

## Artículo de investigación

## Resultados en la reparación experimental de lesiones osteocondrales en un modelo porcino mediante ingeniería de tejidos

F. Enrique Villalobos Córdoba,\* Cristina Velasquillo Martínez,\*\* Valentín Martínez López,\*\*\* Hugo Lecona Butrón,\*\*\*\* Baltasar Reyes Marín,\*\*\*\*\* Eréndira Estrada Villaseñor,\*\*\*\*\* Hilda Villegas Castrejón,\*\*\*\*\* Lilia Solís Arrieta,\*\*\*\*\* Rolando Espinosa Morales,\*\*\*\*\* Clemente Ibarra Ponce de León\*\*\*\*\*

Instituto Nacional de Rehabilitación

**RESUMEN.** *Objetivo:* Reparar lesiones experimentales osteocondrales en la rodilla de cerdos, mediante Ingeniería de Tejidos. *Material y métodos:* Se operaron 8 cerdos de 40 kg. Se obtuvieron biopsias de cartílago y periostio de su rodilla control. Se aislaron, cultivaron y se sembraron por separado células de cartílago y periostio en polímeros biodegradables de APL y APG, los cuales fueron fijados al fondo de un defecto osteocondral de la rodilla experimental del cerdo, con implantes bioabsorbibles de Mitek™. Después de 4 meses los cerdos fueron sacrificados y analizados, por resonancia magnética nuclear (RMN), evaluación macroscópica, histología, microscopio electrónico (ME), de barrido (MEB) y análisis de elementos por MEB. *Resultados:* Todos los defectos se llenaron de tejido similar a cartílago a la evaluación por RMN y examen visual. Se obtuvo cartílago similar a hialino en 3 defectos y fibrocartílago en 5. El ME demostró condrocitos en el tejido de reparación. El MEB demostró una buena integración al hueso y al tejido circundante. El análisis de elementos por MEB demostró la presencia de matriz

**SUMMARY.** *Objective:* To repair experimental osteochondral knee lesions in pigs using tissue engineering. *Material and methods:* Eight 40-kg pigs underwent surgery. Cartilage and periosteal biopsies of their control knee were taken. Cartilage and periosteal cells were independently isolated, cultured and seeded in biodegradable PGA and PLA polymers that were fixed on the bottom of an osteochondral defect in the pig's experimental knee, with bioabsorbable Mitek™ implants. Four months later the pigs were sacrificed and the knees were analyzed with nuclear magnetic resonance imaging (NMRI), macroscopic assessment, histology, electron microscopy (EM), scanning electron microscopy (SEM) and SEM element analysis. *Results:* All the defects were filled with cartilage-like tissue according to the NMRI evaluation and the visual examination. Hyaline-like cartilage was obtained in 3 defects and fibrocartilage in 5. The EM showed chondrocytes in the repair tissue. The SEM showed appropriate integration to the bone and the surrounding tissue. SEM element analysis showed sulphurized matrix attached to the bone

\* Médico Ortopedista, Residente del Postgrado en Artroscopía y Lesiones Deportivas (INR).

\*\* Jefe de la Unidad de Ingeniería de Tejidos (INR).

\*\*\* Adscrito a la Unidad de Ingeniería de Tejidos (INR).

\*\*\*\* Responsable del Bioterio y Cirugía Experimental (INR).

\*\*\*\*\* Jefe de División de Radiología eImagen (INR).

\*\*\*\*\* Médico adscrito al Servicio de Anatomía Patológica (INR).

\*\*\*\*\* Jefe del Departamento de Morfología Celular y Molecular (INR).

\*\*\*\*\* Adscrito al Departamento de Morfología Celular y Molecular (INR).

\*\*\*\*\* Jefe del Servicio de Reumatología (INR).

\*\*\*\*\* Jefe del Servicio de Ortopedia del Deporte y Artroscopía (INR).

Dirección para correspondencia:

Dr. Clemente Ibarra Ponce de León. Av. México-Xochimilco Núm. 289 Col. Arenal de Guadalupe, Deleg. Tlalpan. C.P. 14389. Jefatura del Servicio de Ortopedia del Deporte y Artroscopía, 5º piso del Edificio de Investigación. Instituto Nacional de Rehabilitación. Teléfonos: 5999 1000 ext. 19607 E-mail: clementeibarra@yahoo.com

**sulfatada adherida al hueso con predominio de calcio y fosfatos. Discusión:** Se crearon tejidos similares a los normales mediante Ingeniería de Tejidos. El sistema de fijación del polímero resultó ser efectivo.

**Palabras clave:** modelo animal, lesión, porcino, cultivo de tejido, cartílago.

**with calcium and phosphates as predominant elements. Discussion:** Tissue engineering enabled the production of tissues similar to normal ones. The polymer fixation system was effective.

**Key words:** experimental, chondral injury, animal model, pig, graft, culture tissue.

## Introducción

Se ha documentado que las lesiones traumáticas agudas al cartílago articular predisponen al desarrollo precoz de osteoartritis (OA), también denominada artrosis o enfermedad articular degenerativa.<sup>1,2</sup>

La osteoartritis (OA) constituye en la actualidad un grave problema de salud pública con un costo económico y social elevado. Se le considera la segunda causa de discapacidad en los Estados Unidos de América. Se estima además que 68% de los adultos mayores de 55 años de edad presentan evidencias radiográficas de OA y que la población de 65 años o más en los Estados Unidos, el 22% de su población total, padecen de algún tipo de OA, es decir, que 43 millones de personas o una de cada 6 personas padecen la enfermedad. Se estima que la estadística se incrementa y para el año 2020 59.4 millones de personas tengan OA. El costo anual de esta enfermedad se estimaba para el año 2000 en 95 billones de dólares.<sup>3</sup>

En México, existe una serie de 1,309 artroscopías de rodilla reportada en el Instituto Nacional de Rehabilitación, con prevalencia de lesiones condrales del 61.4%. Un 73.8% de estas lesiones es grado III-IV de Outerbridge, con una localización predominante a nivel patelofemoral (39.3%) y cóndilo femoral medial (27.8%). En una población con edad promedio de 37 años, la inminente evolución de lesiones condrales de alto grado hacia OA nos advierte del riesgo de convertirse en un problema de salud pública.<sup>4</sup>

En cuanto a las lesiones osteocondrales, que es el tema de este artículo, hay que recordar que existe una comunicación entre el hueso subcondral con sus nutrientes al defecto cartilaginoso, formándose un tejido cicatrizal del tipo de fibrocartílago, el cual es de menor calidad comparado al cartílago normal, evolucionando finalmente a la OA.<sup>5</sup>

Dentro de las diversas técnicas de reparación condral, últimamente han surgido las técnicas que utilizan la reparación biológica mediante la ingeniería de tejidos, la cual es un campo multidisciplinario de investigación que combina los conocimientos de diferentes áreas de la ingeniería,

la biología celular y molecular.<sup>6</sup> Dentro de éstas, una de las técnicas empleadas y originalmente descrita por Langer combina la utilización de materiales sintéticos biocompatibles y biodegradables como estructuras de sostén o transportadores de células aisladas de tejidos específicos, con la finalidad de regenerar tejidos que puedan ser empleados para reparar, reconstruir o reemplazar la estructura o función de órganos lesionados o ausentes.<sup>7,8</sup>

Vacanti y colaboradores describieron la formación de cartílago mediante el empleo de condrocitos inmaduros sembrados en suturas de ácido poliglicólico deshebradas e implantadas en el espacio subcutáneo de ratones atípicos.<sup>9</sup> Más tarde, describieron la reparación de defectos articulares creados experimentalmente en la rodilla de conejos utilizando condrocitos autólogos y estructuras de ácido poliglicólico. Técnicas similares se han utilizado para la generación experimental de diferentes tejidos músculo-esqueléticos, tales como cartílago, hueso y estructuras compuestas de cartílago y hueso, tendones, ligamento y menisco.<sup>10,11</sup>

En estudios previos reportados por Ibarra y cols., entre otros, se describe la formación de cartílago, meniscos, ligamentos y hueso, empleando técnicas de ingeniería de tejidos.<sup>12-15</sup>

El objetivo del presente estudio es reportar los resultados de la evaluación morfológica (macroscópica e histológica), por resonancia magnética nuclear y por microscopía electrónica de barrido ambiental, de la reparación de lesiones osteocondrales creadas quirúrgicamente en la rodilla de cerdos adultos utilizando el implante de estructuras de polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables sembradas con condrocitos y células de periostio autólogos.

Se pretende demostrar, también, que mediante estructuras de polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables sembradas con condrocitos autólogos y con células de periostio, empleadas para reparar defectos osteocondrales, es posible la formación de cartílago articular con características morfológicas y moleculares similares a las del cartílago articular normal. Y que además este tejido cuenta con una adecuada integración al cartílago articular en la periferia del defecto.

## Material y métodos

Se utilizaron 8 cerdos jóvenes hembras de 40 kg de peso, que se obtuvieron del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Porcina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en Jilotepec, Edo. de México. Se utilizaron estructuras de polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables formadas a partir de una malla de fibras de ácido poliglicólico (APG) de 5 mm de espesor y con una porosidad del 90% y de ácido poliláctico. Las fibras son de 15 micras de diámetro con una distancia interfibrilar de hasta 150-200 micras. La malla de polímero fue cortada en discos de 9 mm de diámetro. Durante los procedimientos quirúrgicos de toma de biopsia osteocondral, así como en el implante de polímero, los defectos osteocondrales fueron creados con el instrumental para mosaicoplastía de Mytek®, el cual cuenta con un dispositivo para toma de cilindros osteocondrales de 9 mm de diámetro y de variable profundidad. Para la fijación de los polímeros de condrocitos y de células de perióstio en el defecto osteocondral, se utilizó el equipo de reparación meniscal Rapidlock® de Johnson & Johnson. Este dispositivo consta de un sistema de anclaje y fijación para lesiones meniscales. Sin embargo, en este caso se utilizó para el anclaje y fijación de los polímeros en el defecto osteocondral.

Se realizaron los siguientes pasos:

A cerdos hembras, de 40 kg, se les realizó obtención de disco osteocondral de 9 mm de diámetro y 1 cm de profundidad en el cóndilo medial, con el dispositivo de toma de cilindros osteocondrales de Mytek®. Además, se realizó toma de rectángulo de perióstio en tibia proximal de 2 x 1 cm, todo en su rodilla izquierda, quedando la lesión de disco osteocondral como lesión control en la rodilla izquierda. De esta muestra se aislaron condrocitos a partir del cartílago obtenido, mediante la digestión en colagenasa del tejido. Se cultivaron y se expandieron *in vitro* en condiciones convencionales de cultivo celular, hasta obtener el número necesario de células (> 10 millones de células en 6-8 semanas aproximadamente) para ser sembradas en estructuras de polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables (3 dimensiones). Se aislaron también células de perióstio a partir de la muestra rectangular obtenida, se cultivaron y expandieron *in vitro* en condiciones convencionales de cultivo celular hasta obtener el número necesario de células (> 10 millones de células en 6-8 semanas aproximadamente) para ser sembradas en estructuras de polímeros sintéticos biocompatibles y biodegradables (3 dimensiones). Se hizo un seguimiento de los polímeros sembrados y una vez obtenido el número de células de cartílago y perióstio se sembraron por separado en polímeros de ácido poliglicólico (APG) y ácido poliláctico (APL) y se mantuvieron en cultivo con movimientos rotatorios por 3 días. Posteriormente se implantaron los 2 discos de polímero en un defecto osteocondral creado en el cóndilo medial de la rodilla derecha

del cerdo, fijados con Rapidloc®, quedando el disco con células de perióstio en contacto con el hueso subcondral y el disco con condrocitos hacia la superficie articular. Se dejó al cerdo con movilidad y apoyo libre a tolerancia desde el postoperatorio inmediato. A los 3 meses se realizó el sacrificio del cerdo, para la evaluación de ambas rodillas. Se evaluó el tejido de reparación mediante resonancia magnética de la articulación, utilizando la escala de evaluación de Roberts<sup>16</sup> (*Tabla 1*). Se evaluó en forma macroscópica bajo visión directa utilizando la escala de evaluación de Brittberg<sup>17</sup> (*Tabla 2*). Se evaluó histológicamente el tejido formado y sus células mediante microscopía de luz con tinciones de hematoxilina y eosina (H&E), Safranina y Mason, así como estudio de microscopía electrónica de transmisión y de barrido. Se describió la apariencia histológica, basada en los criterios de celularidad, apariencia de la matriz, estructura columnar del cartílago y apariencia bajo luz polarizada, clasificando al tejido de reparación de la siguiente manera, según Brittberg y Peterson:<sup>17</sup> similar a cartílago hialino, cartílago fibroso, cartílago mixto. Se evaluó también por microscopía electrónica de barrido ambiental.

El presente es un estudio experimental, prospectivo, transversal. Con los resultados obtenidos se realizó una estadística descriptiva; las 3 variables que se compararon fueron la evaluación macroscópica según la escala de Brittberg,<sup>17</sup> evaluación histológica de Brittberg-Peterson<sup>17</sup> y evaluación por resonancia magnética nuclear con la escala de Roberts.<sup>16</sup> Por tener los resultados una distribución no normal, se utilizaron pruebas no paramétricas. Para comparar las proporciones entre el grupo de casos y controles y las medidas de desenlace evaluadas se utilizó la Prueba exacta de Fisher.

## Resultados

Se operaron 8 cerdos hembras, de ambas extremidades posteriores, dando un total de 16 rodillas operadas, 8 rodillas izquierdas de control y 8 rodillas derechas experimentales. Se describen a continuación los resultados obtenidos al momento del sacrificio (*Tabla 3*).

**Tabla 1. Escala de evaluación de la reparación de lesiones condrales por RMN de Roberts.**

Características del tejido	Calificación
Integridad de la superficie y contorno	1 = normal o cercano a lo normal 0 = anormal
Señal de cartílago en la región del injerto	1 = normal o cercano a lo normal 0 = anormal
Grosor del tejido	1 = normal o cercano a lo normal 0 = anormal
Cambios en el hueso subcondral	1 = normal o cercano a lo normal 0 = anormal
Total máximo posible de puntos	4

**Tabla 2. Sistema de evaluación de Brittberg para evaluar la reparación del defecto cartilaginoso.  
(Evaluación máxima 12 puntos\*).**

Criterio		Puntos
Grado de reparación del defecto	En el nivel del cartílago de su alrededor	4
	75% de reparación en la profundidad del defecto	3
	50% de reparación en la profundidad del defecto	2
	25% de reparación en la profundidad del defecto	1
Integración a la zona del borde	0% de reparación en la profundidad del defecto	0
	Integración completa con cartílago a su alrededor, con un borde demarcado < a 1 mm	4
	¾ del injerto integrado, ¼ con un borde notable > 1 mm de ancho	3
	½ del injerto integrado con cartílago a su alrededor, ½ con un borde notable > 1 mm	1
Apariencia macroscópica	Sin contacto, hasta ¼ de injerto integrado con cartílago a su alrededor	0
	Superficie lisa intacta	4
	Superficie fibrilada	3
	Fisuras pequeñas dispersas o grietas	2
	Fisuras varias pequeñas o pocas pero largas	1
	Degeneración total de la zona del injerto	0

\* Para una clasificación como una apariencia «biológicamente aceptable» es necesaria una evaluación mínima de 7 puntos, con al menos 3 puntos del primer grupo (grado de reparación del defecto) y 2 puntos en los otros grupos.

**Tabla 3. Resultados de la reparación experimental de lesiones osteocondrales.**

Cerdo	Rodilla	Evaluación de reparación de acuerdo a Brittberg	Resonancia magnética de acuerdo a Roberts 2002	Histológico*	Microscopio electrónico	Análisis de elementos
1	Control	2	0	B	—————	—————
	Experim.	0+	0	B	—————	—————
2	Control	5	0	B	—————	—————
	Experim.	8	2	A	—————	—————
3	Control	0	0	B	—————	—————
	Experim.	11+	3	A	Condrocitos con abundante RER.	Similar a cart. hial.
4	Control	6	0	B	—————	—————
	Experim.	8	2	A	—————	—————
5	Control	6	2	B	—————	—————
	Experim.	8+	2	A	—————	—————
6	Control	6	0	B	—————	—————
	Experim.	8	3	A	—————	—————
7	Control	6	2	B	—————	—————
	Experim.	8+	3	A	Condrocitos con abundante RER.	—————
8	Control	4	1	B	—————	—————
	Experim.	9+	3	A	Condrocitos con abundante RER.	—————

\* Evaluación histológica: A-Hialino, B-Fibroso, C-Mixto.

+ «biológicamente aceptable» es necesaria una evaluación mínima de 7 puntos, con al menos 3 puntos del primer grupo (grado de reparación del defecto) y 2

En cuanto a la evaluación por RMN, según la escala de Roberts, de los controles el 62.50% obtuvieron 0 puntos, el 12.50% obtuvieron 1 punto, el 25% obtuvieron 2 puntos. De los experimentales, el 12.50% obtuvieron 0 puntos, el 37.50% obtuvieron 2 puntos y el 50% obtuvieron 3 puntos (*Figura 1* y *gráficas 1 y 2*), obteniéndose una  $p = 0.050$ , lo que nos dice que existe una diferencia estadísticamente significativa en el resultado por puntos de la evaluación de RMN de Roberts entre los controles y los experimentales.

En cuanto a la evaluación macroscópica por la escala de Brittberg,<sup>17</sup> de los controles el 100% obtuvieron un resultado biológicamente no aceptable. De los experimentales, el 50% obtuvieron un resultado biológicamente aceptable (*Figura 2*) y el otro 50% un resultado biológicamente no aceptable, obteniéndose una  $p = 0.077$ , lo que nos habla de que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos en el estándar de resultado biológicamente aceptable.

En cuanto a la evaluación histológica según Brittberg-Peterson, de los controles el 100% formó cartílago fibroso, mientras que de los experimentales el 37.50% formó cartílago hialino (*Figura 3*), 12.50% cartílago fibroso y un 50% cartílago mixto (*Gráficas 3 y 4*) obteniéndose una  $p = 0.001$ , por lo que las diferencias en el tejido formado por cada grupo es estadísticamente significativa. Existe una tendencia marcada del grupo control a formar cartílago fibroso. Por otro lado, el grupo experimental presenta una tendencia a formar cartílago mixto principalmente y cartílago hialino.

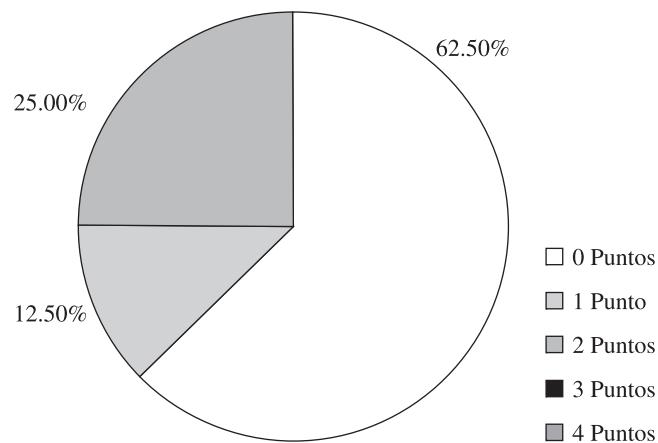
La evaluación morfológica mediante microscopio electrónico se realizó en 3 lesiones experimentales, encontrándose presencia de condrocitos con abundante retículo endoplásmico rugoso. En una de estas lesiones experimentales se realizó además un análisis de elementos, encontrándose elementos propios del cartílago hialino.

## Discusión

Brittberg y Peterson<sup>18</sup> describieron que la primera generación de las técnicas de trasplante de condrocitos autólo-

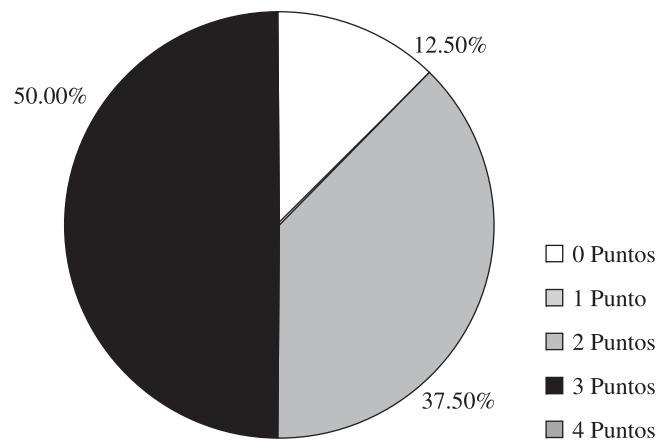
gos requerían de la combinación de 2 factores condrogénicos: la suspensión implantada de condrocitos y las células de periostio. Este procedimiento tiene ciertas desventajas, incluyendo la potencial migración de las células de los defectos, la desdiferenciación del fenotipo celular dado que las células han crecido en monocapas antes de la

Evaluación por RMN según la puntuación en la escala de Roberts  
Grupo control



Gráfica 1. Evaluación por RMN del grupo control.

Evaluación por RMN según la puntuación en la escala de Roberts  
Grupo experimental



Gráfica 2. Evaluación por RMN del grupo experimental.



Figura 1. Corte coronal (a) y sagital (b) por RMN, secuencia T2 de rodilla experimental.

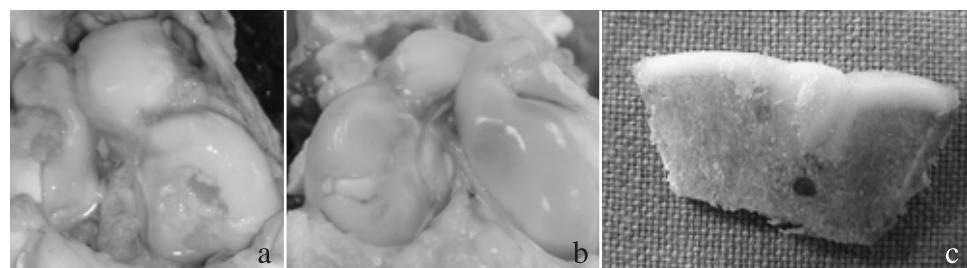
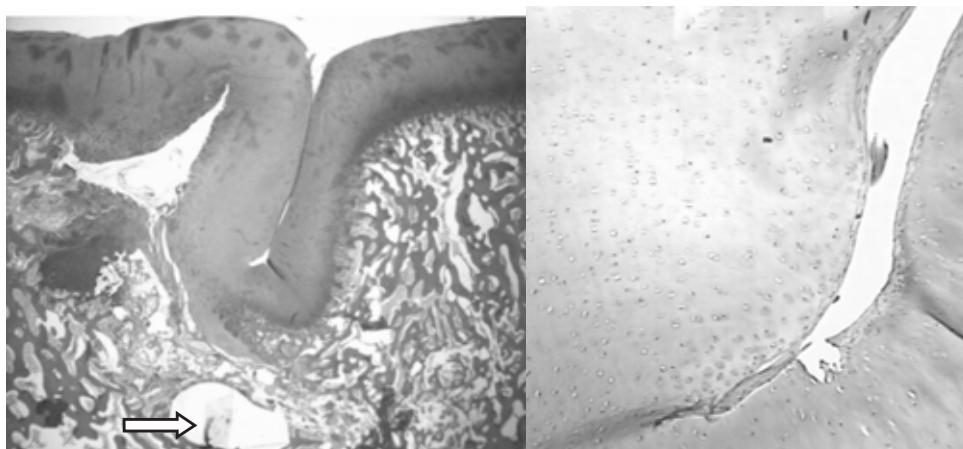
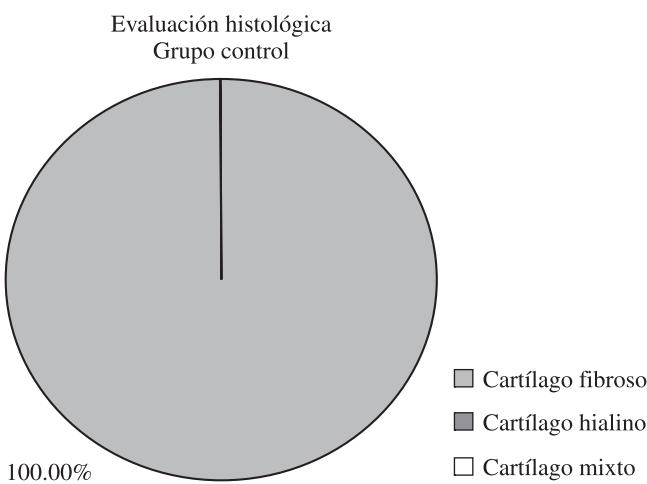


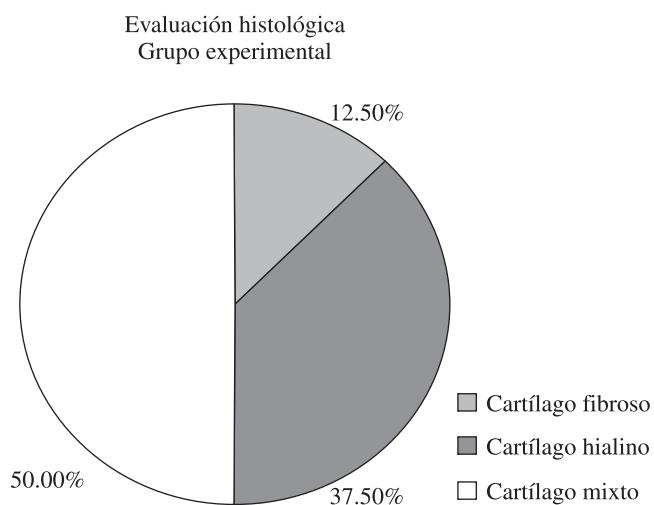
Figura 2. Vista macroscópica de rodilla control (a) y experimental (b) con un corte coronal macroscópico de lesión experimental (c).



**Figura 3.** Corte histológico de lesión experimental con tinción de hematoxilina y eosina. Con la flecha se señala dispositivo de fijación utilizado aún presente.



**Gráfica 3.** Evaluación histológica grupo control.



**Gráfica 4.** Evaluación histológica grupo experimental.

implantación, la desigual distribución de las células y el riesgo sustancial de hipertrofia periosteal. La tecnología del trasplante de condrocitos autólogos necesita mejorar, y hay ahora una investigación sobre nuevos biomateriales que puedan fijar las células al defecto y promover su proliferación y diferenciación. En nuestro trabajo, coincidimos con lo dicho en este artículo por Brittberg y Peterson, en el sentido de que decidimos implementar una técnica de trasplante de condrocitos autólogos de segunda generación o con uso de polímero, en este caso con un polímero de ácido poliglicólico y ácido poliláctico. Consideramos que el implante de condrocitos autólogos de primera generación o con parche de periorstio quedará pronto en desuso, por la potencial migración de las células del defecto.

Chiang<sup>19</sup> recientemente publicó el uso de condrocitos en una matriz de colágena con parche de periorstio en cerdos pequeños con buenos resultados a la valoración inicial. Sin embargo, las imágenes que presenta en sus resultados muestran una reparación macroscópica que alcanzaría una puntuación menor a la obtenida en nuestras muestras de rodillas experimentales, según la escala de

Brittberg; esto quizás debido a que no utiliza, a diferencia de nosotros, un doble polímero, con células de periorstio en uno de ellos, lo cual consideramos fue determinante para la obtención de nuestros buenos resultados y característico de nuestra técnica.

Rudert<sup>20</sup> utilizó polímeros diferentes con condrocitos para reparar defectos osteocondrales creados en el cóndilo femoral de conejos. Encontraron una mejoría significativa en los defectos osteocondrales a los cuales se les aplicó el polímero con condrocitos en comparación a los defectos a los que no se les colocó ningún polímero. En nuestro estudio también encontramos una diferencia significativa en la calidad de la reparación osteocondral según la escala de Brittberg, siendo buena la reparación ( $> 7$  puntos) en un 87.50% de los casos cuando se colocaron los polímeros con las células (rodillas experimentales) y un 0% de buena reparación, cuando no se colocó nada en el defecto osteocondral (rodillas control).

Schek<sup>21</sup> publicó recientemente el uso de dos polímeros, uno sembrado con condrocitos y otro con fibroblastos, los cuales fueron implantados en ratones. Obtuvieron como

resultado la formación de un tejido complejo osteocondral. En nuestro estudio obtuvimos un resultado similar, esto quizás debido a la utilización de 2 tipos celulares para la formación de tejidos complejos como lo es el tejido osteocondral.

En base a los resultados consideramos que el tiempo de evolución para el sacrificio, que fue de 3 meses, debería ser mayor y que probablemente en los siguientes meses podrían haber cambios importantes en la evolución de las lesiones controles y sobre todo experimentales.

## Conclusiones

Es posible la formación de tejido osteocondral similar a tejido sano mediante técnicas de ingeniería de tejidos como la aquí utilizada.

Es primordial trabajar en el desarrollo, perfeccionamiento y accesibilidad de nuevas técnicas de reparación condral, como la mostrada en este estudio, que es original, sencilla de realizar, accesible y reproducible en nuestro medio.

El modelo porcino resultó ser excelente para reparación condral, dado que cuenta con un fácil abordaje a la zona de la rodilla, y con un ancho espesor de cartílago que permite trabajar con el mismo.

El dispositivo de fijación aquí propuesto, llamado Rapidlock®, es un excelente método de fijación, que en todos los casos mantuvo al polímero fijado al defecto condral.

Consideramos a la resonancia magnética nuclear como una excelente técnica no invasiva de evaluación de la reparación de lesiones condrales, especialmente cuando se utilizan parámetros definidos como es la escala de valoración de Roberts.<sup>16</sup>

## Bibliografía

- Farmer JM, Boles CA: Chondral and osteochondral injuries. Diagnosis and management. *Clin Sports Med* 2001; 20(2): 299-319.
- Maiotti M, Coletta M: Correlation between osteoarthritic cartilage damage and levels of proteinases and proteinase inhibitors in synovial fluid from the knee joint. *Arthroscopy* 2000; 16(5): 522-6.
- Elders MJ: The increasing impact of arthritis on public health. *J Rheumatol Suppl*, 2000; 60: 6-8.
- Villalobos CE, Almazán DA, Cruz LF, Encalada DI, Pérez JF, Izaguirre HA, Ibarra PC: Lesiones del cartílago articular en 1,309 arroscopías de rodilla. *Acta Ortopédica Mexicana*, (en prensa).
- Cole BJ, Malek MM: Articular cartilage lesions – A practical guide to assessment and treatment. Ed. Springer-Verlag. China, 2004.
- Sandell LJ, Grodzinsky AJ: Tissue engineering in musculoskeletal clinical practice. Ed. American Academy of Orthopaedic Surgeons. Estados Unidos de América, 2003.
- Freed LE, Langer R: Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J Cell Biochem* 1993; 51(3): 257-64.
- Freed, LE, Vunjak-Novakovic G: Frontiers in tissue engineering. *In vitro* modulation of chondrogenesis. *Clin Orthop* 1999; (367 Suppl): S46-58.
- Cao Y, Rodriguez A, Vacanti M, Ibarra C, Arevalo C, Vacanti CA: Comparative study of the use of polyglycolic acid, calcium alginate and pluronic in the engineering of autologous porcine cartilage. *J Biomater Sci Polym Ed*, 1998; 9(5): 475-87.
- Ibarra C, Janneta C, Vacanti CA, Cao Y, Kim TH, Upton J, Vacanti JP: Tissue engineered meniscus: a potential new alternative to allogeneic meniscus transplantation. *Transplant Proc* 1997; 29(1-2): 986-8.
- Koski JA, Ibarra C, Rodeo SA, Warren RF: Meniscal injury and repair: clinical status. *Orthop Clin North Am* 2000; 31(3): 419-36.
- Rodriguez A, Cao YL, Ibarra C, Pap S, Vacanti M, Eavey RD, Vacanti CA: Characteristics of cartilage engineered from human pediatric auricular cartilage. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103(4): 1111-9.
- Cao Y, Vacanti CA: Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast Reconstr Surg* 1997; 100(2): 297-302.
- Hidaka C, Ibarra C, Hannafin J, Torzilli P, Quitoriano M, Jen SS, Warren R, Crystal R: Formation of vascularized meniscal tissue by combining gene therapy with tissue engineering. *Tissue Engineering* 2002; 8 (1): 93-105.
- Caplan A: Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 1999; 367S: 12-16.
- Roberts S, Richardson JB: Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: monitoring its success by magnetic resonance imaging and histology. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(1):60-73.
- Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A: Two-to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2000; 374: 212-34.
- Brittberg M: Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation–A review of recent development. *J Bone Joint Surg* 2003; 85-A: 109-15.
- Chiang H, Jiang Ch: Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. *Journal of Orthopaedic Research* 2005; 23: 584-93.
- Rudert M, Wirth CJ: Cell-based treatment of osteochondral defects in the rabbit knee with natural and synthetic matrices: cellular seeding determines the outcome. *Arch Orthop Trauma Surg* 2005; 2: 1-11.
- Schek RM, Krebsbach PH: Engineered osteochondral grafts using biphasic composite solid free-form fabricated scaffolds. *Tissue Eng* 2004; (9-10): 1376-85.