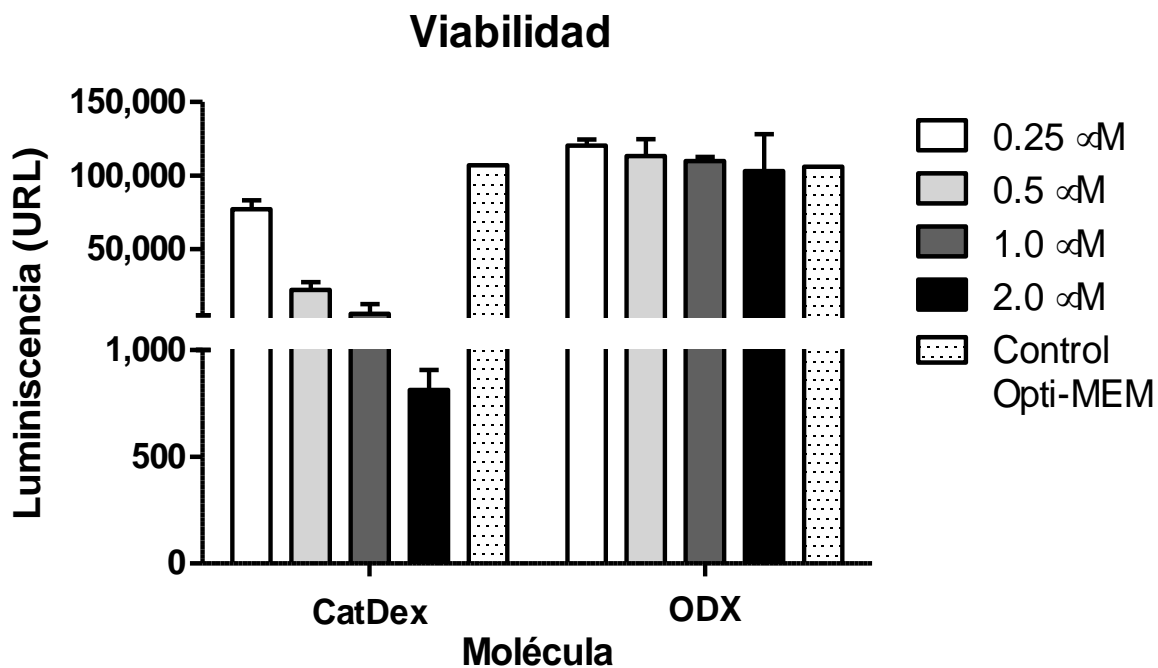


Figura 4. Viabilidad celular de CatDex y ODX.

Tabla 1. Valores de luminiscencia para las diferentes concentraciones de ODX.

ODX	0.25 μm	0.5 μm	1.0 μm	2.0 μm
Media \pm	120,370 \pm	113,346 \pm	109,772 \pm	103,051 \pm
DS (URL)	4,157	11,316	2,986	25,167
95% IC	(113,755- 126,985)	(95,339- 131,352)	(105,021- 114,522)	(63,004- 143,097)
Valor p	0.34			

DS, desviación estándar; URL, unidades relativas de luminiscencia; IC, intervalo de confianza.

Tabla 2. Valores de luminiscencia para las diferentes concentraciones de CatDex.

CatDex	0.25 μm	0.5 μm	1.0 μm	2.0 μm
Media \pm	77,349 \pm 5,864	22,365 \pm 5,297	6,265 \pm 6,400	813 \pm 94.39
DS (URL)				
95% IC	(68,017- 86,680)	(13,936- 30,794)	(3,919- 16,449)	(662.8- 963.2)
Valor p	<0.001			

DS, desviación estándar; URL, unidades relativas de luminiscencia; IC, intervalo de confianza.

6.4 Ensayo de migración con los compuestos ODX y CatDex

En el ensayo de migración celular se obtuvieron mediciones a las 0, 24 y 48 h, con concentraciones de 0.25 μM , 0.5 μM y 1 μM con los tres medios de cultivo. En el ensayo realizado con ODX (Figura 3), se observó un porcentaje de migración significativamente mayor en las 3 concentraciones a las 24 h y 48 h comparado con el porcentaje de migración a las 0 h, mientras el grupo control solo mostró una diferencia significativa entre las 0 y 48 h, donde se presentó un mayor porcentaje de migración en esta última.

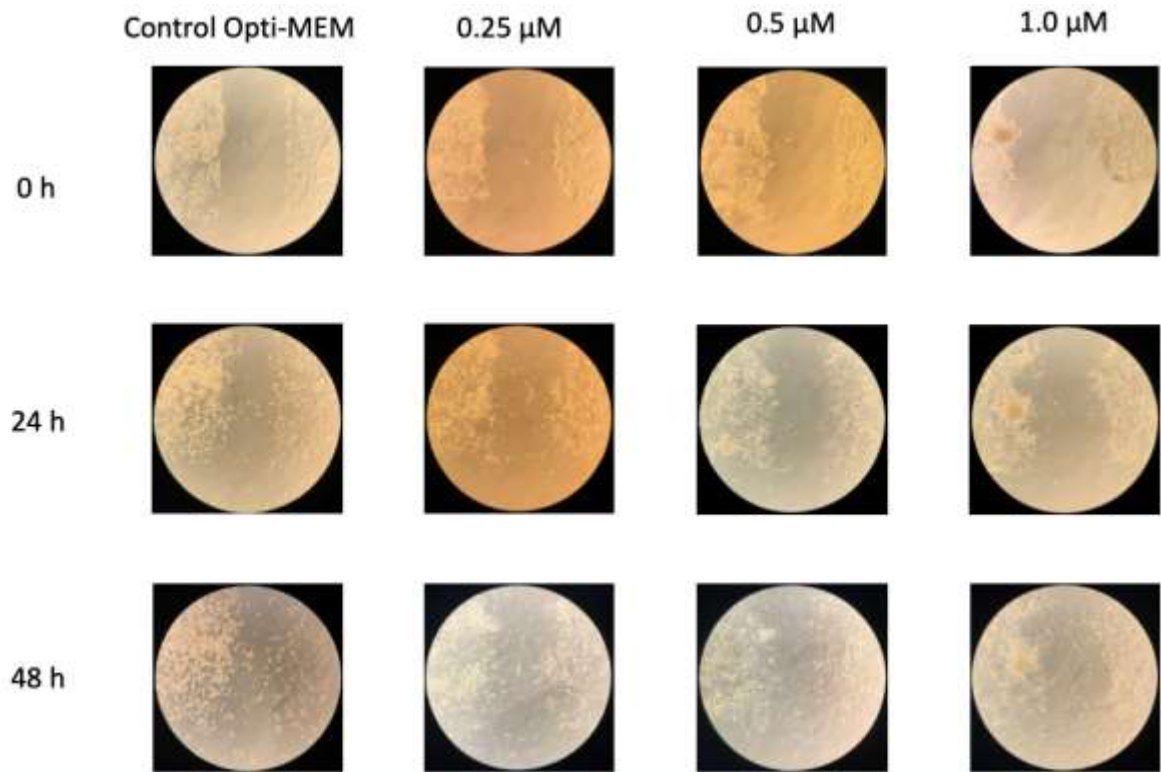


Figura 5. Ensayo de migración celular con ODX.

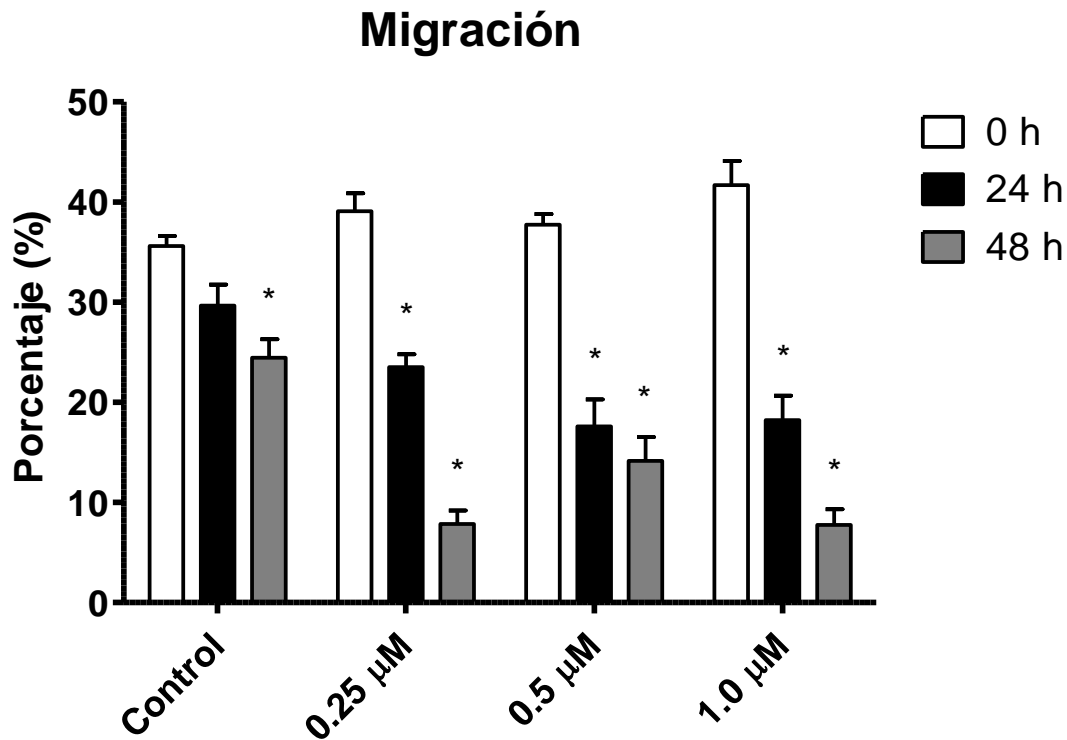


Figura 6. Representación gráfica del análisis de migración con ODX (porcentaje de área medida desprovista de condrocitos).

En el análisis de migración con ODX, los valores obtenidos del porcentaje de área medida desprovista de condrocitos a las 0 h fueron de: 39% (4.5%) para el grupo 0.25 μM, 37.7% (2.5%) para el grupo 0.5 μM y 41.6% (5.8%) para el grupo 1.0 μM. A las 24 h los valores para los 3 grupos rondaron entre 17% y 23%, teniendo el grupo 1.0 μM el porcentaje más bajo, como se puede apreciar en la Figura 4. Para las 48 h los valores fueron de: 7.8% (3.3%) para el grupo 0.25 μM, 14.1% (5.8%) para el grupo 0.5 μM y 7.7% (3.8%) para el grupo 1.0 μM.

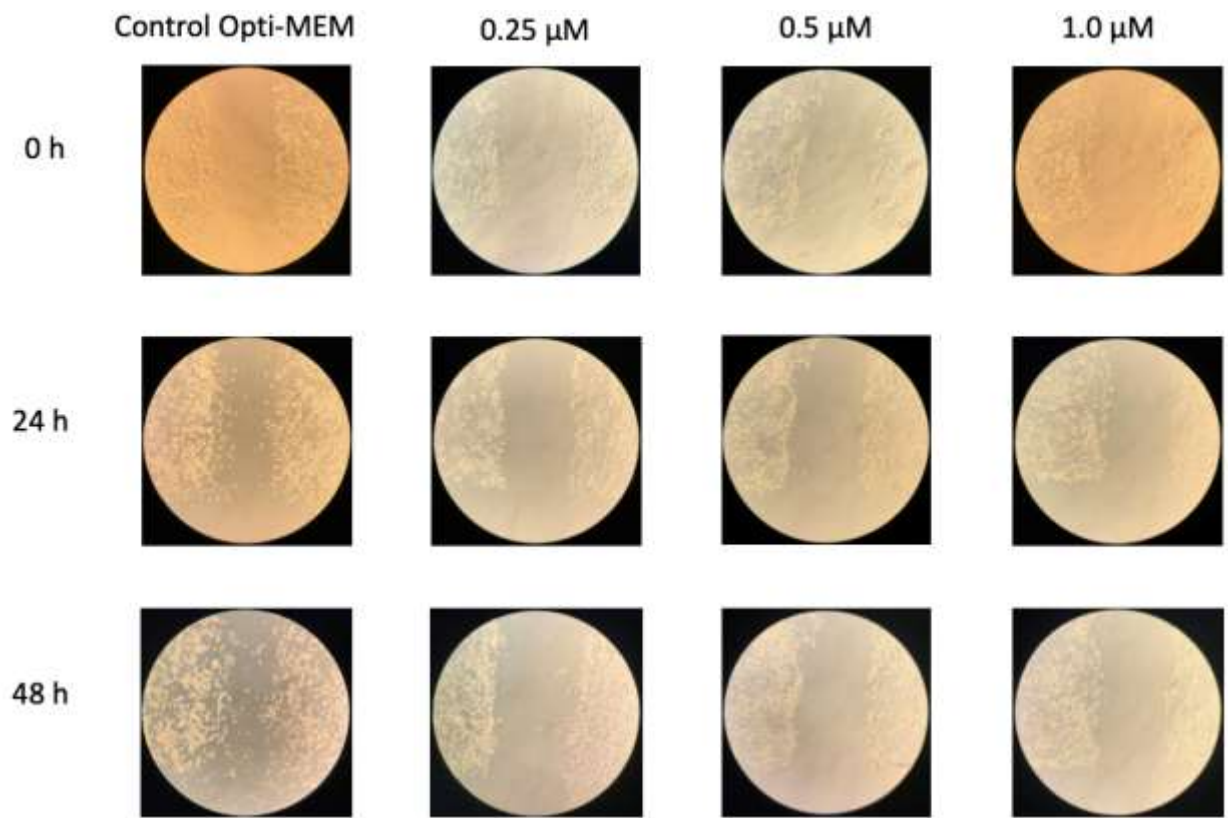


Figura 7. Ensayo de migración celular con CatDex.

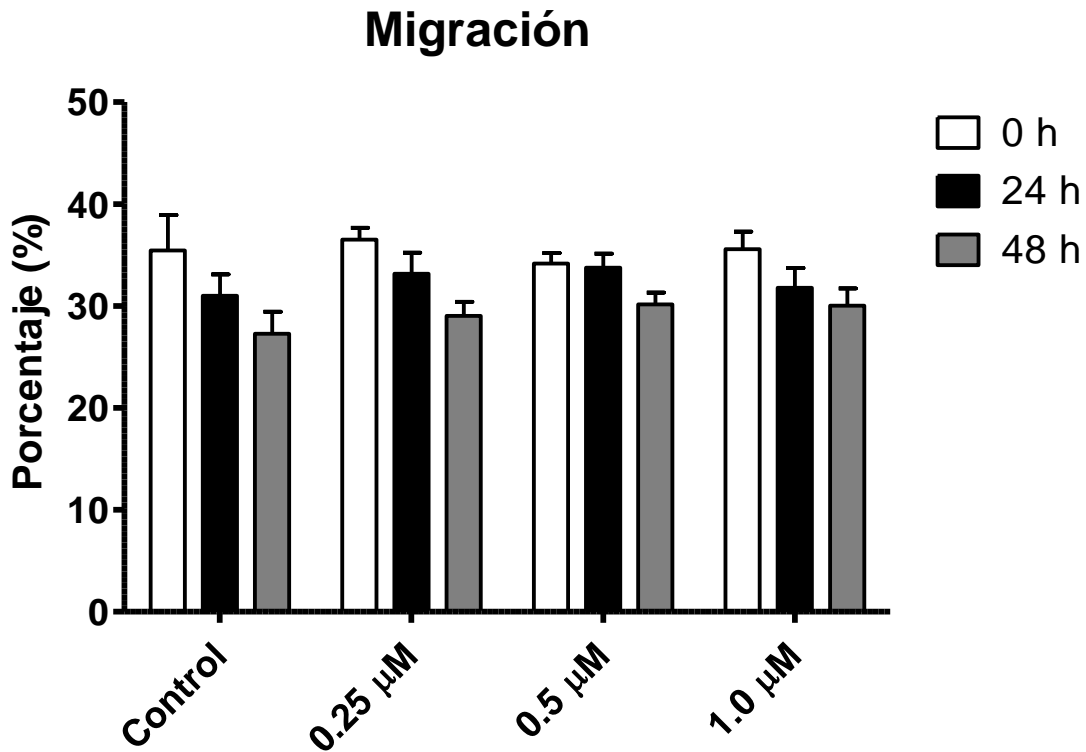


Figura 8. Representación gráfica del análisis de migración con CatDex (porcentaje de área medida desprovista de condrocitos).

En el ensayo realizado con CatDex (Figura 5) no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de migración para ninguna concentración ni durante ningún corte de horas en ningún grupo.

Para CatDex el porcentaje de área desprovista de condrocitos obtenido para la hora 0 fue de: 36.5% (2.8%) para el grupo 0.25 μM, 34.1% (2.4%) para 0.5 μM y 35.5% (4.2%) para 1.0 μM, los valores a las 48 h fueron de: 29% (3.3%) para el grupo 0.25 μM, 30.1% (2.8%) para 0.5 μM y 30% (4.1%) para 1.0 μM. A las 24 h los valores

para los 3 grupos rondaron entre 31% y 33%, teniendo el grupo 0.25 μ M el porcentaje más bajo como se observa en la Figura 6.

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN

En la terapia de reparación para cartílago humano existen grandes desafíos que actualmente se buscan resolver, uno de ellos es el uso de suero bovino fetal como medio de cultivo, debido a las limitaciones que presentan el cultivo y la aplicación de células en pacientes. En el año de 2003 en Utrecht, Países Bajos, se celebró el primer taller dedicado a la sustitución del SBF en métodos de cultivo de células y tejidos (Van der Valk et al., 2018).

A partir de 1980 se comenzaron a realizar múltiples estudios que utilizaron medios libres de suero y que obtuvieron como resultado mejoras como: condiciones de cultivo controladas y definidas químicamente in vitro, variabilidad reducida en la composición del medio de cultivo cualitativo y cuantitativo, eliminación contaminación microbiana potencial, ventajas en el aislamiento posterior de productos de cultivo celular, y aspectos éticos (Van der Valk et al., 2018).

En un estudio donde se evaluó la utilización de suero autólogo y medios libres de suero para el cultivo de condrocitos se obtuvieron los siguientes resultados: el grupo con SBF al 10% y el grupo suplementado con factores de crecimiento demostraron un mayor número de células en comparación con el grupo suplementado con suero autólogo al 10% ($p < 0,05$), se contaron a los días 3, 6, 9 y 12 (Kamil et al., 2007).

Al igual que en un estudio del 2017 realizado en la Universidad de Medicina del Noreste de Ohio, donde se tuvo especial cuidado en la manipulación de los

condrocitos, en este trabajo se eligió Opti-MEM como medio de cultivo de control, ya que fue el medio de cultivo con mayor viabilidad celular (Makki et al., 2017). El uso de Opti-MEM permite reducir el uso de SBF, ya que contiene insulina, transferrina, hipoxantina, timidina y oligoelementos que compensan el impacto adverso de la reducción de la suplementación con FBS sin cambios en la tasa de crecimiento o la morfología (Rashid et al., 2019).

De acuerdo con el porcentaje de área medida desprovista de condrocitos para Osteodex, el grupo que presentó mayor cambio entre el valor medido a las 0 h y a las 48 h fue el de 1.0 μM con una diferencia del 33.9%, seguido por el grupo 0.25 μM con una diferencia de 31.2% y el grupo que presentó menor diferencia fue el de 0.5 μM con 23.5%, por lo tanto, hubo mayor migración en el grupo 1.0 μM . A las 24 h el grupo 0.5 μM presentó el menor porcentaje de área desprovista de condrocitos [17.5% (6.6%)] con un cambio de 20.1% en comparación a la hora 0, por otro lado, el grupo 0.25 μM mostró el mayor porcentaje [23.5% (3.1%)] con un cambio de 15.5% en comparación a la hora 0.

Podrían existir áreas de oportunidad para mejorar la eficacia del ODX, por ejemplo, en el área de oncología se ha estudiado esto, y se conoce que su mecanismo de acción depende de tres efectos: citotoxicidad, inducción de apoptosis e inhibición de vía de mevalonato (Alaiya et al., 2014), por lo que se han llevado a cabo investigaciones dirigidas a estudiar estas características entre otras (Holmberg et al., 2010). Un estudio dirigido por el Instituto Karolinska obtuvo que todas las células tratadas murieron con una dosis de 8 μM , que una dosis de 1.4 mg/kg no produce toxicidad, reducción de las lesiones tratadas con ODX e inhibición de la actividad de

osteoclastos (Nilsson et al., 2015).

Otro estudio multicéntrico llevado a cabo en Suecia obtuvo que no se registró toxicidad acumulativa ni toxicidad renal con el ODX además de que fue bien tolerado, con pocos y leves efectos secundarios y con una aparente eficacia del tratamiento en la cohorte de dosis más alta (Thellenberg-Karlsson et al., 2016).

En comparación con el área desprovista de condrocitos medida para ODX, los valores obtenidos para CatDex fueron mayores lo que implica una menor migración celular, de las 0 h y a las 48 h hubo una diferencia del 5.5% en 1.0 μM , seguido por el grupo 0.25 μM con una diferencia de 7.5% y el grupo que presentó menor diferencia fue el de 0.5 μM con 4%, por lo tanto, hubo mayor migración en el grupo 0.25 μM . A las 24 h el grupo 1.0 μM presentó el menor porcentaje de área desprovista de condrocitos [31.7% (4.7%)] con un cambio de 3.7% en comparación a la hora 0, por otro lado, el grupo 0.5 μM mostró el mayor porcentaje [33.7% (3.3%)] con un cambio de 0.4% en comparación a la hora 0.

De acuerdo con un estudio publicado en 2017 la toxicidad de CatDex dependía del tiempo y no de la concentración (Escamilla-García et al., 2017), por lo que al no tener toxicidad reportada y una ligera superioridad contra el grupo control, más estudios podrían generar evidencia para apoyar su uso.

La tendencia de las desviaciones estándar y de los intervalos de confianza de ser menores a mayor concentración solo se observó en los grupos de CatDex, no hubo tendencia alguna para los de ODX. A pesar de no tener una p significativa en la comparación de medias en los valores de luminiscencia para las diferentes

concentraciones, ODX mostró ser superior al control y a CatDex. Es factible que lo anterior se deba a la heterogeneidad de los datos y/o a datos atípicos, esto secundario a posibles errores en el procedimiento. La heterogeneidad de los datos se podría compensar al aumentar el número de muestra y así con una distribución no paramétrica justificar el uso de una prueba estadística para datos no normales.

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN

El presente trabajo sugiere superioridad de ODX sobre CatDex para inducir migración celular de condrocitos. Osteodex exhibió ventaja contra grupo control, no así CatDex que fue equiparable contra grupo control como suplemento para el medio de cultivo de condrocitos humanos evaluado mediante pruebas de migración celular. En las pruebas de viabilidad celular ODX también fue superior.

Por lo planteado anteriormente y de acuerdo con los resultados que arrojó este estudio, se apoya el uso de ODX como suplemento para el medio de cultivo de condrocitos humanos, lo que se verá reforzado con más estudios al respecto ya que no existen muchos en relación con el tema.

CAPÍTULO IX

9. LIMITACIONES

Dentro de las limitaciones del estudio encontramos que es necesario un análisis post hoc para conocer en qué medida existen diferencias entre que grupos de concentraciones. Las comparaciones fueron hechas entre grupos de concentraciones y no entre CatDex y ODX, por lo que sería interesante ver que arrojan estas comparaciones.

Existen pocas publicaciones que utilicen los mismos parámetros de medición para poder comparar los resultados obtenidos, de igual forma el medio de cultivo varia incluso de 2D a 3D.

El presente estudio refleja un primer acercamiento al efecto de las moléculas probadas sobre los condrocitos humanos en cultivo. Como tal, es necesario llevar a cabo más experimentos utilizando distintas concentraciones de las moléculas, así como evaluar el efecto de dichos compuestos sobre el fenotipo del condrocito.

REFERENCIAS

1. Alaiya, A., Fox, J., Bobis, S., Matic, G., Shinwari, Z., Barhoush, E., ... & Holmberg, A. R. (2014). Proteomic analysis of soft tissue tumor implants treated with a novel polybisphosphonate. *Cancer Genomics & Proteomics*, 11(1), 39-49.
2. Armiento, A. R., Stoddart, M. J., Alini, M., & Eglin, D. (2018). Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta biomaterialia*, 65, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.021>
3. Berthiaume, F., Maguire, T. J., & Yarmush, M. L. (2011). Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 2, 403–430. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
4. Bhosale, A. M., & Richardson, J. B. (2008). Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *British medical bulletin*, 87(1), 77-95.
5. Buckwalter, J. A., & Brown, T. D. (2004). Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*, 423, 7-16.
6. Carballo, C. B., Nakagawa, Y., Sekiya, I., & Rodeo, S. A. (2017). Basic science of articular cartilage. *Clinics in sports medicine*, 36(3), 413-425.
7. Caron, M. M., Emans, P. J., Coolsen, M. M., Voss, L., Surtel, D. A., Cremers, A., ... & Welting, T. J. (2012). Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and*

cartilage, 20(10), 1170-1178.

8. Daubine F, Le Bot R, Marquez M, Nilsson S, Schröder T, Holmberg A (2011) Treatment of Bone Metastasis in Prostate Cancer: Efficacy of a Novel Polybisphosphonate. *Anticancer Research* 31: 4141-4146.
9. Escamilla-García, E., Alcázar-Pizaña, A. G., Segoviano-Ramírez, J. C., Del Angel-Mosqueda, C., López-Lozano, A. P., Cárdenas-Estrada, E., De La Garza-Ramos, M. A., Medina-De La Garza, C. E., & Márquez, M. (2017). Antimicrobial Activity of a Cationic Guanidine Compound against Two Pathogenic Oral Bacteria. *International journal of microbiology*, 2017, 5924717. <https://doi.org/10.1155/2017/5924717>
10. González, E. A. H., & Aguilar, E. J. (2009). Evolución del medio de cultivo en el estudio de las células madre neuronales. *Rev Med UV*.
11. Gosset, M., Berenbaum, F., Thirion, S., & Jacques, C. (2008). Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nature protocols*, 3(8), 1253-1260.
12. Holmberg AR, Lerner U, Alayia A, Al-Mohanna M, Adra C, Márquez M, Meurling L, Nilsson S (2010) Development of a novel poly bisphosphonate conjugate for treatment of skeletal metastasis and osteoporosis. *Int J Oncol* 37: 563-567
13. Jeyakumar V, Niculescu-Morzsa E, Bauer C, Lacza Z, Nehrer S (2017) Platelet-rich Plasma supports proliferation and redifferentiation of chondrocytes during In Vitro expansion. *Front. Bioeng. Biotechnol* 5:75. doi: 10.3389/fbioe.2017.00075
14. Kamil SH, Kojima K, Vacanti MP, Zaporozhan V, Vacanti CA, Eavey RD (2007) Tissue engineered cartilage: utilization of autologous serum and serum-free media for chondrocyte culture. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 71: 71-75.

15. Kamil, S. H., Kojima, K., Vacanti, M. P., Zaporozhan, V., Vacanti, C. A., & Eavey, R. D. (2007). Tissue engineered cartilage: utilization of autologous serum and serum-free media for chondrocyte culture. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 71(1), 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2006.09.002>
16. Kokai, L., Chen, J., Wang, D., Wang, S., Egro, F. M., Schilling, B., ... & Sowa, G. (2022). Comparison of clinically relevant adipose preparations on articular chondrocyte phenotype in a novel in vitro co-culture model. *Stem Cells and Development*.
17. Le Goff B, Heymann D (2011) Pharmacodynamics of bisphosphonates in arthritis. *Expert Rev Clin Pharmacol* 4(5):633–41
18. Makki, M. S., Akhtar, N., & Haqqi, T. M. (2017). An effective and efficient method of transfecting primary human chondrocytes in suspension. *Analytical biochemistry*, 526, 29-32.
19. Malpeli M, Randazzo N, Cancedda R, Dozin B (2004) Serum-free growth medium sustains commitment of human articular chondrocyte through maintenance of Sox9 expression. *Tissue Eng* 10: 145-155.
20. Mandl EW, Jahr H, Koevoet JL, van Leeuwen JP, Weinans H, Verhaar JA (2004) Fibroblast growth factor-2 in serum-free medium is a potent mitogen and reduces dedifferentiation of human ear chondrocytes in monolayer culture. *Matrix Biol* 23: 231-241.
21. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vecsei V (2006) Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol* 57: 24-31.
22. Marquez M, Nilsson S, Lennartsson L (2004) Charge- dependent targeting: results in six tumor cell lines. *Anticancer Research* 24(3): 1347-1352.

23. Marquez M, Du J, Edgren M (2002) Development of dextran derivatives with cytotoxic effects in human urinary bladder cancer cell lines. *Anticancer Research* 22(2): 741–744.
24. Mata-Miranda, M. M., Paredes-González, L. E., Martínez-Martínez, C. M., & Vázquez-Zapién, G. J. (2015). Implante de condrocitos autólogos con potencial regenerativo en lesiones articulares. *Revista Colombiana de ortopedia y traumatología*, 29(1), 28-35.
25. Merkely, G., Ackermann, J., & Lattermann, C. (2018). Articular cartilage defects: incidence, diagnosis, and natural history. *Operative techniques in sports medicine*, 26(3), 156-161.
26. Nilsson, S., Lindberg, H., Thellenberg-Karlsson, C., Nyman, C., Marquez, M., Lennartsson, L., ... & Holmberg, A. R. (2015). Efficacy of a novel cytotoxic poly-bisphosphonate for treatment of bone metastasis in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Journal of Clinical Oncology*, 33(15, suppl.).
27. Rashid, M. U., & Coombs, K. M. (2019). Serum-reduced media impacts on cell viability and protein expression in human lung epithelial cells. *Journal of cellular physiology*, 234(6), 7718-7724.
28. Rodriguez, L. G., Wu, X., & Guan, J. L. (2005). Wound-healing assay. In *Cell migration* (pp. 23-29). Humana Press.
29. Sah RL, Chen AC, Grodzinsky AJ, Trippel SB (1994) Differential effects of bFGF and IGF-I on matrix metabolism in calf and adult bovine cartilage explants. *Arch Biochem Biophys* 308: 137-147.
30. Saviola G, Abdi-Ali L, Campostrini L, Sacco S, Baiardi P, Manfredi M (2012) Clodronate and hydroxychloroquine in erosive osteoarthritis: a 24-month open

randomized pilot study. *Mod Rheumatol* 22(2):256–63

31. Schenker, M. L., Mauck, R. L., Ahn, J., & Mehta, S. (2014). Pathogenesis and prevention of posttraumatic osteoarthritis after intra-articular fracture. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 22(1), 20–28. <https://doi.org/10.5435/JAAOS-22-01-20>
32. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE (2006) A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 403-412.
33. Scott WN, Insall, Scott (2007) Cirugía de rodilla. España: Elsevier. Vol 1, 4ta edición.
34. Shao XX, Duncan NA, Lin L, Xin F, Ji-ying Z, Chang-long Y (2013) Serum-free media for articular chondrocytes *in vitro* expansion. *Chin Med J* 126(13): 2523-2529.
35. Simon, T. M., & Jackson, D. W. (2018). Articular Cartilage: Injury Pathways and Treatment Options. *Sports medicine and arthroscopy review*, 26(1), 31–39. <https://doi.org/10.1097/JSA.000000000000182>
36. Tatman, P. D., Gerull, W., Sweeney-Easter, S., Davis, J. I., Gee, A. O., & Kim, D. H. (2015). Multiscale Biofabrication of Articular Cartilage: Bioinspired and Biomimetic Approaches. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 21(6), 543–559. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2015.0142>
37. Temenoff JS, Mikos AG (2000) Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21: 431- 440.
38. Thellenberg-Karlsson, C., Nyman, C., Nilsson, S., Blom, R., Márquez, M., Castellanos, E., & Holmberg, A. R. (2016). Bone-targeted Novel Cytotoxic

- Polybisphosphonate Conjugate in Castration-resistant Prostate Cancer: A Multicenter Phase 1 Study. *Anticancer research*, 36(12), 6499–6504.
<https://doi.org/10.21873/anticanres.11249>
39. Tuan, R. S., Chen, A. F., & Klatt, B. A. (2013). Cartilage regeneration. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 21(5), 303–311.
<https://doi.org/10.5435/JAAOS-21-05-303>
40. Van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W. G., Fu, J., Hickman, J. J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., & Gstraunthaler, G. (2018). Fetal Bovine Serum (FBS): Past - Present - Future. *ALTEX*, 35(1), 99–118.
<https://doi.org/10.14573/altex.1705101>
41. van Osch GJ, van den Berg WB, Hunziker EB, Hauselmann HJ (1998) Differential effects of IGF-1 and TGF beta-2 on the assembly of proteoglycans in pericellular and territorial matrix by cultured bovine articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 6: 187-195.
42. Vilchez F, Lara J, Alvarez-Lozano E, Cuervo CE, Mendoza OF, Acosta-Olivo C (2009) Knee chondral lesions treated with autologous chondrocyte transplantation in a tridimensional matrix: clinical evaluation at 1-year follow-up. *J Orthopaed Traumatol* 10: 173-177.
43. Widuchowski, W., Widuchowski, J., & Trzaska, T. (2007). Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *The Knee*, 14(3), 177-182.