



EDITORES

Junta Directiva de la AEBT

COLABORADORES

Montalvo Amparo et al
Trías Esteve et al
Rendal M^a Esther et al

INDICE

Editorial1
Evaluación de la viabilidad de los cultivos de condrocitos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X.....3
Sistema de Codificación Europeo para células y tejidos: un reto para 20088
Estudio de la capacidad de proliferación celular de los condrocitos, frescos y criopreservados, procedentes de cartílago superficial *versus* profundo11

© AEBT

Asociación Española de Bancos de Tejidos.

Edita: AEBT.

Internet: www.aebt.org

Esta obra se acoge al amparo del Derecho a la Propiedad Intelectual. Quedan reservados todos los derechos inherentes a que ampara la Ley, así como los de traducción, reimpresión, transmisión radiofónica, de televisión, de Internet (página web), de reproducción en forma fotomecánica o en cualquier otra forma y de almacenamiento en instalaciones de procesamiento de datos, aun cuando no se utilice más que parcialmente, sin permiso expreso del autor.

Editorial

La AEBT nos aporta mucho en el campo de nuestra labor profesional: Los Bancos de Tejidos.

La actividad de la AEBT hoy por hoy está centrada en:

- a) Sus congresos bianuales, congresos con un nivel científico-técnico difícil de superar.
- b) El mantenimiento de una página web con información para los miembros y no miembros.
- c) La publicación periódica de los estándares en Banco de Tejidos, ya por la tercera edición.
- d) La organización de cursos de formación.
- e) La edición de una revista "on line" cuyos últimos números aparecieron en mayo del 2002 y del 2003.
- f) Colaboración con otras entidades gubernamentales y Sociedades Científicas.
- g) Abierta a nuevas iniciativas relacionadas con los Bancos de Tejidos.

En la última reunión de la Junta Directiva de la AEBT, se acordó impulsar el boletín y que apareciese con una periodicidad semestral, debiéndose publicar el correspondiente al primer semestre del año 2008 antes de finalizar el mes de mayo. Con cierto retraso, para no perder las malas costumbres, aparece ahora tras el paréntesis del verano.

El boletín de la AEBT debe servir, sin cerrarlo a otras posibilidades, para difundir de manera más amplia los trabajos que se presentan en los Congresos, de manera especial los premiados, y como medio de comunicación entre la Junta y los miembros (editorial).

Todos los boletines serán encabezados por un "editorial", y este que aparece ahora nos gustaría que sirviera para estimular la participación dentro de la AEBT de los grupos de trabajo que se crearon en su día.

La vida de cualquier asociación depende de todos y de cada uno de sus miembros, y en la AEBT también es esto aplicable.

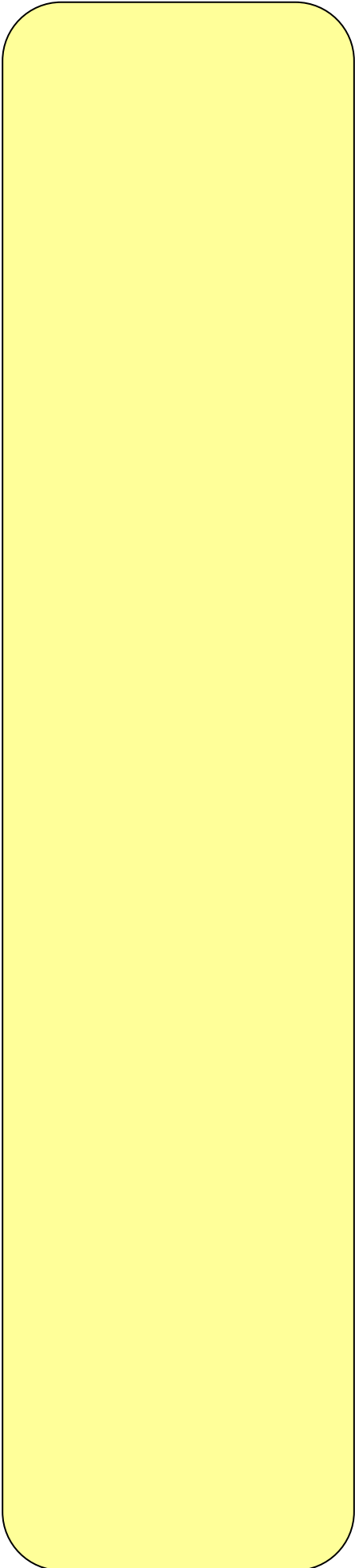
Cada grupo de trabajo, ya formado desde antaño, pero la composición de los mismos siempre está abierta, tiene designado un coordinador. Cualquier miembro de la AEBT puede solicitar ser incluido en cualquier grupo si no lo hizo con anterioridad. Para ello tiene que contactar con el coordinador, si sabe quien es, o dirigirse por e-mail a la Junta directiva de la AEBT.

En los dos últimos años la labor de estos equipos ha sido participar en la redacción de los estándares y desde aquí queremos reiterar nuestro agradecimiento y felicitación.

Ahora toca dinamizar los grupos de trabajo. Para justificar la no participación podemos decir que tenemos mucho trabajo y que la rutina diaria nos absorbe, y siendo esto esto verdad, no creo que nos debiera valer como respuesta.

En junio de este año, se enviaron correos a todos los coordinadores, correos en términos muy similares a los de este editorial. Somos conscientes de que estábamos a las puertas de las vacaciones y tal vez no fuera la mejor fecha, pero el tiempo pasa volando y tras el verano llega la Navidad, la Semana Santa y nuevamente otro verano.

La idea de trabajar en los grupos se ha de fijar cuanto antes y ponernos manos a la obra. Dinamizar el trabajo de todos los miembros es tarea prioritaria de la Junta Directiva de la AEBT y nos encargaremos de difundir la marcha y resultado del trabajo que se esté desarrollando. Este boletín y nuestra web servirán también para la difusión de los trabajos.



Coincidiendo con la publicación en la web del boletín nuevamente llegarán correos a los coordinadores de los grupos, así como las direcciones de todos los que en su día se inscribieron en uno u otro grupo. Esperemos que la respuesta sea extraordinaria, nos pongamos las pilas y en el próximo boletín de la AEBT el editorial sea en tonos totalmente distintos a los de este.

La Junta Directiva de la AEBT

Evaluación de la viabilidad de los cultivos de condrocitos mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X

Montalvo Amparo, Garzón Ingrid, Gonzalez-Andrades Miguel, Lobo Manuel, Fernández-Montoya Antonio, Alaminos Miguel, Campos Antonio

Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de Granada y Centro Regional y Banco Sectorial de Tejidos de Granada Almería.

Resumen

El trabajo evalúa la viabilidad de los condrocitos fibrosos en los seis primeros subcultivos comparando los resultados que se obtienen con Azul tripan y con microscopia electrónica analítica por energía dispersiva de RayosX. Los resultados con azul tripan muestran una alta viabilidad en todos los subcultivos mientras que la determinación del índice K/Na que se obtiene utilizando la microscopia electrónica analítica pone de relieve que el subcultivo mas viable es el tercero. La explicación es que el azul tripan solo tiñe células muertas en las que ya existe ruptura de la membrana celular, mientras que la microscopia electrónica analítica permite detectar células en proceso de muerte con anterioridad a que se produzca la ruptura de la membrana celular.

Summary

In this work we have determined cell viability of fibrous chondrocytes in six passages to identify the specific cell passage that is more appropriate to be used in tissue engineering. We compare the results using tripan blue and X-Ray electron probe microanalysis. When tripan blue is used a high viability -more than 80%- was observed in all passages. When it was used X-Ray microanalysis the K/Na index only showed high viability in the third subculture. Whereas only cell death with ruptured cell membrane are stained with tripan blue, X-ray microanalysis determination detects cell death before the rupture of the cell membrane takes place.

Palabras clave: Viabilidad, condrocitos, subcultivos, Azul tripan, microscopia electrónica analítica.

Introducción

El tejido cartilaginoso es un tejido avascular cuyo poder de regeneración es muy limitado. Debido a ello las alteraciones que tienen lugar en las estructuras cartilaginosas resultan de muy difícil reparación por los propios condrocitos de la región (Messner, 1996). Para tratar de regenerar el cartílago lesionado se han utilizado en consecuencia trasplantes de distintos tejidos como pericondrio y periostio y más recientemente el trasplante de condrocitos autólogos (Brittberg, 1994; O'Driscoll, 1998). Asimismo distintos autores han ensayado la utilización de tejido cartilaginoso artificial fabricado por ingeniería tisular a partir de condrocitos y de matrices de distinta naturaleza.

La eficacia de la terapia celular y tisular es altamente dependiente de la viabilidad de las células utilizadas. En este sentido existen datos recientes que indican que la viabilidad de las células varía notablemente en los distintos subcultivos (Alaminos, 2007; Rodríguez Morata, 2008).

Para determinar la viabilidad se han utilizado, en general, técnicas que detectan alteraciones de la permeabilidad celular como el Azul tripan o la cuantificación de la enzima lactato deshidrogenasa en el medio de cultivo. Estas técnicas tienen sin embargo importantes

limitaciones pues están basadas en la ruptura de la membrana celular. Una de los métodos mas sensibles para establecer la viabilidad de las células lo constituye la determinación cuantitativa a nivel intracelular de la concentración de sodio y potasio. Dicha determinación que constituye un excelente indicador del nivel de viabilidad celular, se realiza mediante un detector microanalítico de energía dispersiva de Rayos X asociado a un microscopio electrónico. Ello permite además correlacionar la estructura celular y las concentraciones iónicas intracelulares sin que exista ruptura de la membrana celular, lo que permite evaluar la viabilidad celular antes de que exista ruptura de la membrana.

En el presente trabajo se evalúa mediante microscopia electrónica analítica por energía dispersiva de Rayos X la viabilidad de sucesivas poblaciones de condrocitos pertenecientes a distintos subcultivos con el objeto de establecer la población mas viable susceptible de ser utilizada en protocolos de terapia celular y tisular.

Material y métodos

El material objeto de estudio corresponde a tejido cartilaginoso fibroso del disco intrarticular de la articulación témporo-mandibular de ratas albinas Wistar machos de 400 g de peso medio. Para la obtención de las células disgregadas de la matriz extracelular, las muestras digeridas en colagenasa se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos, recogiendo el *pellet* celular correspondiente. Posteriormente, este precipitado celular se cultivó en frascos de cultivo de 25 cm² de superficie tipo Falcon con medio de cultivo QN. El medio QN fue inicialmente descrito por De Diego (2004) y Llames (2004) para el cultivo de queratinocitos de la piel, habiendo demostrado su utilidad en el cultivo de diversos tipos de células humanas y animales (Alaminos, 2006 y 2007; Sánchez-Quevedo 2007). Todos los cultivos celulares se incubaron a 37°C con un 5% de dióxido de carbono, en condiciones estándar de cultivo. Los medios de cultivo se renovaron cada tres días hasta su posterior subcultivo. El estudio se ha realizado hasta el sexto subcultivo.

Para determinar la viabilidad celular mediante ensayos de exclusión de colorantes vitales, se utilizó el método de tinción con azul tripán y conteo celular en cámara de Neubauer. Para analizar la viabilidad celular de los condrocitos

mediante microanálisis por energía dispersiva de rayos X (EPXMA) las células se cultivaron sobre rejillas de soporte cubiertas con Pioloformo, las cuales se lavaron y criofijaron en nitrógeno líquido. Las células criofijadas y depositadas en el interior del portamuestras se transfirieron a un sistema de criodesecación de alto vacío. Las muestras se criodesecaron durante un total de 12 horas a una presión de vacío de 10⁻⁵ mbar de acuerdo con los criterios establecidos por Warley (1997) y Skepper (2000). Tras la criodesecación, las células se recubrieron con carbón para facilitar el barrido del haz de electrones durante su observación microscópica y detección analítica. La cuantificación del contenido iónico de los condrocitos cultivados se llevó a cabo utilizando un microscopio electrónico de barrido Phillips XL 30 (Phillips, Eindhoven, Holanda) acoplado a un detector de energía dispersiva de rayos X EDAX DX4i. Para determinar cuantitativamente el contenido elemental de las células, se utilizó el método de la razón pico fondo -método P/B- con referencia a patrones de calibración de matriz orgánica previamente conocidos (Roomans, 1996; Statham 1998; Alaminos 2007).

Resultados

Las células crecieron en los distintos subcultivos sin que se observaran alteraciones morfológicas significativas. Los estudios de viabilidad con azul tripan se expresan en la figura 1. La viabilidad supera el 90% en los cuatro primeros subcultivos y se mantiene entre el 80 y el 90% en los dos últimos. La figura 2 muestra el espectro con los niveles de los distintos elementos iónicos presentes en el interior de la célula cartilaginosa. La relación de las concentraciones de Potasio y Sodio realizadas a partir de los valores obtenidos tras la cuantificación de los espectros se expresa en la figura 3. El índice K/Na es elevado en el tercer subcultivo a diferencia de lo que ocurre en los subcultivos precedentes y en los posteriores

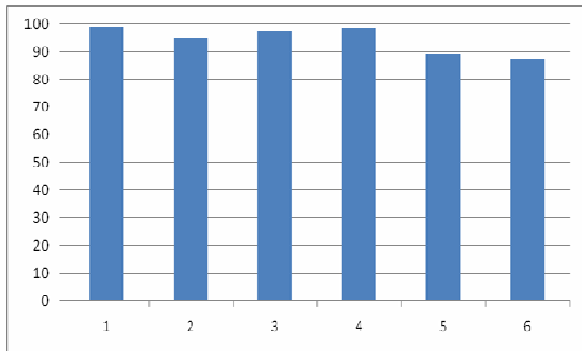


Figura 1: Evaluación con Azul tripan

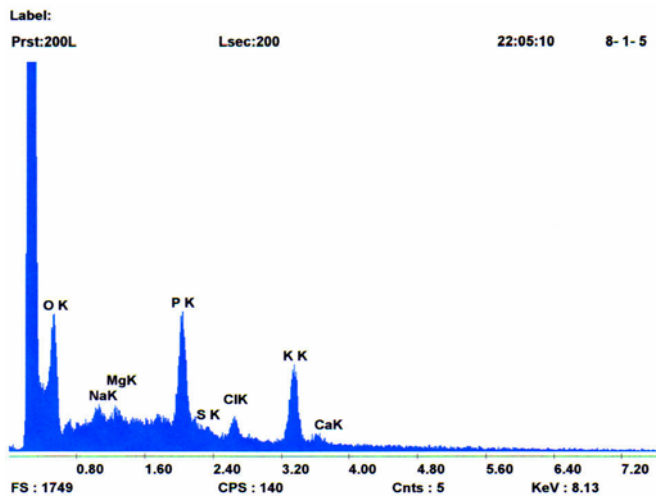


Figura 2 Espectro del perfil iónico intracelular obtenido por microscopia electrónica analítica

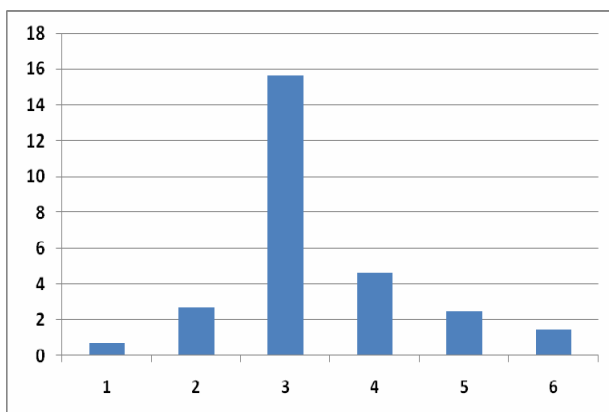


Figura 3 Evaluación de la viabilidad mediante el índice K/Na

Discusión

La Ingeniería Tisular aplicada al tejido cartilaginoso, dada la importante prevalencia de la patología degenerativa articular, se ha configurado en el momento presente como una de las herramientas más prometedoras a la hora de paliar algunas de las deficiencias existentes a dicho nivel (Tuli , 2003). En este sentido, hasta la fecha se han ensayado diferentes modelos para la formación de nuevo tejido cartilaginoso, los cuales van desde la terapia celular por condrocitos aislados hasta la elaboración de constructos cartilaginosos tridimensionales que incorporan células cartilaginosas a distintos biomateriales, añadiéndose en algunos protocolos distintos factores de crecimiento (Steinert., 2007). La terapia celular y los distintos constructos de cartílago han generado resultados muy diversos, habiéndose descrito, entre los problemas más significativos, la insuficiente diferenciación celular, la pérdida del número de células implantadas, la degeneración de las matrices utilizadas como biomateriales y la falta de integración del nuevo tejido en el sujeto que lo recibe (Campos, 2004)

Para que la Ingeniería Tisular del cartílago tenga éxito, es por tanto necesario asegurar que las células utilizadas para este fin, sean capaces de sobrevivir y mantener niveles adecuados de actividad mecánica y metabólica similares a los que existen en el cartílago ortotípico (Gorti *et al.*, 2003). Un factor decisivo en la evaluación de la viabilidad de las células a utilizar en Ingeniería Tisular es el tiempo de permanencia en cultivo con carácter previo a la construcción del nuevo tejido y a su aplicación terapéutica. Y lo que es asimismo muy importante su viabilidad en relación con los distintos protocolos de conservación en Bancos de tejidos En este sentido, diferentes autores han demostrado que las células mantenidas en cultivo tienden a envejecer y perder viabilidad después de varios pases celulares (Alaminos, 2007; Balconi y Dejana, 1986; Rodríguez-Morata, 2008)

Nuestros resultados, tras la utilización de Azul tripan, en los seis sucesivos pases ensayados en un modelo de de cultivo celular de condrocitos fibrosos, ponen de relieve que no existen diferencias significativas entre los distintos pases ensayados con cifras que superan siempre el 80% de viabilidad. El azul tripan es un colorante orgánico soluble en

agua, altamente tóxico, que posee grupos cargados amino y sulfato que le impiden atravesar membranas celulares intactas. Es por ello que tiñe tan sólo las células muertas o con daños groseros en su membrana celular. La consecuencia cuando se utiliza esta técnica para evaluar la viabilidad es que hay que saber que sólo es capaz de identificar aquellas células que se encuentran en una fase avanzada de apoptosis, puesto que durante las distintas fases se mantiene la integridad de la membrana celular (Alaminos, 2007).

La aplicación de la microscopía electrónica analítica permite analizar *in situ* la composición química de las células, al mismo tiempo que su observación microscópica. Warley (1994) y con posterioridad Roomans (2001) establecieron que, microanalíticamente, las concentraciones intracelulares de Na y K constituyen uno de los indicadores más sensibles y fiables de viabilidad celular. Roomans sugiere, además, que la razón o cociente K/Na constituye un excelente indicador del daño celular, desde el punto de vista microanalítico.

En el análisis microanalítico cuantitativo de los seis subcultivos estudiados hemos encontrado numerosas diferencias de carácter significativo entre las concentraciones medias de los distintos elementos. Nuestros resultados ponen de relieve la distinta viabilidad de los condrocitos en los distintos subcultivos destacando significativamente la viabilidad del tercer subcultivo. Los resultados que acabamos de reseñar ponen asimismo de relieve la sensibilidad de la microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X, comprobándose que las células que mostraban adecuados niveles de viabilidad celular cuando se utilizó la técnica del azul tripán, podrían no ser útiles para la Ingeniería Tisular si se utiliza la microscopía electrónica analítica como herramienta para evaluar la viabilidad celular. Si, como hemos indicado con anterioridad el futuro de la terapéutica sustitutiva del cartílago está vinculada a la Ingeniería Tisular, resulta evidente tras analizar los resultados de nuestro trabajo, que los estudios de viabilidad abren un nuevo campo en relación con la eficacia terapéutica de los protocolos a aplicar. En este contexto, la microscopía electrónica analítica por energía dispersiva de rayos X puede jugar un papel fundamental a la hora de asegurar los criterios de calidad necesarios para la instauración de dichos protocolos terapéuticos.

Bibliografía

- Alaminos M, Sanchez-Quevedo, M, C.; Muñoz-Avila, J, I.; Serrano, D.; Medialdea, S.; Carreras, I, Carreras I. and Campos A. (2006): Construction of a complete rabbit cornea substitute using a fibrin-agarosa scaffold. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 47,3311-3317.
- Alaminos M, Sanchez-Quevedo, M, C.; Muñoz-Avila, Garcia, JM, Crespo, PV, Gonzalez-Andrades, M and Campos A. (2007) Evaluation of the viability of cultured corneal endothelial cells by quantitative electron probe X-ray microanalysis. *Journal of Cellular Physiology* 211(3):692-8.
- Alaminos M , Sanchez-Quevedo MC, Moreu G, González-Andrades M, Fernández-Montoya A, Campos A. (2007) Time-course study of histological and genetic patterns of differentiation in human engineered oral mucosa. *J Tissue Eng Regen Med*. Sep-Oct;1(5):350-9.
- Balconi G, Dejana E. (1986) Cultivation of endothelial cells: limitations and perspectives. *Med Biol.*;64(5):231-45.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331:889–895
- Campos, A. (2004): cuerpo, histología y medicina. de la descripción microscópica de la ingeniería tisular, instituto de España real academia nacional de medicina, Madrid: 21-57.
- De Diego E, Villanueva A, Roca A, Martín B, Meana A, Gómez S y Gómez J.(2004) Estudio experimental sobre la viabilidad del injerto libre de epitelio urinario autólogo cultivado in vitro. *Actas Urol Esp* ; 28: 714-731.
- Gorti GK, Lo J, Falsafi S, Kosek J, Quan SY, Khuu DT, Koch RJ.(2003) Cartilage tissue engineering using cryogenic chondrocytes. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 129(8):889-93.
- Llames SG, Del Rio M, Larcher F, García E, García M, Escamez MJ, Jorcano JL, Holguín P, Meana A. (2004) Human plasma as a dermal scaffold for the generation of a completely autologous bioengineered skin. *Transplantation*. 15;77(3):350-5.
- Messner K, Gillquist J Cartilage repair: a critical review.(1996) *Acta Orthop Scand* 67:523–529

- O'Driscoll SW (1999) Articular cartilage regeneration using periosteum. Clin Orthop , 367(Suppl):S186-203.
- Rodriguez Morata A, Garzón I, Alaminos M, García Honduvilla N, Sanchez-Quevedo MC, Bujan J and Campos A .(2008) Cell viability and prostacyclin release in cultured human umbilical vein endothelial cells. Annals of Vascular Surgery. 22(3):440-448
- Roomans G.M and Von Euler A. (1996) X-ray microanalysis in cell biology and cell pathology. cell biol int, 20(2): 103-109.
- Sanchez-Quevedo, M.C.; Alaminos, M.; Capitan, L, M.; Moreu, G.; Garzon, A.; Crespo, P v.; and Campos, A. (2007). Histological and histochemical evaluation of human oral mucosa constructs Developer by tissue engineering. Cellullar and Mollecular Biology, 22:631-640.
- Skepper NF, Naridys I, Garnett, MR, Hegyi L, Hardwick SJ, Warley A, Mistchinson MJ, Cary NR. (1999): Cahanges in elemental concentrations are associated with early stages of apoptosis in human monocyte-macrophages exposed to oxidized low-density lipoprotein: An X-ray microanalytical study. J Pathol 188:100-106.
- Statham, P, J,: (1998): Measuring Performance of Energy-Dispersive X-ray Systems. Microsc Microanal. 1998 Nov;4(6):605-615.
- Tuli R, Li WJ, Tuan RS.(2003) Current state of cartilage tissue engineering. Arthritis Res Ther. 5(5):235-8.
- Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Nöth U. (2007) Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. Arthritis Res Ther.;9(3):213.
- Warley, A.; Fernández-Segura, E.; López-Escámez, J. A.; Campos, A. (1994): Changes in elemental concentrations in K562 target cells after conjugation with human lymphocytes studied by X-ray microanalysis, Cell Biology International, 18:915-916.
- Warley, A. (1997): X-ray microanalysis for biologists. Practical methods in electron microscopy, Glauert, A, M. (ed) Portland Press, London.
- Warley, A.; Skepper, J, N. (2000): Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. J Microsc. May;(Pt 2):116-23.

Sistema de Codificación Europeo para células y tejidos: un reto para 2008

Rw G April 25thrd 2008 European Coding System for Tissues and Cells: A Challenge for 2008

Esteve Trias, Stephan Poniatowski, Melvin Reynolds, Ruth M Warwick

Para comprender tanto la complejidad como la necesidad de un sistema único de codificación de células y tejidos humanos a nivel europeo, debemos partir de la situación actual en el continente, que podría resumirse en los siguientes puntos:

1. Un único donante puede dar lugar a una donación múltiple tanto de órganos como de tejidos y/o células.
2. La ingeniería tisular y el desarrollo futuro de líneas de células madre abren la posibilidad de que un único donante pueda proporcionar material terapéutico para cientos de pacientes.
3. Los tejidos puede extraerse, procesarse e implantarse en diferentes continentes
4. Existe el riesgo de transmisión de enfermedades a través de células y tejidos, por lo que se considera crucial la creación de un sistema sistema de comunicación de reacciones adversas, una vigilancia activa y el aprendizaje a través de los resultados recopilados.
5. Debido a la existencia de diferentes modelos nacionales de biovigilancia, unido a la circulación transfronteriza de sustancias de origen humano, se hace patente la necesidad de que los diferentes estados con sus respectivos programas sean capaces de establecer un sistema de intercomunicación.

Por un lado existe la posibilidad de que un único donante pueda donar en un Hospital / Establecimiento de Tejidos (ET), órganos y tejidos que sean implantados en el propio centro o que tengan como destino diferentes Bancos de Tejidos / ET, y por otro, puede darse que múltiples donaciones de sangre de cordón umbilical o islotes pancreáticos puedan usarse como terapia en un único paciente. Para hacer la situación más compleja, el pooling de donantes, las diferentes donaciones y los múltiples establecimientos necesitan garantizar la trazabilidad, así como las células autólogas cultivadas sobre una matriz de un donante, las donaciones repetidas para un único o varios receptores y los procesamientos que un Banco de Tejidos / ET puede subcontratar a terceros. The World Marrow Donor Association WMDA registró que entre 1997 a 2006, un 40% de las donaciones de células madre hematopoyéticas se han distribuido internacionalmente.

En 2006, las cuestiones transnacionales fueron ampliamente ejemplificadas cuando la FDA (US Food and Drugs Administration) decidió la retirada de tejidos puestos en circulación, al descubrirse por la BTS (Biomedical Tissue Services) que en Nueva York determinados tejidos se habían obtenido de forma fraudulenta sin el previo consentimiento familiar de los donantes fallecidos, ni el cribaje pertinente. Se "robaron" aproximadamente 1000 cadáveres y ello afectó a miles de receptores en todo el mundo. Los tejidos fueron retirados de Europa, Japón, Canadá y Reino Unido.

Claramente, la trazabilidad de tejidos y células se hizo indispensable.

Esta compleja situación propició que los redactores de la Directiva 2004/23/EC se plantearan la necesidad de exigir determinados procedimientos para asegurar la trazabilidad de las donaciones a nivel europeo. Para ello se postuló la necesidad de un único Sistema Europeo de Códigos para Células y Tejidos.

El Centro Europeo de Normalización-Estandarización (CEN), creó en Abril de 2007 un Workshop abierto a todos los actores, sobre Códigos de Información y Trazabilidad de Células y Tejidos humanos con la idea de identificar cómo, a través de la

estandarización, se podría contribuir a una correcta implementación de los requisitos establecidos en la Directiva en lo que se refiere a trazabilidad y codificación.

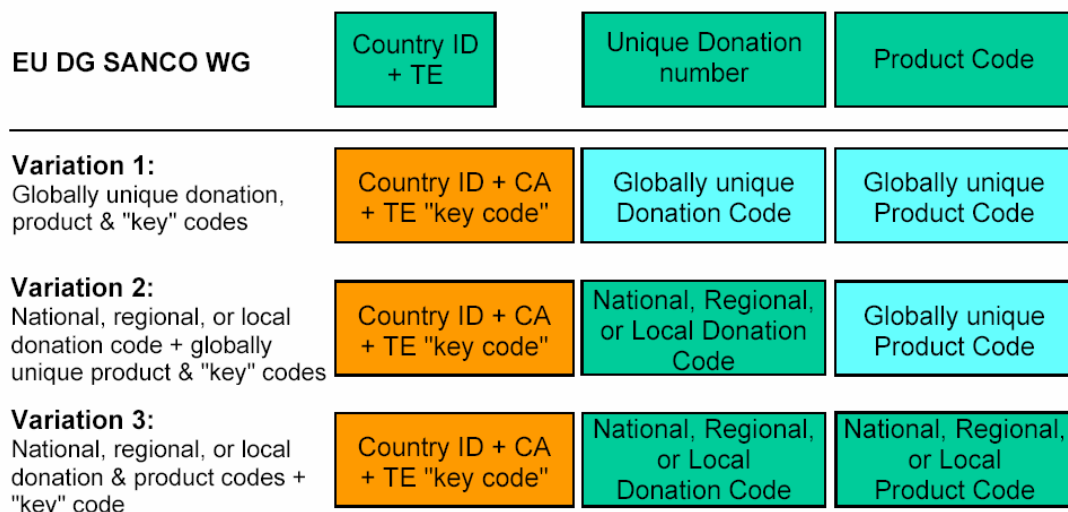
Los sistemas de codificación son un modo de presentar información de manera textual, por ejemplo la descripción de un producto, y de evitar las diferentes barreras semánticas en diferentes idiomas. A su vez, la capacidad de interpretación humana es aconsejable en el etiquetado mientras que la simbología permite un procesamiento informático. Un sistema de gestión de los códigos permite dirigir la relación entre representaciones textuales y codificadas, siendo típicamente la responsabilidad de una organización independiente, normalmente sin ánimo de lucro y bajo un comité de representación, y que actúa en interés de los stakeholders.

Un sistema de codificación de células o tejidos sustenta la trazabilidad a través de una identificación única del material, una combinación entre la descripción del producto, el ET y la información referente al procesamiento. Con ello se facilita el intercambio de productos, el control de stocks y la integración de la información en los hospitales. La codificación vence barreras lingüísticas, respalda un control tanto ético como legal y puede facilitar la comunicación entre software y la información exigida a los ET por las Autoridades Competentes y la CE.

La asignación de un código desde el momento de la donación hasta la disponibilidad del producto acabado y su asociación a la historia del paciente receptor permiten una trazabilidad

perfecta. En algunos países europeos, un requisito indispensable de trazabilidad es que la asignación y control del código se realice por entidades reconocidas, a menudo las propias Autoridades Competentes.

El Workshop del CEN, hizo un llamamiento a los sistemas existentes de codificación a fin de evaluar por parte de un panel de expertos, su correspondencia con los requisitos planteados. De entre los sistemas presentados, el ISBT128, que incorpora definiciones, tablas de referencias, mecanismos de entrega y varios aspectos relacionados con el etiquetado, fue seleccionado como el único sistema propiamente de codificación. Sin embargo, este sistema está asociado con un único código de TE, tanto a nivel local como nacional, mientras que para algunos países tanto el origen (unidad de donación) como los Bancos de Tejidos - ET (que puede ser más de uno), deben estar identificados en el código, no siendo posible en las estructuras existentes del ISBT128. El consejo de administración del ISBT128 (ICCBBA) ofreció introducir un nuevo elemento (Key Code) para solventar este problema, y que a la vez garantizaría la consistencia y compatibilidad con el ISBT actual. Una vez resuelto el problema de espacio del ISBT128, el Key Code se utilizó para crear una solución con tres posibles variaciones, todas precedidas por el Key Code y en conformidad con los requisitos postulados por el grupo de trabajo de EU DG Sanco. En el siguiente diagrama pueden apreciarse las tres variaciones:



En la primera variación, conseguimos un único código global, añadiendo el key code al código de donación y producto del ISBT-128. En la segunda variación, el key code se complementa con un número único de donación gestionado a nivel nacional, regional o local, seguido de un código de producto que podría ser común al del ISBT-128. Por último la tercera variación, únicamente comparte con las demás el key code, siendo tanto el código de donación como el de producto generados a nivel nacional, regional o local, y por tanto ciegos para el resto. Este sistema permite progresar entre las variaciones y ofrecer a los diferentes sectores de un mismo estado la posibilidad de utilizar diferentes variaciones, todas ellas compatibles las unas con las otras gracias al uso del Key Code.

Todas las variaciones muestran ventajas y desventajas, pero lo cierto es que todas ellas son conformes con los requisitos y especificaciones del grupo de trabajo de SANCO y compatibles entre ellas gracias al Key Code, que garantiza una mínima información común.

El Sistema de Codificación Europeo dará lugar a cambios operacionales y además los planes de implementación deberán incorporar las fases de transición. Se ha recomendado que DG SANCO cree un comité encargado de asegurar que se cumplen un mínimo de requisitos acordados, apoyar la implementación, crear un foro para supervisar la definición del Key Code con el ICCBBA y ser un punto de referencia y consejo tanto para los Estados Miembros como para los establecimientos de tejidos. El ICCBBA ha sugerido por un lado la posibilidad de nombrar un intermediario con su comité y que dicho miembro sea nominado por la UE, y ha manifestado la necesidad de garantizar que toda la información de ICCBBA pase a un tercero en el caso que ICCBBA pueda cesar su actividad.

Los estados miembros tendrán que tener en cuenta los requerimientos de hardware, software y formación dentro de sus jurisdicciones, así como el modo en el que los ET crean, asignan y controlan los códigos y números de donación. A su vez, los estados miembros necesitan desarrollar una política capaz de sostener un sistema de doble

etiquetado durante un periodo determinado, etiquetado de materiales importados y exportados, así como un posible etiquetado retrospectivo del inventario.

La trazabilidad es una herramienta esencial de seguridad, que puede garantizarse a través de un código y la información que dicho código representa. Los sistemas español e italiano de trazabilidad se han ofrecido como modelo que puede resultar muy útil para otros estados miembros. Las conclusiones del workshop se han enviado para su aprobación en abril y su posterior publicación a lo largo de 2008. Esta apasionante innovación ayudará a mejorar la seguridad de las sustancias de origen humano en Europa.

Estudio de la capacidad de proliferación celular de los condrocitos, frescos y criopreservados, procedentes de cartílago superficial versus profundo

M^a Esther Rendal Vázquez¹, Silvia Díaz Prado^{2 y 3}, Enma Muiños López², Margarita Rodríguez Cabarcos¹, Tamara Hermida Gómez², Javier Barallobre Barreiro², P. Filgueira Fernández², M^a José Sánchez Dopico², Cándido Andión Núñez¹, Francisco Blanco García²

(1) Unidad de Criobiología.
(2) Área de Terapia Celular.

Centro de Investigación Biomédica-INIBIC
CIBER-Bioingeniería Biomateriales Nanomedicina
La Coruña

(3) Dpto de Medicina Universidad de La Coruña

Resumen

Introducción: La terapia celular basada en el implante de condrocitos autólogos se utiliza actualmente para reparar defectos focales del cartílago articular. Este método consiste básicamente en inyectar condrocitos cultivados *in vitro* en la lesión condral cubierta por periostio. Esta técnica presenta algunas limitaciones, de entre todas ellas la capacidad de proliferación celular de los condrocitos es la más restrictiva. Esta capacidad proliferativa viene determinada no sólo por las condiciones

de conservación de los condrocitos hasta el momento del implante sino también por la procedencia de los mismos, es decir, si proceden de una biopsia de cartílago superficial o profundo. **Objetivos:** Comparar la capacidad proliferativa de los condrocitos procedentes de cartílago articular superficial versus profundo y estudiar el efecto de la criopreservación sobre la proliferación celular.

Materiales y Métodos: El estudio comprendió 11 muestras de cartílago sano. De cada uno de los especímenes se separó el cartílago superficial del profundo y se repartieron 4 alícuotas de cada muestra, 2 conteniendo células procedentes de cartílago superficial y otras 2 de cartílago profundo. De 1 alícuota superficial y 1 alícuota profunda se ensayó la proliferación celular a los 3, 6 y 9 días. Las otras 2 alícuotas, también superficial y profunda, se criopreservaron a -196°C durante 3 meses, transcurrido este tiempo se procedió a la descongelación y a la realización de los mismos ensayos de proliferación que los condrocitos frescos. **Resultados:** Los condrocitos frescos estimulados, procedentes tanto de cartílago superficial como profundo, mostraron un incremento en la capacidad proliferativa transcurridos 3 días con respecto al grupo control no estimulado, obteniéndose los mayores valores transcurridos los 9 días (0,046 vs 0,028 p<0,05). Con respecto a las células congeladas estimuladas no se observó ningún incremento estadísticamente significativo en la capacidad proliferativa, ni en el cartílago superficial ni en el profundo, a los tres tiempos ensayados (0,051 en superficial vs 0,043 en profundo) y con respecto al grupo control no estimulado. **Conclusiones:** Los mayores índices de proliferación celular se obtuvieron con condrocitos frescos procedentes de cartílago profundo. Estos resultados indican que no sólo la procedencia sino también la criopreservación celular afecta a la capacidad proliferativa de los condrocitos y por tanto a la capacidad de éstos para regenerar cartílago. Estas consideraciones deben tenerse en cuenta para su empleo en terapia celular (autotransplante de condrocitos) para reparar lesiones focales del cartílago articular humano.

Palabras clave: Terapia Celular, Autotransplante de condrocitos, lesiones focales, cartílago articular hialino, fibrocartilago, Osteoartritis.

Introducción

La capacidad de reparación del cartílago articular es muy limitada, debido principalmente a que es un tejido avascular (1-2). Actualmente no existen tratamientos farmacológicos eficaces para curar la artrosis, aunque algunos fármacos retardan su progresión (3). Los tratamientos quirúrgicos no son una forma de tratar la artrosis aún así constituyen una herramienta importante en la reparación del cartílago de aquellas lesiones que si no se reparan o tratan adecuadamente acaban produciendo irremediamente una artrosis secundaria. La mayoría de los esfuerzos realizados en la actualidad con la finalidad de reparar una lesión del cartílago articular van encaminados a superar las limitaciones que posee este tejido para cicatrizar las lesiones y a facilitar el acceso del sistema vascular (2). Pero el problema es que se genera un tejido de reparación fibrocartilaginoso que no reúne las condiciones del cartílago articular hialino natural. Para evitar la necesidad de reemplazo protésico, se desarrollaron diferentes tratamientos celulares con el objetivo de formar un tejido de reparación con estructura, composición bioquímica y comportamiento funcional iguales que los del cartílago articular natural (4).

La terapia celular mediante el implante de condrocitos autólogos (4-10) se utiliza para reparar lesiones focales del cartílago articular obteniéndose un tejido de reparación de mayor calidad. Actualmente esta técnica supone una alternativa terapéutica para reparar lesiones focales del cartílago articular (4). Este procedimiento implica la obtención, mediante artroscopia, de explantes de cartílago articular de zonas poco comprometidas con la carga. De las biopsias de cartílago se aíslan los condrocitos, que se cultivan en el laboratorio, en condiciones *in vitro*, hasta que se obtiene un número apropiado (10-12 millones de células) para implantar en la zona del defecto condral (11). Esta técnica presenta algunas limitaciones, de entre todas ellas la capacidad de proliferación celular de los condrocitos es la más restrictiva.

El objetivo del presente estudio consistió no sólo en la valoración de la capacidad proliferativa de los condrocitos conservados

hasta el momento de su implante en el paciente sino también en la valoración de la capacidad de éstos en función de su procedencia, biopsia de cartílago superficial o profundo.

Materiales y Métodos

1. Obtención y procesamiento de las muestras de cartílago articular:

Las muestras de cartílago articular normal se obtuvieron de donaciones de pacientes que fueron sometidos a cirugía de reposición o amputación de sus miembros inferiores en el Banco de Tejidos y en el Servicio de Autopsias del C.H.U. Juan Canalejo de La Coruña. El estudio comprendió un total de 11 muestras, todas ellas procedentes de diferentes donantes de tejidos. Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de Galicia y se obtuvo el consentimiento informado de cada uno de los pacientes.

En condiciones estériles, y a partir de cada uno de los donantes, se extrajo el cartílago (Figura 1). Para ello se cortó el cartílago de los cóndilos femorales y los platos tibiales. Posteriormente las secciones de cartílago se lavaron con Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK) suplementado únicamente con antibiótico penicilina (100 unidades/ml)-estreptomocina (100 µg/ml) (Gibco, Invitrogen, USA). A continuación, de cada uno de los especímenes se procedió a separar el cartílago superficial del profundo. Posteriormente se trituró, por un lado el cartílago superficial y por otro el cartílago profundo, y se sometió cada uno de ellos de forma separada a una digestión enzimática en agitación con tripsina 1% (Sigma, St. Louis, MO) durante 15 min a 37°C. Seguidamente, y tras retirar la tripsina, se incubó el cartílago en un medio de digestión que consistió en colagenasa tipo IV 2 mg/l (Sigma, St. Louis, MO) durante 12 a 16 h. Trascorrido este tiempo se retiró este medio de digestión, que contenía las células, y se le añadió DMEM nuevo para lavar las células y centrifugar a 200 x g durante 10 min. Se contó el número de condrocitos obtenidos, mediante contaje en una Cámara Neubauer usando el colorante azul tripán 0,4% (Sigma, St. Louis, MO) para valorar la viabilidad de la muestra, y se separaron 4 alícuotas con igual número de

células, 2 de ellas conteniendo condrocitos procedentes de cartílago superficial y las otras 2 procedentes de cartílago profundo (Figura 2). Una alícuota de cada uno de los cartílagos se sembró en DMEM con un 20% de suero bovino fetal (SBF) para realizar los ensayos de proliferación celular. Además, se desarrollaron micromasas para poder realizar estudios de histología e inmunofluorescencia en cada uno de los pacientes. Las otras dos alícuotas de cada uno de los cartílagos se criopreservó a -196°C durante 3 meses. Transcurrido este tiempo se procedió a la descongelación y al cultivo de las mismas. Después de 2 subcultivos se realizaron los mismos ensayos de proliferación y desarrollo de micromasas que en los condrocitos frescos.

2. Cultivo de condrocitos

Los condrocitos se sembraron en medio de cultivo DMEM suplementado con 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 1% de glutamina y 10% de SBF (Gibco, Life Technologies, Paisley, UK). Se incubaron en una estufa de cultivo (Steri-Cult 200 Incubator HEPA class 100, Huco Erlöss) a 37°C en una atmósfera húmeda conteniendo un 5% de CO₂. Estos cultivos en aproximadamente dos semanas alcanzaron la confluencia, se realizó un primer subcultivo, y posteriormente estas células fueron empleadas para los ensayos de proliferación y desarrollo de micromasas.

3. Ensayos de proliferación celular

Se sembraron 50.000 células/pocillo (1ml/pocillo), tanto células procedentes de cartílago superficial como de cartílago profundo, en placa. Los condrocitos se crecieron en medio de cultivo DMEM con 10% de SBF durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se le retiró el medio de cultivo a las células y se procedió a la estimulación. Para ello se le añadió medio fresco DMEM al 10% de SBF, excepto en los controles que se les añadió medio fresco DMEM sin SBF. Transcurridos 3,6 y 9 días de la estimulación las células se lavaron con PBS 1% y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos. Una vez retirado el paraformaldehído se realizaron 2 lavados con PBS al 1%, para posteriormente añadir azul de toluidina al 0,5% durante 15 minutos. Se retiró el azul de

toluidina y se realizaron 2 lavados con PBS al 1% con el fin de retirar el colorante inespecífico. Las células se solubilizaron con 1,5 ml de SDS al 1% y se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 570 nm. Los cálculos que se muestran se corresponden con la diferencia de las absorbancias leídas en cada una de las muestras, crecidas en medio DMEM al 10% de SBF, con respecto a su control, crecido en medio DMEM al 0% de SBF, para cada uno de los tiempos ensayados. Cada uno de los valores mostrados son media de dos experimentos independientes.

4. Formación de micromasas

Las células en cultivo procedentes de los diferentes donantes se levantaron por tratamiento con tripsina-EDTA. Se centrifugaron 5×10^5 células a 1500 r.p.m. durante 10 minutos y el agregado celular foadado se cultivó en medio DMEM al 10% de SBF durante 3 semanas. El medio de cultivo se cambió cada 3-4 días. Transcurridas las 3 semanas las micromasas se incluyeron en medio de congelación OCT y posteriormente se valoraron mediante tinción histológica (hematoxilina-eosina) e inmunofluorescencia (Ki67).

5. Técnicas histológicas

A partir de las micromasas congeladas, y con la ayuda de un microtomo, se obtuvieron secciones de 4 µm que se tiñeron con hematoxilina-eosina.

6. Técnicas de inmunofluorescencia

Las secciones de 4 µm desparafinadas e hidratadas se incubaron con el anticuerpo *Anti-Human Ki-67* y *Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen* específico para PCNA humano (Novocastra, UK) específico para ki67 humano. Como anticuerpo secundario se empleó *Goat Anti-Mouse RPE* (DakoCytomation). Las células se contratiñeron con un fluoróforo nuclear de contraste, DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride*). Los controles negativos de la técnica resultaron de la omisión del anticuerpo primario. Las muestras se visualizaron empleando el microscopio de fluorescencia Olympus BX61 con los filtros apropiados.

7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron empleando el programa informático SPSS 12.0 para Windows, considerándose significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

Capacidad proliferativa de los condrocitos procedentes de cartílago articular superficial *versus* profundo: Efecto de la criopreservación

De los 11 donantes de cartílago se obtuvieron 4 grupos de células a estudio: frescas procedentes de cartílago superficial (N=11); frescas procedentes de cartílago profundo (N=11), congeladas procedentes de cartílago superficial (N=8) y congeladas procedentes de cartílago profundo (N=10).

En el grupo de las células frescas estimuladas, tanto procedentes de cartílago superficial como de profundo, se produjo un incremento en la capacidad proliferativa de los condrocitos con respecto a sus controles no estimulados. A los 3 y a los 9 días se observó mayor capacidad proliferativa de los condrocitos procedentes de cartílago profundo que de cartílago superficial resultando en un incremento de 2,13 y 1,75 veces respectivamente. A los 6 días de la estimulación no se observaron diferencias en la capacidad proliferativa entre condrocitos superficiales y profundos (Figura 3).

En el grupo de las células congeladas estimuladas, e independientemente de la procedencia de la biopsia del cartílago, también se produjo un incremento en la capacidad proliferativa de los condrocitos con respecto a sus controles no estimulados. También la mayor capacidad proliferativa se observó a los 3 y a los 9 días de la estimulación, si bien no fueron estadísticamente significativos. En este caso, y al contrario de lo observado para las células frescas, los mayores valores se obtuvieron en las biopsias de cartílago superficial aunque los incrementos resultantes además de no ser estadísticamente significativos tomaron valores inferiores a los observados en los condrocitos frescos, éstos fueron de 1,64 y 1,3

veces respectivamente. Al igual que en las células frescas en los condrocitos congelados, y a los 6 días de la estimulación, tampoco se observaron diferencias en la capacidad proliferativa entre condrocitos superficiales y profundos (Figura 4).

Comparando ambos grupos de células (frescas *versus* profundas) con la procedencia de la biopsia del cartílago (superficial *versus* profunda) se observó que los condrocitos que mayor capacidad proliferativa tienen son los congelados procedentes de biopsia superficial (Figura 5). En el grupo de células frescas estimuladas se observó un incremento en la capacidad proliferativa en la biopsia profunda con respecto a la superficial (0,046 vs 0,028 respectivamente, $p < 0,05$) que resultó ser estadísticamente significativo. Para el caso de las células congeladas estimuladas se observó lo contrario, es decir, una mayor capacidad proliferativa en la biopsia superficial con respecto a la profunda (0,051 vs 0,043 respectivamente, $p > 0,05$) pero que no resultó ser estadísticamente significativa.

El estudio inmunohistoquímico de las micromasas utilizando Ki67 y PCNA revelan una mayor expresión de estas proteínas en condrocitos frescos superficiales que en condrocitos frescos profundos (2,9% de positividad vs 1,87% para el Ki-67 y 2,4% vs 0,2% respectivamente) (Figura 6). Estos resultados no confirman los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación.

Discusión

El cartílago es un tejido conectivo especializado, avascular, aneural y alinfático, constituido por dos elementos, uno celular y otro extracelular, la matriz. En concreto, el cartílago articular es hialino y en cuanto a su composición los condrocitos abarcan un 2-3% y la matriz un 97-98 % del volumen total del cartílago. La población de condrocitos, el único elemento celular del cartílago articular, es reducida y tiende a disminuir con la edad. Su función se basa en la biosíntesis, mantenimiento y recambio periódico de los componentes de la matriz extracelular, manteniendo así, en condiciones normales y en cartílago adulto, un equilibrio entre los procesos anabólicos y catabólicos (12-13).

El cartílago articular está expuesto a las agresiones mecánicas exógenas. A lo largo de nuestras vidas las cargas mecánicas que soportan nuestras articulaciones pueden exceder el límite tolerado por la estructura del cartílago provocando su desgaste. Este desgaste consiste en la pérdida de material de superficies sólidas por el efecto de una acción mecánica. Existen factores adicionales que favorecen el proceso de desgaste del cartílago o aceleran su evolución. Entre los más importantes están las condiciones mecánicas defectuosas, el agotamiento funcional, ya sea profesional o deportivo, y el exceso de peso (14). En este sentido, tanto las agresiones mecánicas como el traumatismo del cartílago por contusión o el depósito de cristales contribuyen asimismo a este proceso. La artrosis u osteoartritis (OA) es una patología articular degenerativa caracterizada por una alteración en la integridad del cartílago y del hueso subcondral. Es la enfermedad articular más prevalente relacionada con el envejecimiento pues hasta el 80% de las personas mayores de 75 años presentan alteraciones radiológicas de artrosis, si bien en muchos casos no presentan manifestaciones clínicas y se caracteriza por la degeneración del cartílago articular (15). Este proceso degenerativo es conducido por la activación del único tipo celular presente en el cartílago maduro, los condrocitos (16). En la evolución de la artrosis influyen el tamaño de la lesión, la profundidad, la integridad del tejido que la rodea, la edad y el peso de los pacientes entre otros.

El implante de condrocitos autólogos es uno de los tratamientos, basados en terapia celular, más efectivo para el tratamiento de defectos focales de cartílago articular (17-18). Actualmente se emplea con éxito en pacientes con un perfil determinado, jóvenes y sin daño en otras articulaciones (19-20). A pesar de ello esta técnica presenta algunas limitaciones (4; 21), de entre todas ellas la capacidad de proliferación celular de los condrocitos es la más importante. Esta capacidad proliferativa depende no sólo de las condiciones de conservación de los condrocitos hasta el momento del implante (22) sino también de la procedencia de los mismos, es decir, si proceden de una biopsia de cartílago superficial o profundo.

El presente estudio demostró las diferencias existentes entre la capacidad proliferativa de los condrocitos procedentes de biopsias de cartílago articular superficial frente a biopsias de cartílago más profundas. En concreto los condrocitos frescos procedentes de biopsias más profundas mostraron mayor capacidad proliferativa. Todavía se desconocen los mecanismos por los cuales los condrocitos procedentes de capas más profundas de cartílago articular humano poseen una mayor capacidad proliferativa. A pesar de que la población de condrocitos humanos en el cartílago articular humano se considera una población celular homogénea, recientemente algunos investigadores han demostrado que algunas células aisladas del cartílago articular humano poseen propiedades características de las células madre adultas (4; 11; 23-24). En este sentido se podría pensar que las biopsias procedentes de zonas más profundas podrían contener un mayor número de células con características de células madre, pues se sabe que las células madre adultas tienen una mayor tasa de proliferación que los propios condrocitos adultos, los cuales se replican más lentamente. Publicaciones recientes resaltan que las células madre adultas constituyen una herramienta potencial, mejor que el empleo de condrocitos maduros, para el tratamiento de lesiones del cartílago articular humano basado en la terapia celular (4; 11; 25). El estudio inmunohistoquímico de las micromasas utilizando Ki67 y PCNA no confirmó los resultados obtenidos con condrocitos frescos en los ensayos de proliferación celular. Esto puede ser debido a que una vez que las células se precipitan para dar lugar a los sedimentos celulares que conducen a la formación de la micromasa las células dejan de crecer y de proliferar.

Durante el proceso de aislamiento y cultivo de condrocitos para el autotransplante pueden presentarse ciertos problemas que provocan que el implante de estas células no sea adecuado, ya sea porque exista riesgo de contaminación o porque las células aisladas no proliferan. Para mayor seguridad algunas de las células extraídas del cartílago deben ser criopreservadas. Estudios previos realizados por Rendal-Vázquez y colaboradores (2001) demostraron que la capacidad y la supervivencia de los condrocitos se reducía

tras la criopreservación, acentuándose sobre todo cuando la congelación no se hacía de forma programada (tasa de congelación -1°C/min hasta -40°C, -2°C/min hasta -60°C y 5°C/min hasta -150°C). En este sentido en el presente trabajo nos planteamos estudiar la capacidad proliferativa de los condrocitos criopreservados, empleando la congelación programada, tanto procedentes de biopsias de cartílago superficial como de profundo. Para el caso de las células criopreservadas se observó lo contrario a lo ocurrido con células frescas, es decir, se obtuvo una mayor capacidad proliferativa en la biopsia superficial con respecto a la profunda pero que no obtuvo valores estadísticamente significativos. Estos resultados indican que la criopreservación celular afecta a la capacidad proliferativa de los condrocitos y por tanto a la capacidad de éstos para regenerar cartílago. Estas consideraciones deben tenerse en cuenta a la hora de su empleo en terapia celular para reparar lesiones focales del cartílago articular mediante autotransplante de condrocitos.

Financiación

Silvia Díaz Prado es beneficiaria de un contrato Isidro Parga Pondal (Xunta de Galicia, España).

Bibliografía

- Mankin HJ. The response of articular cartilage to mechanical injury. *J Bone Joint Surg Am* 1982; 64:460-6.
- Resinger C, Vécsei V, Marlovits S. Therapeutic options in the treatment of cartilage defects. *Techniques and indications. Radiologe* 2004; 44: 756-62.
- Brandt KD, Mazzuca SA. Experience with a placebo-controlled randomized clinical trial of a disease-modifying drug for osteoarthritis: the doxycycline trial. *Rheum Dis Clin North Am* 2006; 32: 217-34.
- Fuentes-Boquete IM, Arufe Gonda MC, Díaz Prado S, Hermida Gómez T, Blanco García FJ. Tratamiento de lesiones del cartílago articular con terapia celular. *Reumatol Clin* 2007; 3 Supl 3: S63-9.
- Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-95.
- Minas T, Chiu R. Autologous chondrocyte implantation. *Am J Knee Surg* 2000; 13: 41-50.
- Richardson JB, Caterson B, Evans EH, Ashton BA, Roberts S. Repair of human articular cartilage after implantation of autologous chondrocytes. *J Bone Joint Surg Br* 1999; 81: 1064-8.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9 year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop* 2000; 374: 212-34.
- Roberts S, Hollander AP, Caterson B, Menage J, Richardson JB. Matrix turnover in human cartilage repair tissue in autologous chondrocyte implantation. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 2586-98.
- Moriya T, Wada Y, Watanabe A, Sasho T, Nakagawa K, Mainil-Varlet P, Moriya H. Evaluation of reparative cartilage after autologous chondrocyte implantation for osteochondritis dissecans: histology, biochemistry, and MR imaging. *J Orthop Sci* 2007, 12: 265-73.
- Tallheden T, Brittberg M, Peterson L, Lindahl A. Human articular chondrocyte-plasticity and differentiation potential. *Cell Tissues Organs* 2006; 184: 55-67.
- Blanco FJ. Introducción a la fisiopatología del cartílago articular y de la remodelación ósea. En: *Técnicas de Investigación Básica en Reumatología. Monografías SER. 2007.* FJ Blanco García, J de Dios Cañete Crespillo, JL Pablos Álvarez. Médica Panamericana. Madrid.
- López-Armada MJ, Caramés B, Blanco García FJ. Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad?. *Rev. Esp. Reumatol* 2004; 31: 379-93.
- Scott CC, Athanasiou KA. Mechanical impact and articular cartilage. *Crit Rev Biomed Eng* 2006; 34: 347-78.

15. Blanco FJ, Guitian R, Vazquez-Marful E, de Toro FJ and Galdo F. "Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology". *Arthritis Rheum* 1998, 41: 284-249.

16. Aigner T, Kurz B, Fukui N, Sandell L. "Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis". *Curr Opin Rheumatol* 2002; 14: 578-84.

17. Gigante A, Bevilacqua C, Ricevuto A, Mattioli-Belmonte M, Greco F. Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007; 15: 88-92.

18. Chanlalit C, Kasemkijwattanamd C, Varavit V. Autologous chondrocyte implantation for traumatic large cartilage defect. *J Med Assoc Thai* 2007; 90: 1435-42.

19. Gimeno Longas MJ, de la Mata Llord J. Métodos de estudio del cartilago articular y hueso. En: *Técnicas de Investigación Básica en Reumatología. Monografías SER. 2007.* FJ Blanco García, J de Dios Cañete Crespillo, JL Pablos Álvarez. Médica Panamericana. Madrid.

20. Carossino AM, Recenti R, Carossino R, y col. Methodological models for in vitro amplification and maintenance of human articular chondrocytes from elderly patients. *Biogerontology* 2007; 8: 483-98.

21. Gimeno MJ, Maneiro E, Rendal E, Ramallal M, Sanjurjo L, Blanco FJ. Cell therapy: a therapeutic alternative to treat focal cartilage lesions. *Transplant. Proc.* 2005; 37: 4080-3.

22. Rendal-Vázquez ME, Maneiro-Pampín E, Rodríguez-Cabarcos M, Fernández-Mallo O, López de Ullibarri I, Andiñ-Núñez C, y col. Effect of cryopreservation on human articular chondrocyte viability, proliferation, and collagen expression. *Cryobiology* 2001; 42: 2-10.

23. Alsalameh S, Amin R, Gemba T, y col. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1522-32.

24. Dowthwaite GP, Bishop JC, Redman SN, y col. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 2004, 117: 889-97.

25. Raghunath J, Salacinski HJ, Sales KM, Butler PE, Seifalian AM. Advancing cartilage tissue engineering: the application of stem cell technology. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16: 503-9.

FIGURAS

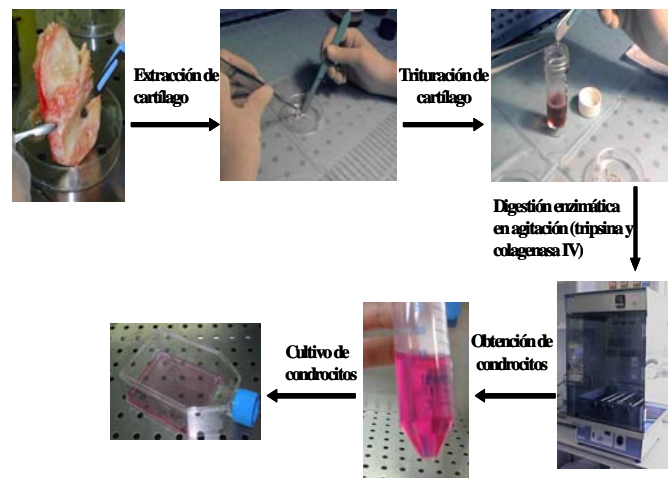


Figura 1. Visión general del procesamiento de la muestra de cartilago articular.

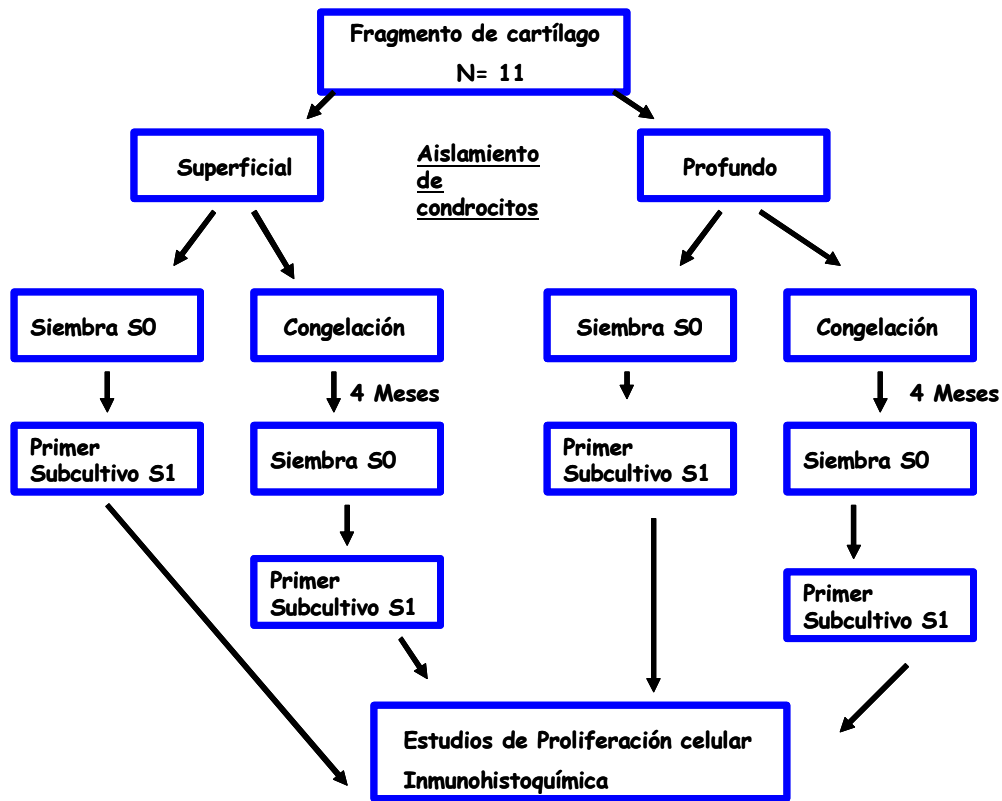


Figura 2. Diseño del estudio.

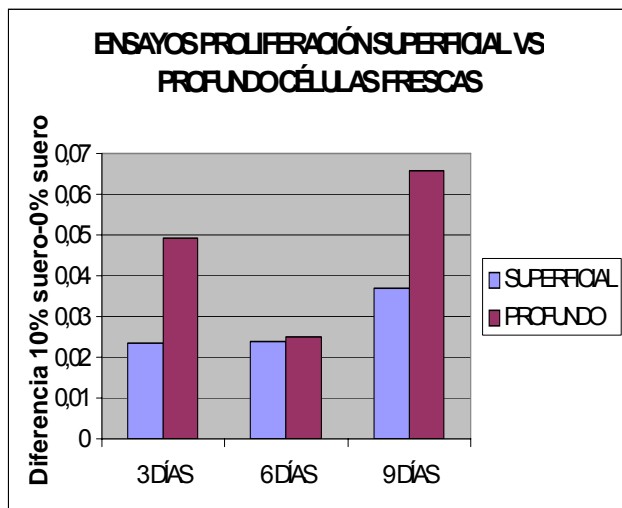


Figura 3. Capacidad proliferativa, a los 3, 6 y 9 días, de los condrocitos frescos procedentes de biopsia de cartílago superficial y profunda a los tres tiempos ensayados.

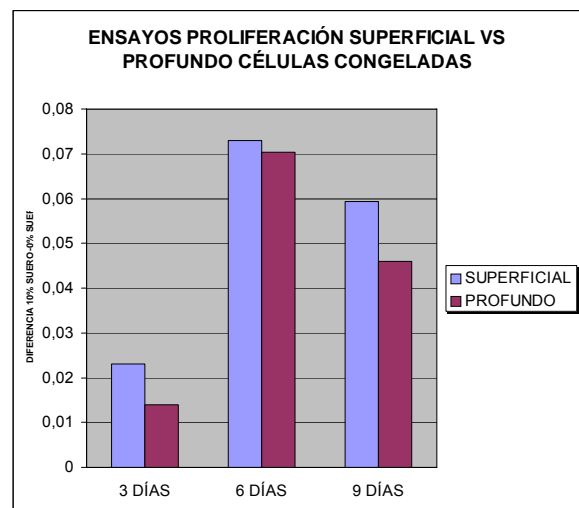


Figura 4. Capacidad proliferativa, a los 3, 6 y 9 días, de los condrocitos congelados procedentes de biopsia de cartílago superficial y profunda.

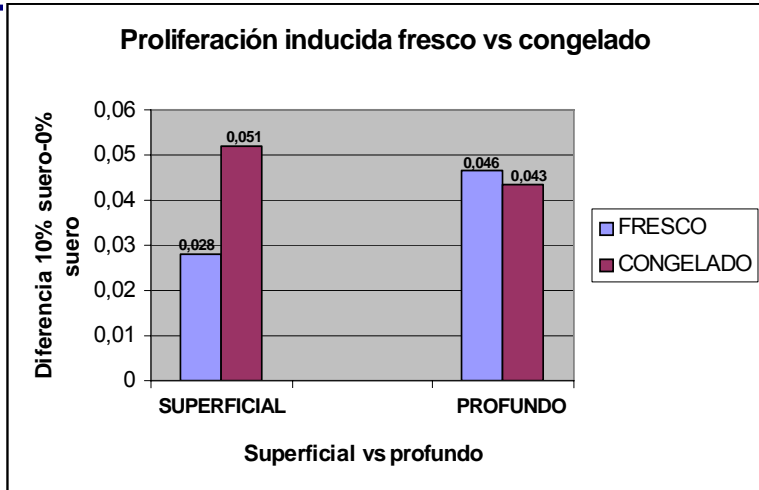


Figura 5. Comparación de la capacidad proliferativa total de los dos grupos de células (frescas versus profundas) con la procedencia de la biopsia del cartílago (superficial versus profunda).

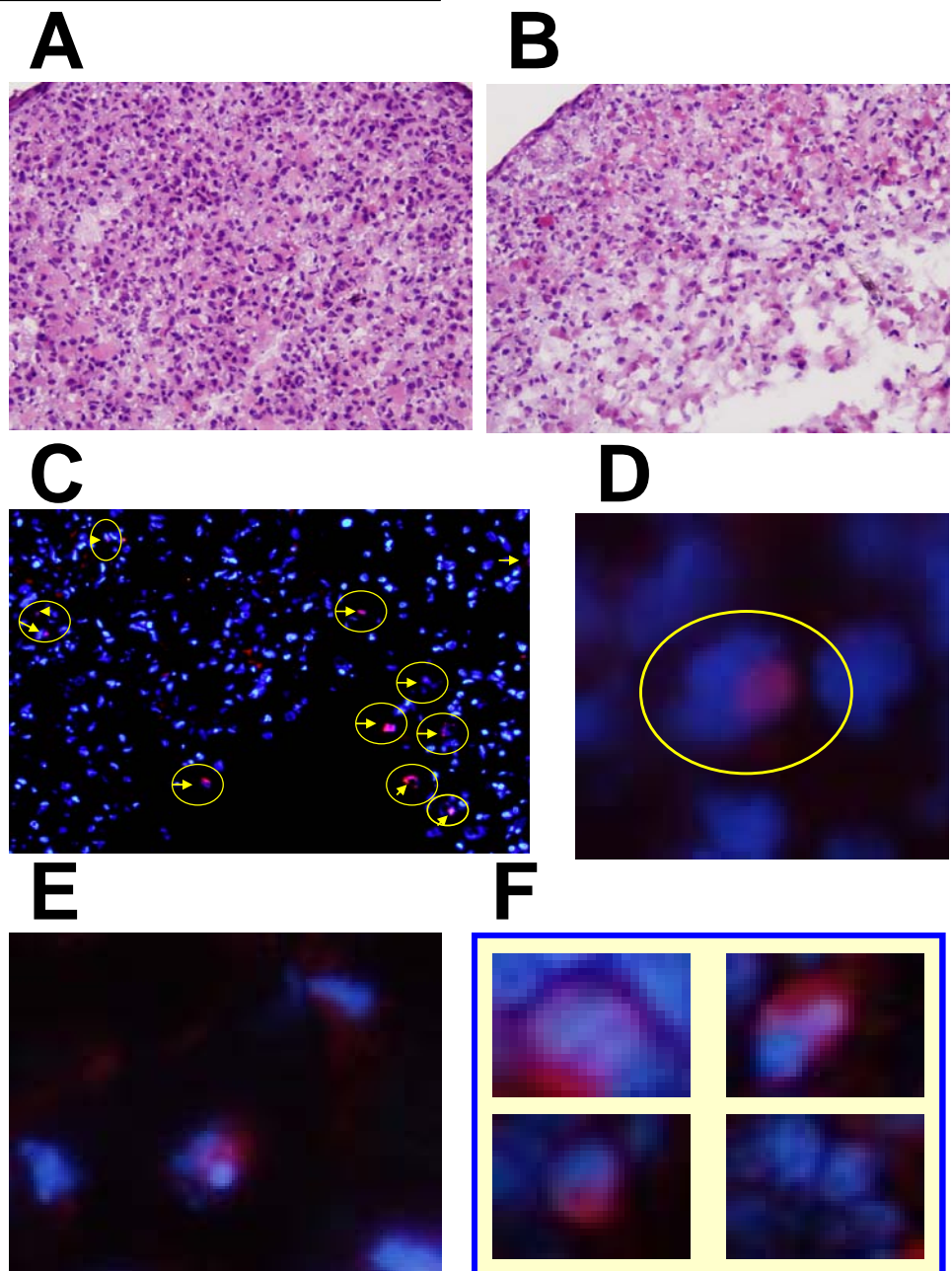


Figura 6. Estudios histológicos (A y B) e inmunohistoquímicos (C-F) de las micromasas. Micromasas de condrocitos frescos procedentes de biopsia superficial, Hematoxilina-Eosina 20X (A), Ki-67 20X y 40X (C y D), PCNA 40X (F). Micromasas de condrocitos frescos procedentes de biopsia profunda, Hematoxilina-Eosina 20X (B) y PCNA 40X (E).



Boletín de Inscripción o Modificación de Datos

SOLICITUD COMO SOCIO NUMERARIO

Nombre y apellidos : _____	DNI : _____	
Centro de trabajo : _____	Tlf : _____	
Dirección : _____	Población : _____	
Provincia : _____	Cód. Postal: _____	E.mail : _____
Domicilio particular: _____	Cód. Postal: _____	
Población: _____	Provincia: _____	Tlf: _____
Curriculum del solicitante		
Profesión: _____	Especialidad: _____	Cargo: _____
Áreas de trabajo : _____		
Socios que avalan la solicitud: 1).....		
2)		

SOLICITUD COMO SOCIO PROTECTOR

Entidad solicitante: _____	CIF: _____	
Entidad pública o privada : _____	Tlf: _____	Fax: _____
Domicilio: _____	Cód. Postal: _____	
Población: _____	Provincia: _____	
Representante legal de la entidad D/ D ^a : _____		
Cargo que desempeña : _____		

De ser admitida mi solicitud, me comprometo a aceptar y cumplir los estatutos de la AEBT. Adjunto datos bancarios con los 20 dígitos reglamentarios y orden de pago domiciliada para abono de las cuotas anuales de la AEBT.

En _____ a _____ de _____ de 200 / Firma :

Enviar el formulario completo a : Dra **Esther Rendal - Secretaría AEBT** / Unidad Criobiología – Banco de Tejidos Hospital Teresa Herrera /Complejo Hospitalario Univ. Juan Canalejo / Avda de las Jubias, s/n / 15006 A Coruña

ORDEN DE DOMICILIACIÓN BANCARIA

A la atención del Sr. Director de la Oficina Bancaria

Por la presente y hasta nueva orden, se autoriza a la **ASOCIACION ESPAÑOLA DE BANCOS DE TEJIDOS** (NIF: G-96.465.133 y C/C: **0072-0167-14-0000178215**) a pasar los recibos correspondientes a la cuota anual de socio, fijada en la actualidad en 30 €/año .

Fecha: _____

DATOS BANCARIOS DEL SOLICITANTE (incluir 20 dígitos)

Entidad	Sucursal	D.C.	Número de cuenta

Firma:

Titular de la cuenta: _____
Domicilio de la Oficina: _____ Población _____
Cód. Postal: _____ Provincia: _____ Tlf: _____

De conformidad con lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de carácter personal y en la normativa de desarrollo, le informamos que los datos personales facilitados por Ud. serán incorporados a un fichero responsabilidad de la AEBT con el fin de hacer efectiva su alta como socio y permitir comunicaciones en relación con las actividades de los Bancos de Tejidos en general. La AEBT garantiza la adopción de las medidas necesarias para asegurar el tratamiento confidencial de dichos datos. La AEBT no cederá en ningún caso esta información a terceros no autorizados. Asimismo le informa de la posibilidad de ejercitar, conforme a dicha normativa, los derechos de acceso, rectificación y cancelación, dirigiendo un escrito a la siguiente dirección: Asociación Española de Bancos de Tejidos. C/ Ramón y Cajal, 25 9º Izq. 15006 A Coruña.