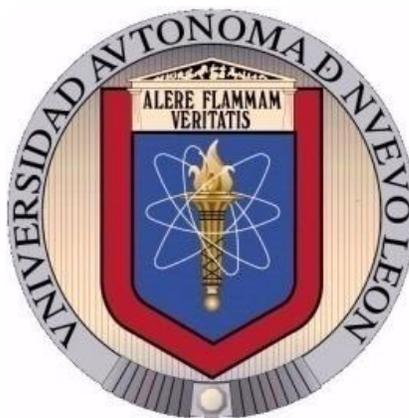


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



“EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE SOX9 E IGF-I SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALGUNOS COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN CONDROCITOS HUMANOS CULTIVADOS *IN VITRO*.”

Por:

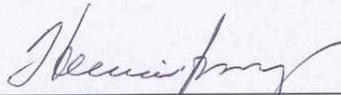
Q.F.B. Mario Alberto Simental Mendía.

Como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias con orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Septiembre, 2011

EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE SOX9 E IGF-I SOBRE LA
PRODUCCIÓN DE ALGUNOS COMPONENTES DE LA MATRIZ
EXTRACELULAR EN CONDROCITOS HUMANOS CULTIVADOS *IN VITRO*

Aprobación de la Tesis:



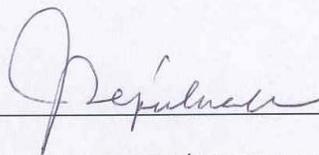
DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ

Directora de Tesis



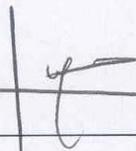
DR. MED. EDUARDO ÁLVAREZ LOZANO

Co-Director de Tesis



PhD. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA

Co-Director de Tesis



DR. MED. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Sub-Director de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA.

AGRADECIMIENTOS.

ÍNDICE.

Contenido	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ABREVIATURAS	viii
RESUMEN.....	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Cartílago Articular.....	3
2.1.1. Estructura y Composición.....	3
2.1.2. Matriz Extracelular.....	5
2.1.3. Metabolismo.....	7
2.2. Lesión del Cartílago Articular.....	8
2.3. Reparación del Cartílago Articular.....	8
2.3.1. Ingeniería de Tejidos.....	9
2.3.2. Candidatos Terapéuticos.....	9
2.3.2.1. Factor de Crecimiento Parecido a Insulina Tipo I.....	11
2.3.2.2. Factor de Transcripción SOX9.....	11
2.4. Transferencia de Genes en Condrocitos Articulares.....	12
2.5. Antecedentes Particulares del Laboratorio de Terapia Celular.....	13
3. JUSTIFICACIÓN	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo General.....	15
4.2. Objetivos Específicos.....	15

5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Construcción de los Plásmidos de Expresión	16
5.2. Origen de los Condrocitos	17
5.3. Cultivo y Transfección de Condrocitos Humanos	17
5.4. Extracción de RNA y RT-PCR.	18
5.5. Producción de Glucosaminoglucanos.....	20
5.6. Inmunocitoquímica.....	21
6. RESULTADOS	23
6.1. Construcción y caracterización de los plásmidos de expresión para los genes SOX9 e IGF-I.	23
6.2. Estandarización de las condiciones de transfección en condrocitos humanos.....	25
6.3. Análisis de la expresión de los factores SOX9 e IGF-I por RT-PCR....	27
6.4. Análisis de la expresión de Colágeno Tipo I y Colágeno Tipo II por RT-PCR y Tinción ICQ	29
6.5. Producción de Glucosaminoglucanos.....	34
7. DISCUSIÓN	36
8. CONCLUSIONES.....	40
9. LITERATURA CITADA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Esquema de los diferentes estratos o zonas del cartílago articular	5
Figura 2. Esquema representativo de la matriz extracelular del cartílago.....	7
Figura 3. Caracterización del plásmido pCMV-SPORT6 SOX9.....	23
Figura 4. Esquemas de los plásmidos utilizados para la construcción del plásmido de expresión pCMV-SPORT6 IGF-I	24
Figura 5. Caracterización del plásmido pCMV-SPORT6 IGF-I construido.....	24
Figura 6. Purificación de los plásmidos pCMV-SPORT6 SOX9 y pCMV-SPORT6 IGF-I producidos a mediana escala	25
Figura 7. Estandarización de la transfección de condrocitos humanos con FuGENE 6	26
Figura 8. Imágenes representativas de condrocitos humanos transfectados expresando la GFP	26
Figura 9. Viabilidad celular en condrocitos humanos transfectados con FuGENE 6.....	27
Figura 10. Expresión de los genes IGF-I, SOX9 y GAPDH en condrocitos humanos bajo las diferentes condiciones de transfección	28
Figura 11. Representación gráfica del análisis densitométrico de la expresión de los genes IGF-I y SOX9 en condrocitos humanos bajo las diferentes condiciones de transfección.....	29
Figura 12. Expresión de colágeno tipo I, colágeno tipo II y GAPDH en condrocitos humanos bajo las diferentes condiciones de transfección.....	30

Figura 13. Representación gráfica del análisis densitométrico de la expresión de colágeno tipo I y colágeno tipo II en condrocitos humanos bajo las diferentes condiciones de transfección.....	31
Figura 14. Detección de colágeno tipo I mediante tinción ICQ en condrocitos humanos cultivados en monocapa en cámaras de cultivo.....	32
Figura 15. Detección de colágeno tipo II mediante tinción ICQ en condrocitos humanos cultivados en monocapa en cámaras de cultivo.....	33
Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de GAG's en los sobrenadantes de los cultivos	34
Figura 17. Cuantificación del contenido de GAG's en los sobrenadantes de condrocitos cultivados bajo las diferentes condiciones de transfección.....	35

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar parte de las secuencias de GAPDH, Colágeno tipo I, Colágeno tipo II, IGF-I y SOX9.....	20
Tabla 2. Reactivos empleados en las reacciones de PCR	20
Tabla 3. Parámetros de concentración y calidad de los plásmidos pCMV-SPORT6-SOX9 y pCMV-SPORT6-IGF-I purificados y producidos a mediana escala	25

ABREVIATURAS.

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
Abs	Absorbancia
BMP-2	Proteína Morfogenética Ósea Tipo 2
BMP-7	Proteína Morfogenética Ósea Tipo 7
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
COL I	Colágeno Tipo I
COL II	Colágeno Tipo II
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMB	Azul de Dimetil Metileno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FGF-2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos Tipo II
GAG's	Glucosaminoglucanos
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa
GFP	Proteína Verde Fluorescente
h	Horas
ICQ	Inmunocitoquímica
IGF-I	Factor de Crecimiento Parecido a Insulina Tipo I
kDa	Kilo Daltones
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar

ng	Nanogramos
nM	Nanomolar
M-MLV	Virus de la Leucemia Murina de Moloney
Opti-MEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle Reducido en Suero
pb	Pares de Bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
R ²	Coefficiente de Determinación
rpm	Revoluciones por Minuto
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Transcripción Reversa acoplada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa
SBF	Suero de Bovino Fetal
SOX9	Región Determinante del Sexo en el Cromosoma Y Box-9
TGF β1	Factor de Crecimiento Transformante Beta Tipo 1
TGF β2	Factor de Crecimiento Transformante Beta Tipo 2

RESUMEN.

Mario Alberto Simental Mendía

Fecha de Graduación: Septiembre, 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León.

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina.

Título del Estudio: Efecto de la sobreexpresión de SOX9 e IGF-1 sobre la producción de algunos componentes de la matriz extracelular en condrocitos humanos cultivados *in vitro*.

Número de Páginas: 53

Área de Estudio: Terapia Celular.

Introducción. Las lesiones del cartílago articular, representan un reto terapéutico importante debido a la escasa capacidad de regeneración del cartílago hialino y a que las lesiones producidas en este tejido, pueden progresar hacia una degeneración artrósica. El descubrimiento de agentes condrogénicos y la capacidad para transferir genes en condrocitos en cultivo, han propiciado el desarrollo de estrategias terapéuticas moleculares para promover la reparación del cartílago articular. La reproducción de la arquitectura original de este tejido puede requerir la acción de más de un factor terapéutico, por lo que en este estudio se propuso probar la combinación de la sobreexpresión del factor de transcripción SOX9 y del factor de crecimiento IGF-I. **Objetivo.** Evaluar la producción de componentes de la matriz extracelular en condrocitos cultivados en monocapa mediante la sobreexpresión de SOX9 e IGF-I. **Materiales y Métodos.** Se estimularon condrocitos humanos cultivados en monocapa a través de la sobreexpresión de los factores SOX9 e IGF-I por separado y en conjunto. Se realizó la extracción de RNA total de las células y la colección de los sobrenadantes de los cultivos a los 3, 6 y 9 días para hacer ensayos de RT-PCR (SOX9, IGF-I, colágeno tipo I, colágeno tipo II y GAPDH), y cuantificación de glucosaminoglucanos respectivamente. Los condrocitos estimulados también se cultivaron en pequeñas cámaras de cultivo para posteriormente llevar a cabo ensayos de inmunocitoquímica (anti-colágeno tipo I y tipo II). **Resultados.** La expresión de SOX9 e IGF-I en condrocitos estimulados, fue hasta 3.5 y 4 veces más respectivamente, que la expresión basal de ambos factores. Para colágeno tipo I la expresión disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) en la transfección simple con SOX9 (0.5 veces) y en la cotransfección (0.6 veces) a los 9 días. Por otro lado, el colágeno tipo II fue expresado en mayor proporción en la cotransfección a los 6 (0.85 veces) y 9 días (0.6 veces). Se obtuvieron los mismos resultados en los ensayos de inmunocitoquímica. La síntesis de glucosaminoglucanos aumentó significativamente en células que fueron cotransfectadas a los 9 días ($2.46 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$) con respecto a células que no fueron estimuladas ($1.5 \pm 0.06 \mu\text{g/mL}$). **Conclusiones.** El incremento en la presencia de colágeno tipo II y de glucosaminoglucanos fue significativo, contrario al colágeno tipo I, que disminuyó en presencia de la sobreexpresión simultánea de SOX9 e IGF-I. La producción de estos componentes es similar a lo que se presenta en la matriz extracelular del cartílago hialino.

Dra Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Directora de Tesis

1. INTRODUCCIÓN.

El cartílago articular es un tejido complejo formado por condrocitos embebidos en su matriz extracelular, el cual está sometido a cambios metabólicos debidos a la edad, enfermedades o lesiones. Dichos cambios pueden dificultar la supervivencia y capacidad de reparación de los condrocitos, originando una pérdida de superficie articular, lo que finalmente conducirá a padecimientos como la artrosis (ULRICH-VINTHER *et al.* 2003). Tales condiciones son enfermedades progresivas y degenerativas de la articulación, con una degradación gradual del cartílago articular debido a la pérdida de componentes principales de la matriz extracelular como proteoglicanos y colágeno tipo II (CUCCHIARINI *et al.* 2007).

A la fecha, se han realizado grandes esfuerzos científicos con el fin de lograr reparar estas lesiones en donde la ingeniería de tejidos (IBARRA *et al.* 2007) y la terapia génica (MARTINEK *et al.* 2003) han jugado una función muy importante, intentando producir nuevo tejido cartilaginoso que sea funcional, con condrocitos viables, capaces de producir y mantener la matriz extracelular característica del cartílago hialino. Ya que los condrocitos son las células nativas del cartílago articular, son el blanco lógico para la modificación genética y, desde hace algunos años, se convirtieron en el centro de atención dentro del estudio del cartílago osteoartítico, debido a los cambios patológicos en sus patrones de expresión genética, una disminuida habilidad para producir los componentes de la matriz extracelular y un aumento de la liberación de enzimas que degradan la matriz (CUCCHIARINI and MADRY 2005).

Debido a los múltiples procesos patológicos involucrados en las lesiones de cartílago, la reproducción de la arquitectura original de este tipo de tejido puede requerir la acción de más de un factor terapéutico (LOESER *et al.* 2003). Desde este punto de vista, hasta el día de hoy se han utilizado varias estrategias en cuanto a la transferencia de genes en condrocitos que codifiquen para factores de crecimiento o diferenciación que permitan mostrar un efecto terapéutico.

Entre los factores de crecimiento conocidos, el factor de crecimiento parecido a insulina tipo I (IGF-I) tiene efectos anabólicos específicos, ya que se ha comprobado que en explantes de cartílago o en cultivos en monocapa de condrocitos se aumenta la síntesis de grandes agregados de proteoglicanos y colágeno tipo II, mientras que se inhibe la degradación y liberación de proteoglicanos (FORTIER *et al.* 2002; MADRY *et al.* 2005). Por otro lado, modelos experimentales han mostrado las propiedades condrogénicas de ciertos factores de transcripción. De manera notable, la sobreexpresión de SOX9, un factor de transcripción crítico para la formación de cartílago, ha probado ser benéfico, al cambiar el balance metabólico hacia la síntesis de los componentes de la matriz, participando así en la reorganización de la superficie cartilaginosa (HARDINGHAM *et al.* 2006).

Existen numerosos modelos que describen la transferencia de alguno de los factores ya mencionados en condrocitos mediante vectores virales o no virales. En el laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL, el Dr. en C. Jorge Lara Arias en sus tesis de maestría y doctorado, estableció el cultivo de condrocitos humanos aislados de una biopsia de cartílago y evaluó la respuesta de dichas células a la co-transfección y/o suplementación en el medio de cultivo con los factores IGF-I y FGF-2. Se logró así una mayor producción de colágeno tipo II en relación al colágeno tipo I, que es como se presenta en el cartílago hialino normalmente.

En el presente proyecto se evaluó la respuesta de los condrocitos humanos a la sobreexpresión del factor de transcripción SOX9 y del factor de crecimiento IGF-I proporcionada por la cotransfección de dos plásmidos de expresión. Con el propósito de determinar si los condrocitos modificados, eran capaces de producir colágeno tipo II y glucosaminoglucanos, que favorezcan la formación de una matriz extracelular con una composición parecida a la del cartílago hialino.

2. ANTECEDENTES.

2.1. Cartílago Articular.

El cartílago articular es el tejido conectivo altamente especializado que cubre la superficie articular del hueso en las articulaciones que poseen movimiento; se presenta como una capa delgada, viscosa y elástica, usualmente de menos de 3 mm de grosor (CHIANG and JIANG 2009). Está desprovisto de vasos sanguíneos, vasos linfáticos, terminales nerviosas y está sujeto a un severo ambiente biomecánico. Su principal función es proveer una superficie suave y lubricada para la articulación, y facilitar la transmisión de cargas con un bajo coeficiente de fricción. Sin embargo, el cartílago tiene muy poca capacidad de reparación. Esto hace que la degeneración de su superficie provoque lesiones que son difíciles de reparar (CHIANG and JIANG 2009; FOX *et al.* 2009).

2.1.1. Estructura y Composición.

Al igual que otros tejidos conectivos, incluyendo tendones, ligamentos y meniscos, el cartílago articular consiste de células, agua y una matriz de macromoléculas que le sirve de armazón. Su densa matriz extracelular contiene una distribución muy dispersa de células altamente especializadas llamadas condrocitos (VEGA *et al.* 2002). La matriz extracelular se compone principalmente de agua, colágeno y proteoglicanos, con otras proteínas no colágenos y glicoproteínas presentes en menor cantidad (BUCKWALTER 1997). Juntos, estos componentes ayudan a retener el agua dentro de la matriz extracelular, lo cual es crítico para mantener sus propiedades mecánicas únicas.

Junto con la ultraestructura de las fibras de colágeno y la matriz extracelular, los condrocitos contribuyen a formar varias zonas del cartílago articular, las cuales difieren entre sí, en estructura, composición, orientación, diámetro de las fibras

de colágeno , así como en volumen y forma de los condrocitos (Fox *et al.* 2009; JAMES and UHL 2001):

- Zona superficial (tangencial). Es la zona más delgada y protege a las más profundas, representa aproximadamente el 10 – 20% del grosor del cartílago, las fibras de colágeno (tipo II y IX) están estrechamente empaçadas y organizadas en forma paralela a la superficie articular, además contiene un número relativamente alto de condrocitos aplanados.
- Zona media (transicional). Representa 40 – 60% del volumen total del cartílago, contiene proteoglicanos y fibras más gruesas de colágeno, las cuales están organizadas oblicuamente, los condrocitos son esféricos y en una baja densidad.
- Zona profunda. Las fibras de colágeno están organizadas de forma perpendicular con respecto a la superficie articular, posee el mayor contenido de proteoglicanos y la concentración más baja de agua, los condrocitos están orientados en una forma columnar paralelos a las fibras de colágeno. Esta zona representa aproximadamente el 30% del volumen del cartílago.
- Zona calcificada. La población celular es escasa, los condrocitos son hipertróficos y la matriz extracelular se encuentra calcificada.

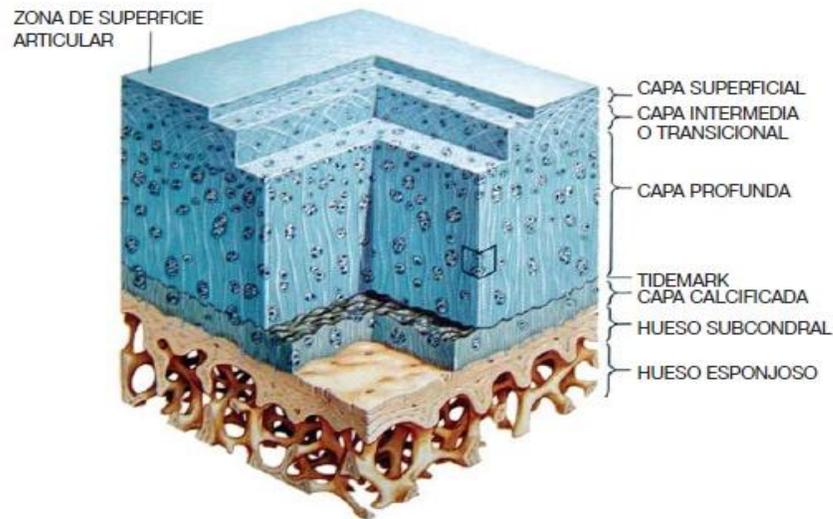


Figura 1. Esquema de los diferentes estratos o zonas del cartílago articular (BUCKWALTER and MARTIN 1995).

Dentro de cada zona se pueden identificar tres regiones de acuerdo a la disposición de la matriz extracelular respecto a las células y su composición: zonas pericelular, territorial e interterritorial, cada una de ellas con funciones y composición diferente (HILDEBRAND *et al.* 1994).

2.1.2. Matriz Extracelular.

La matriz del cartílago articular consiste en dos principales componentes: agua y el marco de macromoléculas estructurales, como los colágenos y los proteoglicanos, que le dan al tejido su forma y estabilidad. Otras clases de moléculas se pueden encontrar en menor cantidad, como lípidos, fosfolípidos, proteínas no colágenos y glicoproteínas (BUCKWALTER 1997).

Agua.

Es el componente más abundante del cartílago articular, contribuyendo hasta con el 80% de su peso húmedo. La concentración relativa de agua desciende desde 80% en la zona superficial hasta 65% en la zona profunda. El flujo de agua a través del cartílago y de un lado a otro de la superficie articular ayuda a

transportar y distribuir nutrientes a los condrocitos, además de proveer lubricación y ayudar en la resistencia a grandes cargas en la articulación (MAROUDAS *et al.* 1991).

Colágenos.

Son las moléculas estructurales más abundantes en la matriz extracelular. El colágeno tipo II representa 90 – 95% del colágeno en la matriz extracelular y forma fibrillas y fibras entrelazadas con los agregados de proteoglicanos. Los colágenos tipo I, IV, V, VI, IX y XI también están presentes pero contribuyen sólo en una menor proporción. Estos colágenos ayudan a formar y estabilizar la red de fibrillas de colágeno tipo II. Todos los miembros de esta familia presentan una región que consiste de tres cadenas polipeptídicas (α -cadenas) que se enrollan en una triple hélice. Esta estructura le proporciona propiedades tensiles al cartílago, que ayudan a estabilizar la matriz (FOX *et al.* 2009; VEGA *et al.* 2002).

Proteoglicanos.

Estas moléculas son monómeros de proteínas altamente glicosilados. En el cartílago articular representan el segundo grupo de macromoléculas más grandes en la matriz extracelular. Los proteoglicanos consisten de una proteína nuclear con una o más cadenas lineales de glucosaminoglicanos covalentemente unidas (VEGA 2001). El cartílago articular contiene una variedad de proteoglicanos que son esenciales para su función normal, incluyendo el agrecano, decorina, biglicano y fibromodulina. El agrecano es el proteoglicano más grande y abundante, posee más de 100 cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato, se caracteriza por su capacidad para interactuar con el ácido hialurónico formando grandes agregados de proteoglicanos a través de la unión a proteínas. La decorina, biglicano y fibromodulina son moléculas mucho más pequeñas que están muy relacionadas con la estructura proteica. La decorina y el biglicano poseen 1 y 2 cadenas de dermatán sulfato, respectivamente, mientras que la fibromodulina posee varias cadenas de queratán sulfato. La

decorina y la fibromodulina interactúan con las fibrillas de colágeno tipo II y juegan un papel importante en la fibrillogénesis e interacciones interfibrillas (Fox *et al.* 2009).

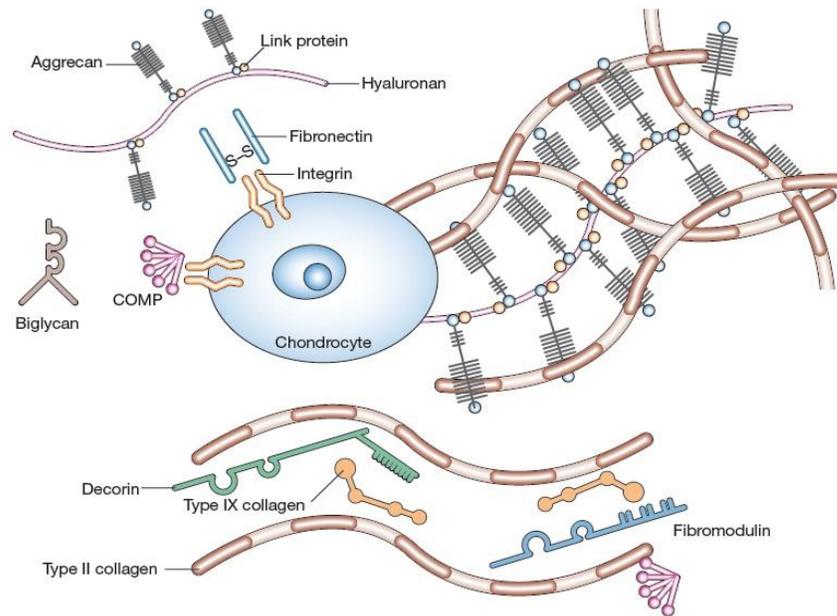


Figura 2. Esquema representativo de la matriz extracelular del cartílago. Se muestran los tres principales tipos de proteínas que lo conforman (colágenos, proteoglicanos y otras proteínas no colágenos) (CHEN *et al.* 2006).

2.1.3. Metabolismo.

Teniendo en cuenta que el cartílago articular es avascular, los condrocitos toman el oxígeno y las sustancias nutritivas del líquido sinovial mediante un mecanismo de difusión. Esto hace que sus requerimientos de oxígeno sean mucho menores que los de otras células del organismo. Los requerimientos energéticos de los condrocitos son abastecidos sobre todo por la glucólisis en condiciones anaeróbicas (ULRICH-VINTHER *et al.* 2003). Por otro lado, los condrocitos presentan receptores en su superficie celular para diversos factores de crecimiento y citocinas, que regulan actividades anabólicas y catabólicas. Los condrocitos segregan tanto los componentes de la matriz como las enzimas que la degradan (NESIC *et al.* 2006; VEGA 2001). Por lo tanto, son responsables de la homeostasis del tejido cartilaginoso. Los factores de crecimiento locales

son básicos para el metabolismo normal del cartílago. Muchos de ellos son sintetizados y liberados por los condrocitos y actúan de manera autocrina, sirviendo como estímulos anabólicos para la célula. En contraste, la mayoría de las citocinas tienen actividad catabólica y actúan de forma paracrina para estimular la expresión de enzimas catabólicas (ULRICH-VINTHER *et al.* 2003).

2.2. Lesión del Cartílago Articular.

El cartílago articular se degrada en respuesta a varios estímulos metabólicos, genéticos, vasculares, mecánicos y traumáticos. Las lesiones mecánicas pueden ocurrir como consecuencia de una única carga intensa o de pequeñas cargas repetidas. Estas cargas producen tres tipos diferentes de lesión según su profundidad: el primer tipo se denomina lesión microscópica por impacto, y en ella no hay rotura visible en la superficie del cartílago articular. El segundo tipo es la fractura condral, con rotura del cartílago articular de diversa profundidad. El tercero es la fractura osteocondral, que afecta al cartílago articular y al hueso subcondral. Cada tipo de lesión tiene un potencial de curación y un pronóstico a largo plazo, diferentes. Lo más importante para la evolución a largo plazo es la extensión de la lesión del cartílago. El tamaño, el lugar de la lesión, así como la edad, son factores que también influyen (ALFORD and COLE 2005a; JAMES and UHL 2001).

2.3. Reparación del Cartílago Articular.

La posibilidad para regenerar el cartílago articular sigue siendo un gran desafío para investigadores y cirujanos en la medicina moderna (ALFORD and COLE 2005a). Hasta ahora, ningún procedimiento tiene la capacidad de reproducir de manera confiable la composición biológica y las propiedades biomecánicas del cartílago hialino. Existen diversos procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de las lesiones focales de cartílago articular, entre los que se

encuentran la artroplastia por abrasión, la microfractura, la mosaicoplastia, los aloinjertos osteocondrales (ALFORD and COLE 2005b) y recientemente el trasplante de condrocitos autólogos (KURODA *et al.* 2011; SCHINDLER 2009). Sin embargo, los resultados clínicos no han sido del todo satisfactorios, principalmente a largo plazo, y no previenen la aparición de la enfermedad articular degenerativa (IBARRA *et al.* 2007).

2.3.1. Ingeniería de Tejidos.

La ingeniería de tejidos es un campo multidisciplinario de investigación recientemente emergente que combina los conocimientos de las ciencias de los materiales con la biología celular y molecular, y puede ofrecer una alternativa para el tratamiento de las lesiones condrales, mediante la generación de sustitutos de tejido funcionales *in vitro*, incluyendo el cartílago, para su subsecuente implantación *in vivo*. Su principio se basa en el cultivo y la expansión de células en estructuras o andamios tridimensionales biocompatibles y biodegradables que, con o sin la ayuda de factores de crecimiento, dan lugar a la formación de tejido nuevo para reparar o regenerar la estructura o función de tejidos lesionados o ausentes (SCHINDLER 2009; TULI *et al.* 2003; VACANTI 2006).

2.3.2. Candidatos Terapéuticos.

Las estrategias enfocadas en aumentar la actividad condrogénica son procedimientos terapéuticos muy interesantes, ya que la historia natural de un defecto en el cartílago articular comparte cierta similitud con el proceso condrogénico. Esfuerzos recientes dentro del área de la biología molecular se han enfocado en la búsqueda de agentes terapéuticos. Idealmente, este tipo de moléculas, deben ser capaces de modular el fenotipo celular, a través de su capacidad para fomentar la condrogénesis, estimular la proliferación celular, así

como la síntesis de matriz extracelular; este tipo de moléculas pueden ser tanto factores de crecimiento como factores de transcripción (CUCCHIARINI and MADRY 2005).

Los factores de crecimiento son un grupo de polipéptidos biológicamente activos producidos por nuestro organismo que han sido ampliamente reconocidos como importantes candidatos para promover los mecanismos antes mencionados, afectando el metabolismo de los condrocitos, de tal manera que promueven la regeneración del cartílago (TRIPPEL *et al.* 2007). Dentro del cartílago articular, un numeroso grupo de factores trabajan en conjunto para regular el desarrollo y la homeostasis del cartílago articular a lo largo de la vida (FORTIER *et al.* 2011). Dentro de este grupo de factores se pueden mencionar importantemente a miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (MARA 2010), como TGF- β 1 y TGF- β 2 (MOLLER *et al.* 2000) los cuales actúan como reguladores del crecimiento celular y de la síntesis de componentes de la matriz extracelular; el factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2) (INOUE *et al.* 2006; MADRY *et al.* 2004) el cual es un conocido mitógeno y factor de diferenciación; la proteína morfogenética ósea 2 (BMP-2) (MARTIN *et al.* 2001) y 7 (BMP-7) (FRENKEL *et al.* 2000) que aumentan la síntesis de proteoglicanos y mantienen el fenotipo de condrocito; y el factor de crecimiento parecido a insulina tipo I (IGF-I) (MADRY *et al.* 2001) que estimula la síntesis de colágeno y proteoglicanos. Experimentalmente todos ellos han mostrado influir positivamente en la recuperación del cartílago.

Por otro lado, algunas estrategias se han enfocado en la aplicación de factores de transcripción, proteínas de la matriz extracelular e inhibidores de la degeneración del cartílago articular. Los factores de transcripción modulan directamente la expresión de genes involucrados en condrogénesis, como colágeno tipo II y agregano (CUCCHIARINI and MADRY 2005). Modelos experimentales han mostrado las propiedades condrogénicas de ciertos factores de transcripción, de entre los cuales se puede mencionar a miembros de la familia SOX, como SOX5, SOX6 y SOX9 (AKIYAMA *et al.* 2002; KOLETTAS

et al. 2001; LEFEBVRE *et al.* 1997; PANDA *et al.* 2001), Cart-1 que actúa en la vía de condrogénesis en etapas tempranas del desarrollo (ZHAO *et al.* 1994) y miembros de la familia Ets los cuales juegan un rol importante en la regulación del remodelado de la matriz extracelular (SUMARSONO *et al.* 1996; TROJANOWSKA 2000).

2.3.2.1. Factor de Crecimiento Parecido a Insulina Tipo I.

El IGF-I es un polipéptido de 7.6 kDa que fue primeramente identificado como un factor de sulfatación debido a su habilidad para estimular la incorporación de sulfatos en el cartílago, pero puede ser mejor descrito como un factor anabólico para el cartílago y los condrocitos (FORTIER *et al.* 2002; MADRY *et al.* 2005). El IGF-I es el principal factor estimulante, en suero y fluido sinovial, para la síntesis de matriz cartilaginosa (LOESER *et al.* 2003); también incrementa la síntesis *in vitro* de colágeno tipo II y proteoglicanos en cultivos de cartílago y condrocitos articulares (O'CONNOR 2000). Debido a lo anterior, el IGF-I ha sido considerado como el principal factor anabólico para las células cartilaginosas (IZAL *et al.* 2008). Además, le provee estabilidad fenotípica a los condrocitos y se encuentra almacenado en la matriz extracelular unido a los proteoglicanos por medio de proteínas de unión a IGF-I (GETGOOD *et al.* 2009).

2.3.2.2. Factor de Transcripción SOX9.

El factor de transcripción SOX9 pertenece a la familia de factores de transcripción SOX. Este grupo de factores poseen el dominio de grupo de alta movilidad (HMG, por sus siglas en inglés) que contribuye a la unión con el DNA en su surco menor (AKIYAMA 2008). SOX9 se expresa en todas las células pre-condrocíticas y condrocíticas durante el desarrollo embrionario (MURAKAMI *et al.* 2000), promoviendo la diferenciación de células madre hacia el linaje condrocítico y hacia su diferenciación a condrocitos (PANDA *et al.* 2001). Se ha

mostrado que SOX9 se une y activa a elementos potenciadores de genes específicos en condrocitos *in vitro* (IKEDA *et al.* 2004). Por lo tanto, esta proteína es un importante regulador del fenotipo de estas células especializadas y controla la expresión de los genes COL2A1, COL9A1, COL11A2, agregano y de la proteína de unión a cartílago, todos los cuales codifican proteínas importantes que forman parte de la matriz extracelular del cartílago (HARDINGHAM *et al.* 2006).

2.4. Transferencia de Genes en Condrocitos Articulares.

Ya que los condrocitos son las células nativas del cartílago articular, son el blanco lógico para la modificación genética y desde hace algunos años, se convirtieron en el centro de atención dentro del estudio del cartílago osteoartrítico, debido a los cambios patológicos en sus patrones de expresión genética, una disminuida habilidad para producir los componentes de la matriz extracelular y un aumento de la liberación de enzimas que la degradan (CUCCHIARINI and MADRY 2005; TRIPPEL *et al.* 2004).

Se ha reportado en la literatura, el uso de diversos vectores para acarrear, introducir y expresar genes que funcionen como agentes terapéuticos. Dentro de estos vectores se encuentran los de tipo adenovirus, retrovirus, virus adeno-asociados, lentivirus y plasmídicos que portan el cDNA de algún factor terapéutico (GELSE 2005; TRIPPEL *et al.* 2007). En general, hay pocos trabajos que reportan el uso de plásmidos como vehículos para introducir genes en condrocitos (LEFEBVRE *et al.* 1997; MADRY *et al.* 2005; SCHMAL *et al.* 2005), sobre todo de plásmidos que sean utilizados en conjunto para expresar dos genes al mismo tiempo.

2.5. Antecedentes Particulares del Laboratorio de Terapia Celular.

En la tesis de doctorado del Dr. en C. Jorge Lara Arias realizada en el laboratorio de terapia celular, se llevó a cabo la transfección y co-transfección de IGF-I y de FGF-2 en un cultivo dinámico de condrocitos humanos incluidos en una matriz de fibrina humana. También se realizó este tipo de cultivo adicionando las proteínas recombinantes al medio de cultivo y se evaluó la producción de los diferentes componentes de cartílago como colágeno tipo I, tipo II y glicosaminoglucanos durante 4 semanas. Al final del ensayo, se encontró que la producción de colágeno tipo II y de glicosaminoglucanos, bajo las diferentes condiciones de estímulo fue bastante similar. Bajo estas mismas condiciones, también se detectó una importante disminución en la producción de colágeno tipo I.

Sin embargo, ambos tratamientos produjeron una cantidad significativamente mayor de componentes de la matriz extracelular comparándolos con los condrocitos cultivados sin estos estímulos. El haber logrado una mayor proporción de colágeno tipo II con respecto al colágeno tipo I, se acerca más a la producción de un cartílago hialino y no a un fibrocartílago, el cual es el tejido que en primera instancia se forma en respuesta a la lesión, pero que a su vez no le proporciona las propiedades biomecánicas requeridas a la articulación, lo que no sucede con el cartílago articular.

3. JUSTIFICACIÓN.

La ingeniería de tejidos es uno de los campos más activos en cuanto a la reparación de defectos articulares se refiere. A pesar de esto, aún no se consigue restablecer por completo la función normal ni reproducir adecuadamente la composición biológica y las propiedades biomecánicas de cartílago dañado, en la totalidad de los casos tratados. Así, con la intención de mejorar la calidad del tejido producido por los condrocitos, es necesario seguir en la búsqueda de una estrategia que permita la reproducción de un cartílago funcional, con el cual se logre reparar de una mejor manera, y a largo plazo, las lesiones articulares.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo General.

Evaluar la producción de componentes de la matriz extracelular de condrocitos cultivados en monocapa mediante la sobreexpresión de SOX9 e IGF-I.

4.2. Objetivos Específicos.

1. Construir los plásmidos de expresión para los genes SOX9 e IGF-I.
2. Determinar la expresión de SOX9 e IGF-I en condrocitos transfectados y no transfectados cultivados *in vitro*.
3. Determinar y comparar la producción de colágeno tipo I, colágeno tipo II y glucosaminoglucanos en condrocitos transfectados y no transfectados, cultivados *in vitro*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1. Construcción de los Plásmidos de Expresión.

A partir de los plásmidos comerciales pSPORT1-IGF-I, portador del cDNA de IGF-I, y pCMV-SPORT6-SOX9, portador del cDNA de SOX9, (Open Biosystems Inc., Huntsville, AL, USA) se construyó el plásmido de expresión pCMV-SPORT6-IGF-I. Ambos plásmidos fueron cortados con las enzimas de restricción NotI y Sall, con lo cual se liberaron las secuencias codificantes de los genes IGF-I y SOX9, generando fragmentos de 787 pb y de 2603 pb respectivamente. El corte de las enzimas se verificó por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1% (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), para después cortar y purificar las bandas correspondientes a IGF-I y al plásmido pCMV-SPORT6 mediante el estuche comercial Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Se subclonó la secuencia de IGF-I en el plásmido pCMV-SPORT6 ya que éste es un plásmido de expresión en células de mamífero portador del promotor de citomegalovirus, el cuál es un promotor fuerte. Se llevó a cabo la preparación y transformación de bacterias *Escherichia coli* calcio competentes de la cepa TOP-10. Se seleccionaron clones con base en su resistencia a una concentración de ampicilina (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) de 50 µg/mL y se les extrajo el DNA plasmídico por medio de la técnica de lisis alcalina. Posteriormente las clones positivas fueron caracterizadas con las enzimas de restricción NotI/Sall. El corte de las enzimas se verificó en geles de agarosa al 1%. Se prepararon y purificaron muestras de ambos plásmidos para su uso en los ensayos de transfección, mediante una producción a mediana escala empleando el estuche de QIAGEN® Plasmid Midi Kit (QIAGEN Inc., Sta. Clarita, CA, USA). Los parámetros de calidad y concentración se verificaron empleando el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA).

5.2. Origen de los Condrocitos.

Las células utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Dr. en C. Jorge Lara (Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario) de los excedentes de cultivos primarios correspondientes a pacientes que solicitaron un tratamiento para lesiones del cartílago articular, mediante la técnica de cultivo e implantación de condrocitos autólogos (CONDROGRAFT®), implementada en el Banco de Hueso y Tejidos del Servicio de Ortopedia y Traumatología del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, en colaboración con el Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.3. Cultivo y Transfección de Condrocitos Humanos.

Se emplearon cultivos primarios de condrocitos procedentes de biopsias de características osteocondrales, de acuerdo al protocolo establecido por el Dr. en C. Lara Arias: primero se macera la biopsia en pequeños trozos y se somete a varios ciclos de digestiones enzimáticas, empelando tripsina/EDTA al 0.25% (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA). Posteriormente, la digestión sigue con colagenasa tipo II (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) a 37°C y en agitación continua. Las células contenidas en el sobrenadante se sedimentan por centrifugación a 1000 rpm por 10 min. Para el cultivo celular, se emplearon placas de 6 pozos (Costar® Corning Incorporated, Corning, NY, USA) a una densidad de 2×10^5 células por pozo y cámaras de cultivo (chamber slide system) de 4 pozos (Nunc™, Thermo Scientific, Rochester, NY, USA) a una densidad celular de 2×10^4 células por pozo. El medio utilizado para el cultivo fue Opti-MEM I (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) suplementado con 10% de suero de bovino fetal (SBF) (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 50 µg/mL de Gentamicina (Laboratorios Química SON'S, Cholula, Puebla, MEX) y 0.25

$\mu\text{g/mL}$ de Fungizol (GIBCO®-BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA); todo en un ambiente al 5% de CO_2 y una humedad relativa del 100%. Para la transfección transitoria se empleó el agente transfectante FuGENE® 6 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) y las condiciones de transfección (relación agente transfectante: concentración de DNA) se establecieron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, en una confluencia celular aproximada del 80-90%. Se probaron diferentes relaciones de FuGENE® 6: plásmido para calcular la eficiencia de transfección, la cual fue determinada mediante el conteo de células que expresaran la proteína verde fluorescente (green fluorescent protein, GFP). Las células transfectadas fueron teñidas con medio de montaje que contiene el reactivo 4',6-diamidino-2-fenilindol o DAPI (VECTASHIELD® Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) el cual tiñe únicamente los núcleos celulares para así poder diferenciar, a través del microscopio de fluorescencia (Nikon 50i; Software NIS Elements BR 2.30), los condrocitos que expresaban GFP de aquellos que no lo hacían. Al final, se decidió usar la relación 3:1 que fue con la que se observó una mayor expresión de la GFP al microscopio. La viabilidad de los condrocitos transfectados se evaluó con el método de tinción con azul tripán (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA) y conteo en cámara de Neubauer. A los 9 días de cultivo post-transfección se colectó el medio sobrenadante y las células se levantaron de la monocapa con tripsina EDTA 0.25%, se centrifugó todo junto por 5 min a 1500 rpm y la pastilla se resuspendió en 1 o 2 mL de medio de cultivo.

5.4. Extracción de RNA y RT-PCR.

Se extrajo el RNA total de los condrocitos transfectados en los días 3, 6 y 9 de cultivo post-transfección, siguiendo el protocolo establecido en el estuche comercial de la marca Purescript® (Gentra Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). Se verificó la integridad del RNA extraído en geles de agarosa al 0.8% y posteriormente se realizó la retrotranscripción empleando la enzima M-MLV (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Las reacciones tanto de

retrotranscripción como de PCR se montaron en el termociclador Geneamp PCR System 9700 (Applied Biosystems™). Para la síntesis de cDNA las condiciones fueron 25°C/10 min, 37°C/60 min, 94°C/5 min y 4°C/10 min. Se utilizaron oligonucleótidos específicos para lograr la detección por PCR del gen constitutivo GAPDH, así como de IGF-I, SOX9, colágeno tipo I y colágeno tipo II, de los cuales se muestra su secuencia y el tamaño del fragmento que amplifican en la Tabla 1. Las condiciones para la amplificación de GAPDH fueron 94°C/5 min, 35 ciclos (94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1 min) y 72°C/5 min, para IGF-I 94°C/5 min, 30 ciclos (94°C/30 seg, 60°C/1 min, 72°C/30 seg) y 72°C/5 min, para SOX9 94°C/5 min, 36 ciclos (94°C/30 seg, 60°C/1 min, 72°C/45 seg) y 72°C/5 min, para colágeno tipo I 94°C/5 min, 35 ciclos (94°C/30 seg, 68°C/30 seg, 72°C/1 min) y 72°C/3 min y para colágeno tipo II 94°C/5 min, 35 ciclos (94°C/30 seg, 65°C/30 seg, 72°C/1 min) y 72°C/3 min. Para llevar a cabo todas las reacciones se empleó el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA) en un volumen final de reacción de 10 µL (Tabla 2). Se verificaron los tamaños esperados de los productos de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa, en donde la concentración de agarosa dependió del tamaño del fragmento (de 1 a 2%). Los geles se observaron en un fotodocumentador de luz UV (Gel Documentation System 1000, BIORAD). Se realizó el análisis densitométrico de las imágenes de los geles con el software Phoretix 1D, normalizando cada uno de los resultados con la expresión del gen constitutivo GAPDH.

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para amplificar parte de las secuencias de GAPDH, Colágeno tipo I, Colágeno tipo II, IGF-I y SOX9.

Oligonucleótido	Secuencia	Producto (pb)
Fw GAPDH	5'-AAGATGGCCCAGGAGAACCCCAAG-3'	980
Rv GAPDH	5'-TAATCCTTCATGTGCACCGCCCTG-3'	
Fw COLI	5'-ATGACGTGATCTGTGACGAGAC-3'	737
Rv COLI	5'-TACTACCACGATGACCACGACG-3'	
Fw COLII	5'-GAGGTGGATGCCACACTCAAGTCCCT-3'	215
Rv COLII	5'-GCCAGTGTCCATGTTGCAGAAAACCT-3'	
Fw IGF-I	5'-CAGAATTCACAATGGGAAAAATCAGCAGTCTTCC-3'	473
Rv IGF-I	5'-CTAGATGTCGACATCCTGTAGTTCTTGTTCCTG-3'	
Fw SOX9	5'-TCATGAAGATGACCGACGAGCA-3'	835
Rv SOX9	5'-TTGGAGATGACGTCGCTGCTCA-3'	

Tabla 2. Reactivos empleados en las reacciones de PCR.

Reactivo	Concentración Final	Volumen (µL)
Master Mix 2X	1X	5.0
P_{Fw} (10 mM)	0.6 µM	1.0
P_{Rv} (10 mM)	0.6 µM	1.0
H₂O	-	1.0
cDNA	< 200 ng/µL	2.0
Volumen Final		10.0

5.5. Producción de Glucosaminoglucanos.

Los glucosaminoglucanos sulfatados (condroitín sulfato, heparán sulfato, queratán sulfato y dermatán sulfato) que fueron producidos y liberados al medio de cultivo se cuantificaron por medio de un análisis espectrofotométrico utilizando la sonda metacromática azul de dimetilmetileno (DMB) mediante el estuche comercial para la detección de glucosaminoglucanos de Rheumera® (Astarte Biologics, Redmond, WA, USA). La unión del DMB a los glucosaminoglucanos sulfatados induce un cambio en el espectro de absorción el cual es directamente proporcional a la cantidad de glucosaminoglucanos sulfatados. Se realizó una curva de calibración utilizando condroitín sulfato

como estándar, del cual se prepararon diluciones seriadas partiendo de una concentración de 10 µg/mL. Se mezclaron 100 µL del estándar de 10 µg/mL con 100 µL de medio Opti-MEM® I suplementado con 10% de SBF para obtener una concentración de 5 µg/mL. Se repitió este procedimiento para obtener concentraciones de estándar de 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 y 0.1563 µg/mL, que fueron las concentraciones que se utilizaron para realizar la curva de calibración. Las mediciones se hicieron en placas de 96 pozos en el lector de placas multi-modo Synergy™ HT (BioTek® Instruments Inc., Winoosk, VE, USA), teniendo los resultados como absorbancia a una longitud de onda de 525 nm. Se mezclaron 100 µL de DMB con 100 µL de cada estándar o de medio sobrenadante, de esta manera el estándar con la concentración de 10 µg/mL es ahora de 5 µg/mL, el de 5 µg/mL se convierte en 2.5 µg/mL y así sucesivamente con las demás concentraciones. El blanco utilizado fue medio Opti-MEM® I suplementado con 10% de SBF, cuya absorbancia se restó de todas las mediciones. Después de construir la curva de calibración se calculó la concentración de los glucosaminoglucanos/mL presentes en los sobrenadantes de cada uno de los cultivos, sustituyendo los datos de absorbancia obtenidos por el valor de “y” en la ecuación de la recta.

5.6. Inmunocitoquímica.

Para la detección de las moléculas de colágeno en el cultivo en monocapa realizado en las cámaras de cultivo, se utilizaron anticuerpos primarios específicos para la detección de colágeno tipo I y tipo II (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA). Se empleó el estuche comercial Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB detection IHC kit (Abcam Inc., Cambridge, MA, USA) como sistema de detección inmunocitoquímico. En primera instancia las células fueron fijadas con una mezcla de metanol/acetona en una relación 1:1 incubando a -20°C por 20 min, exponiendo así los antígenos de las células. Posteriormente se bloquearon tanto la peroxidasa endógena como las proteínas para después incubar con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en cámara

húmeda. Luego se añadió el anticuerpo secundario, se incubó por media hora y se hizo el revelado con una mezcla de sustrato/cromógeno (10:1). Por último se llevó a cabo una contratinción contrastando con hematoxilina de Harris y las muestras se deshidrataron en concentraciones sucesivas de etanol 70, 95 y 100%, pasando al final por dos cambios de xilol. Las células ya teñidas en las laminillas se cubren con la resina entellán y cubreobjetos. Se tomaron imágenes de campos al azar en cada laminilla con contraste de fases en el microscopio de campo claro Nikon 50i que cuenta con el Software NIS Elements BR 2.30.

6. RESULTADOS.

6.1. Construcción y caracterización de los plásmidos de expresión para los genes SOX9 e IGF-I.

Se propagó el plásmido pCMV-SPORT6-SOX9 en bacterias *E. coli* TOP10 y se caracterizó mediante corte con las enzimas de restricción NotI y Sall con lo que se esperaba observar después de una electroforesis en gel de agarosa una banda de 4378 pb y otra de 2603 pb. Este último fragmento corresponde a la secuencia codificante del gen SOX9 (Figura 3).

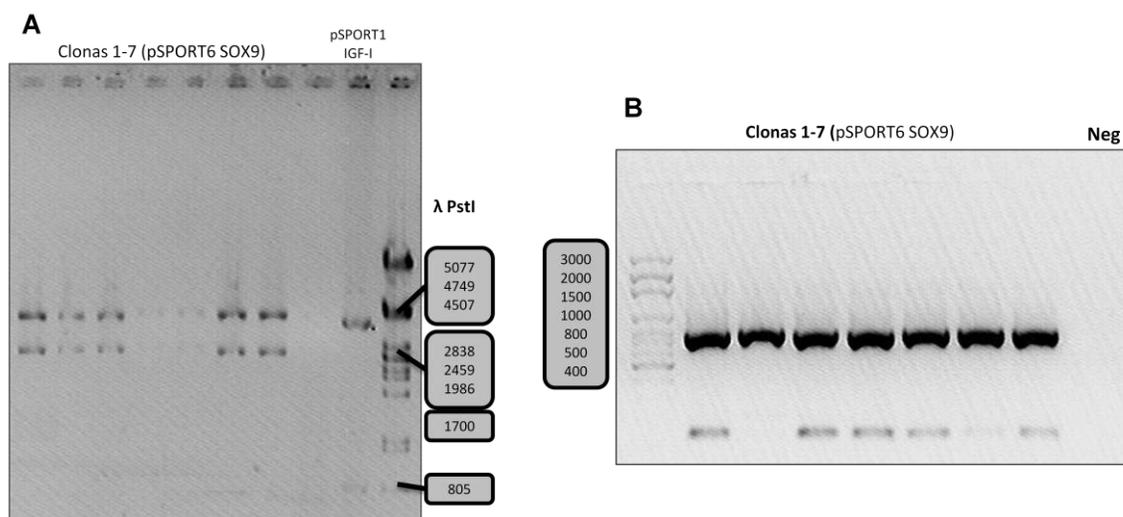


Figura 3. Caracterización del plásmido pCMV-SPORT6 SOX9. A) Corte con las enzimas de restricción NotI y Sall para observar los fragmentos de 4378 pb y 2603 pb. B) PCR para amplificar un fragmento de la región codificante de SOX9 de 835 pb. Se corrieron geles de agarosa al 1 y 1.5% respectivamente.

De igual forma, el plásmido pSPORT1 IGF-I, fue propagado y posteriormente caracterizado con las enzimas NotI y Sall, con lo que se libera un fragmento de 787 pb correspondiente a la secuencia codificante de IGF-I, el resto del plásmido se observa como una banda de 4089 pb. Para construir el plásmido pCMV-SPORT6 IGF-I se colocaron en una reacción de ligación los fragmentos cortados y purificados del plásmido pCMV-SPORT6 y el inserto IGF-I. Después

de realizar la extracción del DNA plasmídico se verificó la presencia de la construcción mediante PCR, amplificando la región codificante de IGF-I y a través del corte con las enzimas NotI y Sall para verificar la liberación del fragmento de 787 pb.

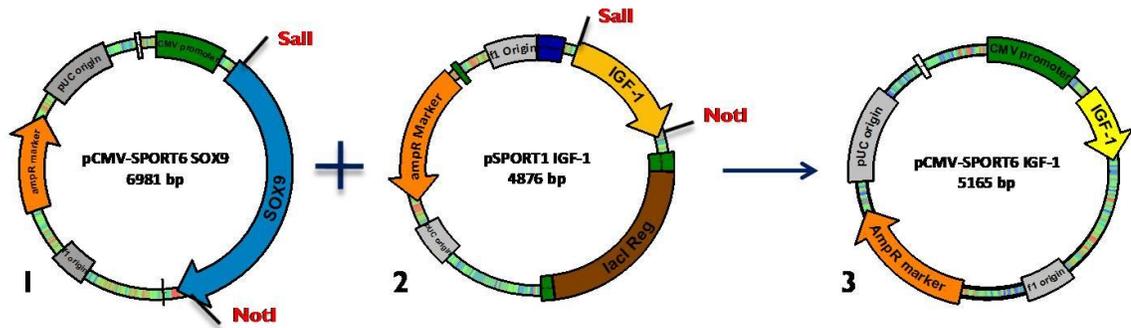


Figura 4. Esquemas de los plásmidos utilizados para la construcción del plásmido de expresión pCMV-SPORT6-IGF-I. (1. pCMV-SPORT6-SOX9, 2. pSPORT1-IGF-I, 3. pCMV-SPORT6-IGF-I).

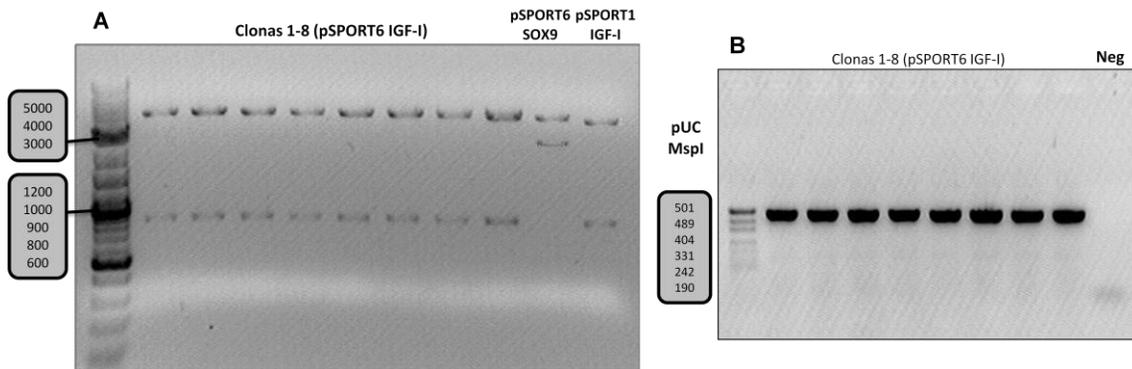


Figura 5. Caracterización del plásmido pCMV-SPORT6 IGF-I construido. A) Corte con las enzimas de restricción NotI y Sall para observar los fragmentos de 4378 pb y 787 pb. B) PCR para amplificar la región codificante de IGF-I de 476 pb. Se corrieron geles de agarosa al 1 y 1.5% respectivamente.

Una vez que se contaba con los plásmidos de expresión tanto de SOX9 como de IGF-I, se procedió a su producción y purificación a mediana escala por columna, obteniendo plásmidos de concentración y calidad aceptable para su uso en los ensayos de transfección.

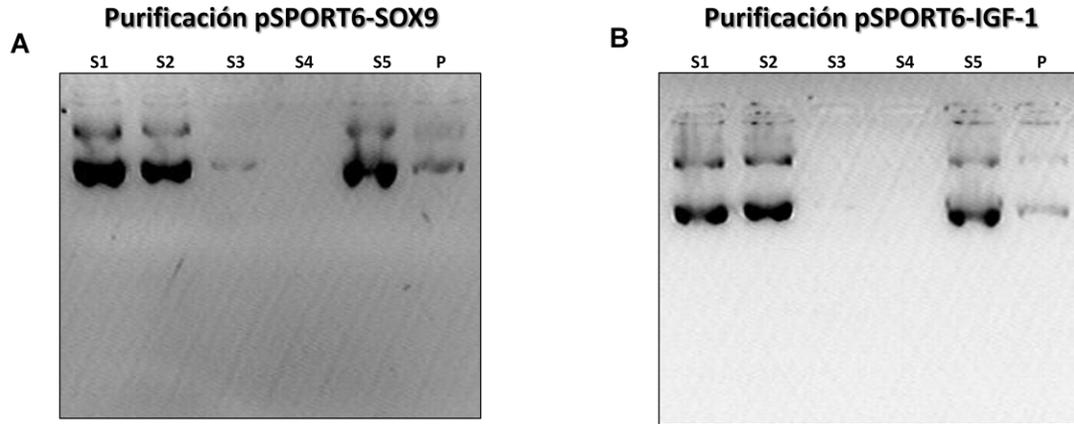


Figura 6. Purificación de los plásmidos pCMV-SPORT6 SOX9 (A) y pCMV-SPORT6 IGF-I (B) producidos a mediana escala (S1= Fracción sobrenadante del lisado; S2= Fracción de lo eluido a través de la columna; S3= Fracción del lavado 1; S4= Fracción del lavado 2; S5= Eluido conteniendo el plásmido puro; P= Dilución 1:10 del plásmido obtenido).

Tabla 3. Parámetros de concentración y calidad de los plásmidos pCMV-SPORT6 SOX9 y pCMV-SPORT6 IGF-I purificados y producidos a mediana escala.

Plásmido	Concentración (ng/ μ L)	Calidad (Abs 260/280)
pSPORT6 SOX9	1.016	1.85
pSPORT6 IGF-I	1.102	1.84

6.2. Estandarización de las condiciones de transfección en condrocitos humanos.

Una vez que se observó una confluencia aproximada del 80% en las placas de 6 pozos, se transfectaron los condrocitos con las diferentes relaciones de FuGENE 6 y plásmido (3:1, 3:2 y 6:1; μ L: μ g). Se observó la eficiencia de transfección mediante microscopía de fluorescencia al visualizar la expresión del gen reportero GFP en condrocitos transfectados (Figura 8). La eficiencia de transfección se obtuvo como porcentaje al dividir el número de células que expresaban el gen reportero, entre el número de células que no lo expresaban entre 100, observándose un mayor número de células que expresaban GFP cuando fueron transfectadas con la relación 3:1 (65.8%) que con la relación 3:2

(53.2%); siendo la relación 6:1 la que presentó una menor eficiencia (Figura 7). Cada relación de FuGENE 6 y plásmido se evaluó por triplicado y se contaron un total de 9 campos para cada relación (n=9).

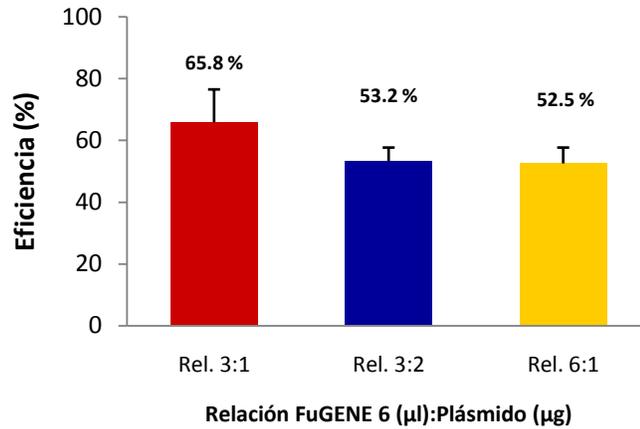


Figura 7. Estandarización de la transfección de condrocitos humanos con FuGENE 6. Se evaluaron distintas relaciones del agente transfectante FuGENE 6 y de Plásmido con la GFP como gen reportero. A las 48 h post-transfección se evaluó el porcentaje de células transfectadas.

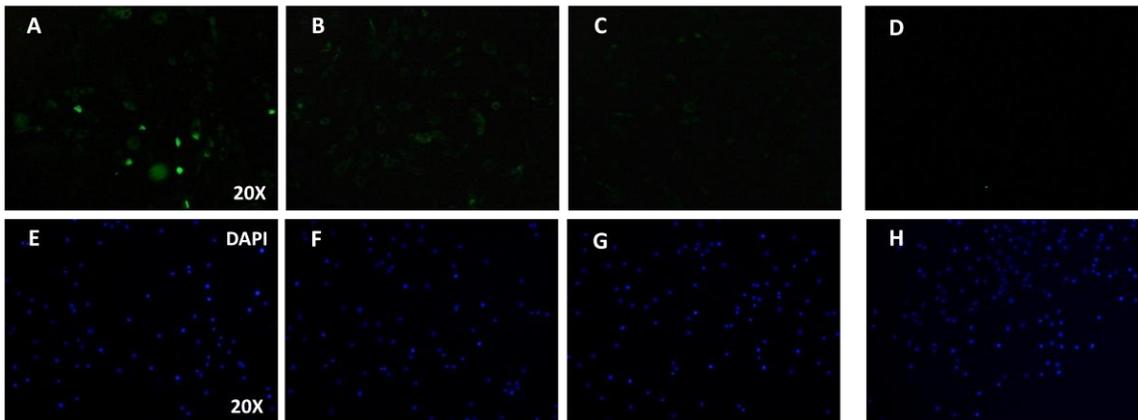


Figura 8. Imágenes representativas de condrocitos humanos transfectados expresando la GFP a las 48 h post-transfección (A-D) y tinción de los núcleos celulares con DAPI (E-H). A,E. Relación 3:1; B,F. Relación 3:2; C,G. Relación 6:1; E,H. Control negativo.

La viabilidad de los condrocitos transfectados se monitoreó hasta los 9 días que duraría el ensayo. En todos los casos se mantuvo una viabilidad por encima del 90% hasta el último día del experimento, como se puede apreciar en la Figura 9.

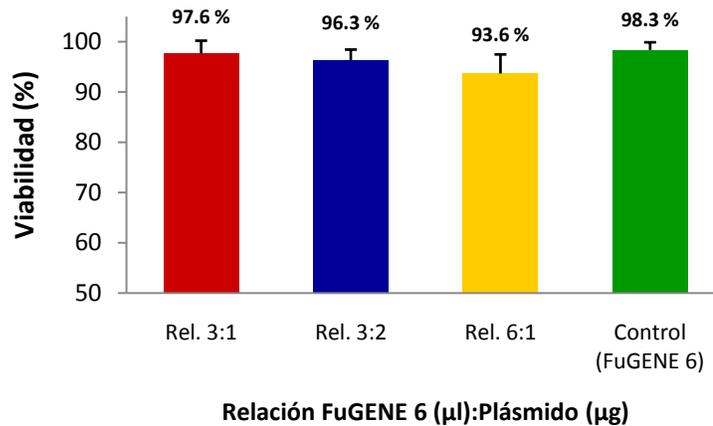


Figura 9. Viabilidad celular en condrocitos humanos transfectados con FuGENE 6. Se evaluaron distintas relaciones del agente transfectante FuGENE 6 y de Plásmido mediante tinción con azul tripán a los 9 días post-transfección.

6.3. Análisis de la expresión de los factores SOX9 e IGF-I por RT-PCR.

Posterior a la estandarización se llevó a cabo la transfección de condrocitos humanos con los plásmidos por separado y en cotransfección. Pasados 3, 6 y 9 días de cultivo post transfección se realizó la extracción de RNA total y RT-PCR. Los productos de PCR obtenidos de la amplificación del cDNA fueron analizados en geles de agarosa al 1% (cargando 3 μL de cada reacción por pozo). Las imágenes de los geles muestran una clara sobreexpresión de los factores condrocíticos SOX9 e IGF-I, lo cual se aprecia desde los 3 días y se mantiene constante hasta el día 9 de cultivo. La sobreexpresión de estos dos factores parece ser la misma y no verse afectada al cotransfectar los condrocitos durante los primeros 6 días (Figura 10).

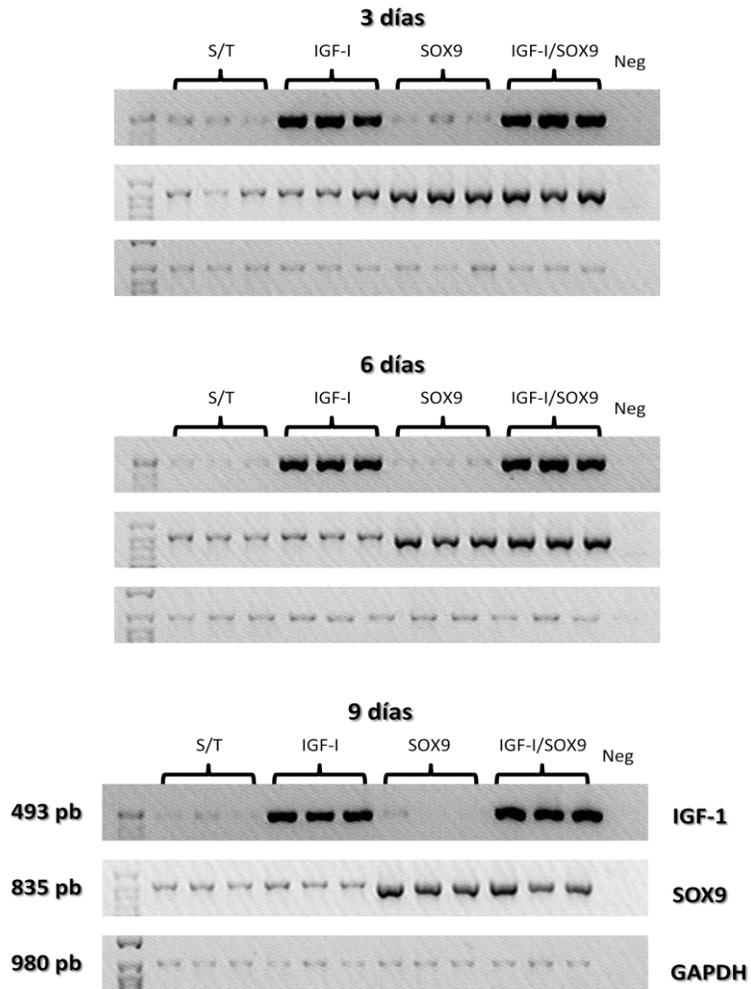


Figura 10. Expresión de los genes IGF-I, SOX9 y GAPDH en condrocitos humanos bajo diferentes condiciones de transfección.

El análisis densitométrico revela que la expresión de los dos factores va aumentando con el paso del tiempo. Cuando los condrocitos fueron transfectados solo con IGF-I y en combinación con SOX9 se observó un incremento notorio en la expresión de IGF-I, comparado con condrocitos que no fueron transfectados. Este mismo comportamiento se puede apreciar en cuanto a la expresión de SOX9 en condrocitos transfectados solo con este factor o en contransfección.

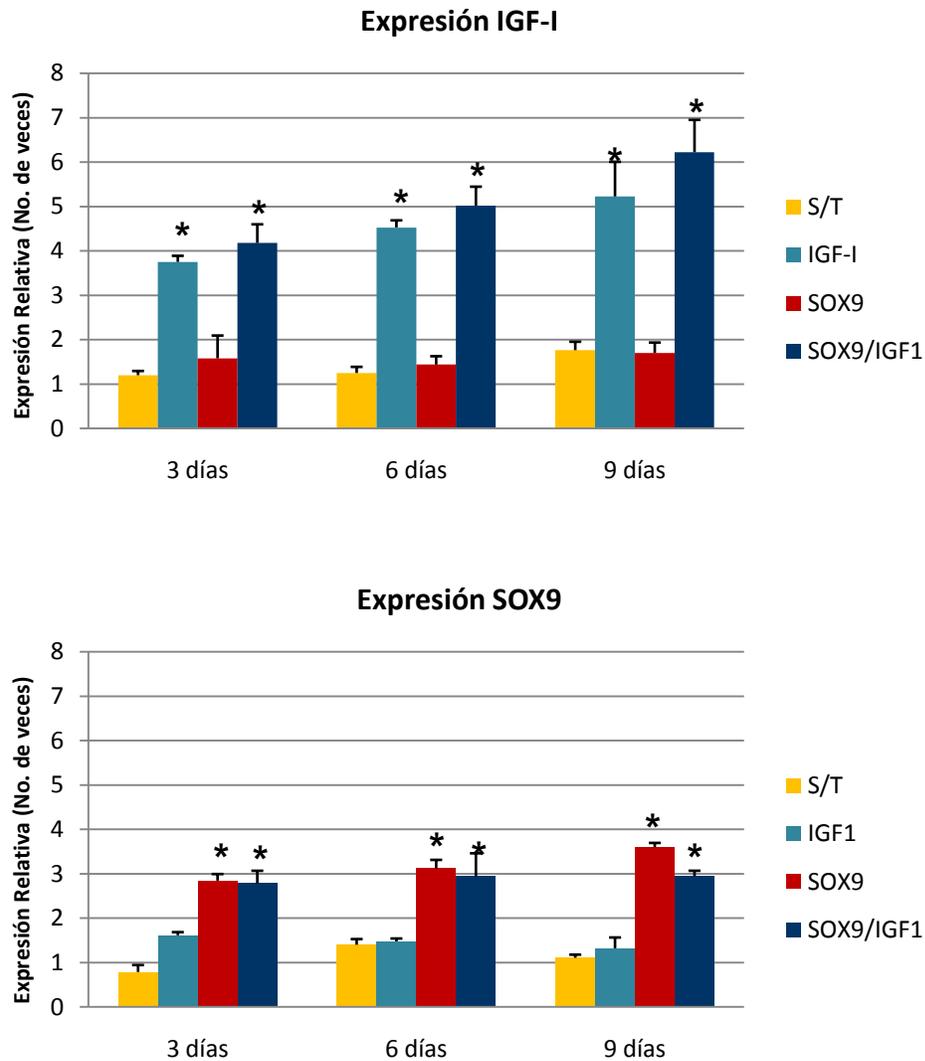


Figura 11. Representación gráfica del análisis densitométrico de la expresión de los genes IGF-I y SOX9 en condrocitos humanos bajo las diferentes condiciones de transfección. Los datos fueron normalizados con los valores de la expresión de GAPDH (* Diferencia estadísticamente significativa comparado con S/T; $p < 0.05$).

6.4. Análisis de la expresión de Colágeno Tipo I y Colágeno Tipo II por RT-PCR y Tinción ICQ.

De la misma forma que se llevó a cabo el análisis para verificar la expresión de los factores transfectados y utilizando el mismo RNA obtenido de la extracción de condrocitos transfectados y no transfectados, se determinó la expresión de

los genes que codifican para las proteínas colágeno tipo I y colágeno tipo II. Esto como evaluación de la respuesta de los condrocitos a la sobreexpresión de SOX9 e IGF-I. Se puede apreciar que desde los 3 días de cultivo post transfección hay presencia en cuanto a la expresión de colágeno tipo I y también se puede ver que la expresión de éste se disminuye a los 9 días en condrocitos que fueron cotransfectados (Figura 12).

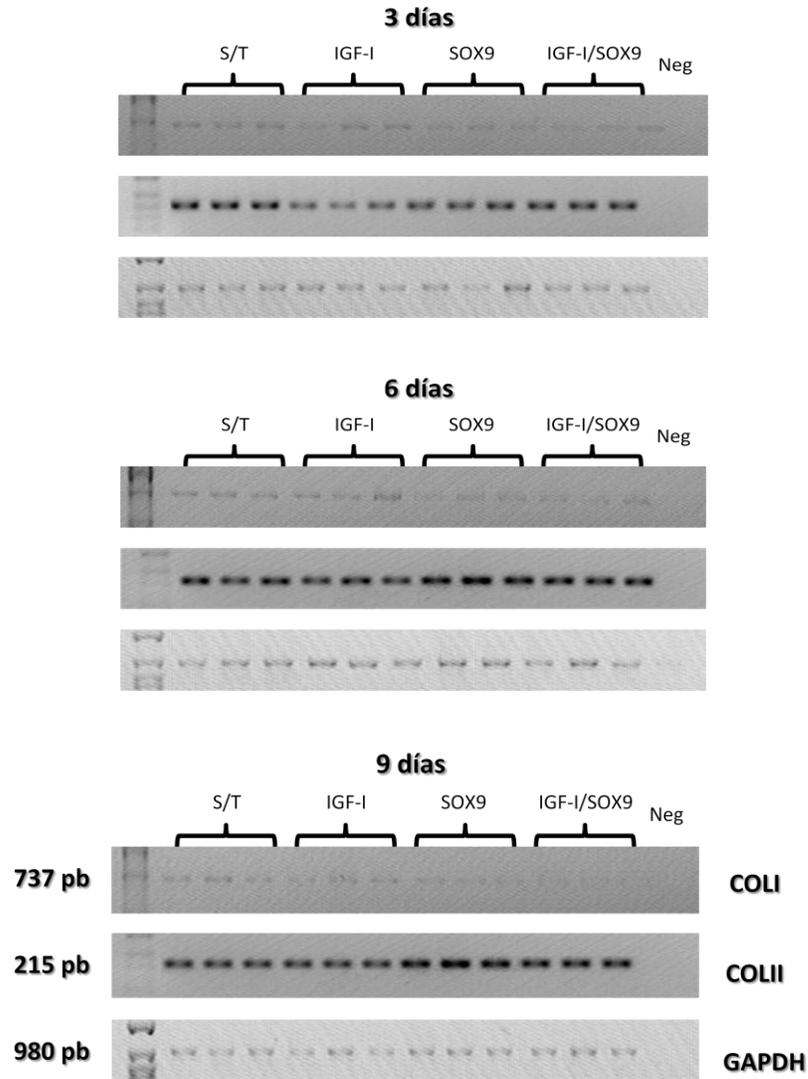


Figura 12. Expresión de colágeno tipo I, colágeno tipo II y GAPDH en condrocitos humanos bajo las diferentes condiciones de transfección.

El análisis densitométrico de estas imágenes permite ver que hay un aumento en la expresión de colágeno tipo I conforme avanzan los días, pero que va disminuyendo en condrocitos que fueron transfectados, sobre todo en aquellos que recibieron ambos genes. Para colágeno tipo II también se puede apreciar un aumento en su expresión al paso del tiempo, pero que esta expresión es mayor en condrocitos que fueron cotransfectados, comparando con las demás células transfectadas y no transfectadas (Figura 13).

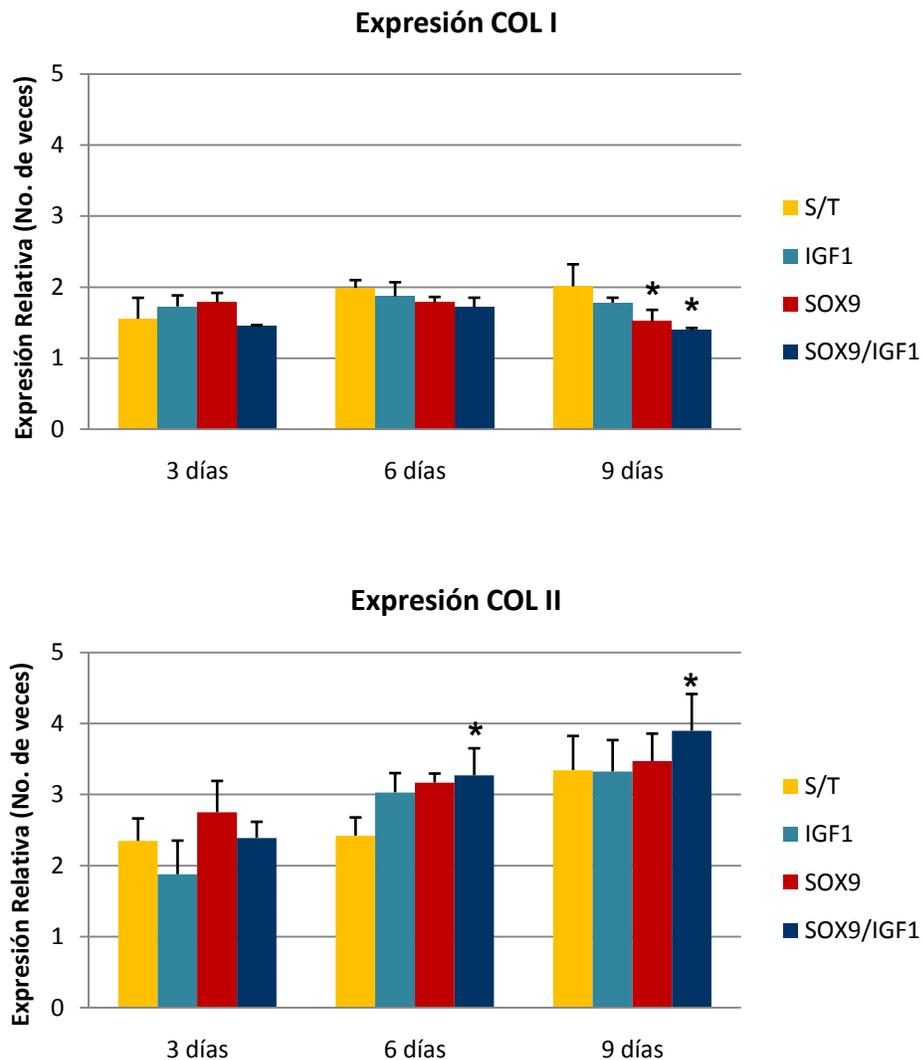


Figura 13. Representación gráfica del análisis densitométrico de la expresión de colágeno tipo I y colágeno tipo II en condrocitos humanos bajo las diferentes condiciones de transfección. Los datos fueron normalizados con los valores de la expresión de GAPDH (* Diferencia estadísticamente significativa comparado con S/T; $p < 0.05$).

Por otro lado, la expresión de estas dos proteínas también se evaluó por medio de tinción inmunocitoquímica (ICQ) con anticuerpos específicos para cada tipo de colágeno. En el caso de colágeno tipo I, la marca en las células se puede apreciar desde el tercer día en todos los tratamientos. De manera importante, se observa que cuando los condrocitos fueron transfectados sólo con SOX9 y cotransfectados con ambos genes hay una disminución en la intensidad de la señal este tipo de colágeno, lo cual se evidencia de manera clara en el noveno día de cultivo (Figura 14).

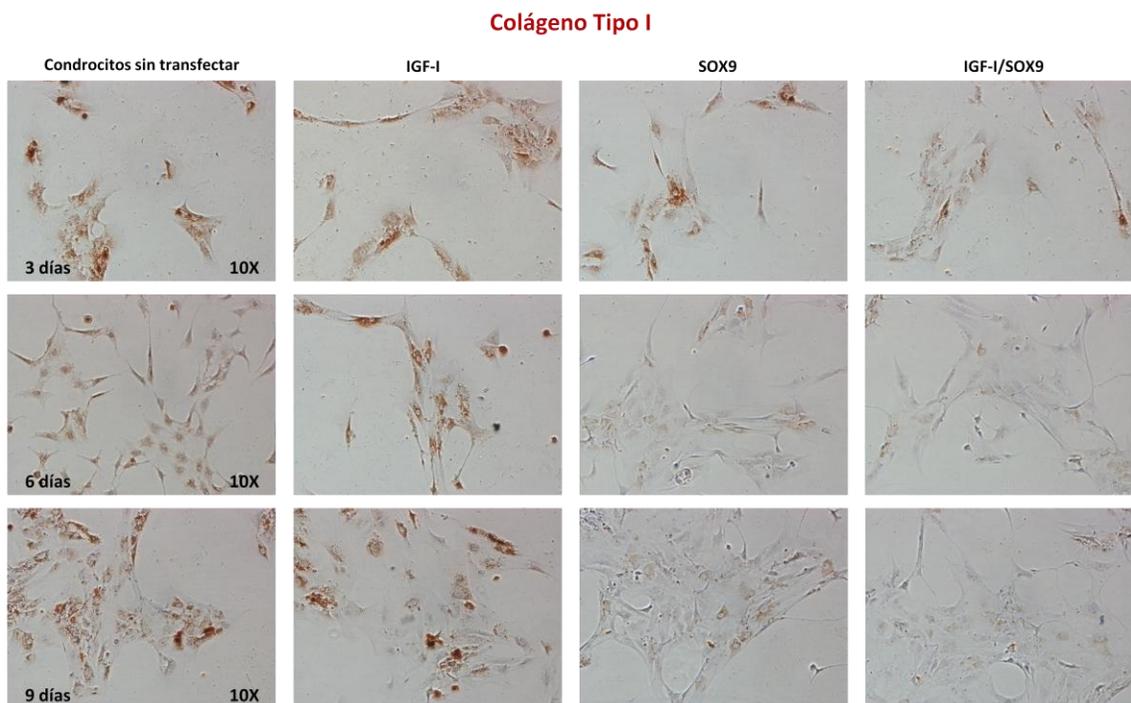


Figura 14. Detección de colágeno tipo I mediante tinción ICQ en condrocitos humanos cultivados en monocapa en cámaras de cultivo. Se aprecian células sin transfectar (Condrocitos sin transfectar), transfectados sólo con IGF-I (IGF-I), transfectados sólo con SOX9 (SOX9) y en condrocitos cotransfectados (IGF-I/SOX9) a los 3, 6 y 9 días de cultivo post transfección.

La presencia de colágeno tipo II en los condrocitos durante los primeros días de cultivo es muy similar en todos los casos, sin embargo, la intensidad de la señal que indica la presencia de este tipo de colágeno varía en condrocitos transfectados y no transfectados. La diferencia más significativa se observa a los 9 días de cultivo, en las células que fueron transfectadas sólo con SOX9 y las que fueron transfectadas con ambos genes. En donde la presencia de colágeno tipo II es mayor que en condrocitos que no fueron transfectados y que los que fueron transfectados solo con IGF-I. Bajo estas últimas condiciones se puede ver que la mayoría de las células están marcadas con el anticuerpo. Es notable la intensidad de marcaje en las células que fueron transfectadas con SOX9 o con la combinación de ambos genes. Tomando en cuenta los resultados con IGF-I solo, es probable que esto se deba al efecto de la sobreexpresión de SOX9 (Figura 15).

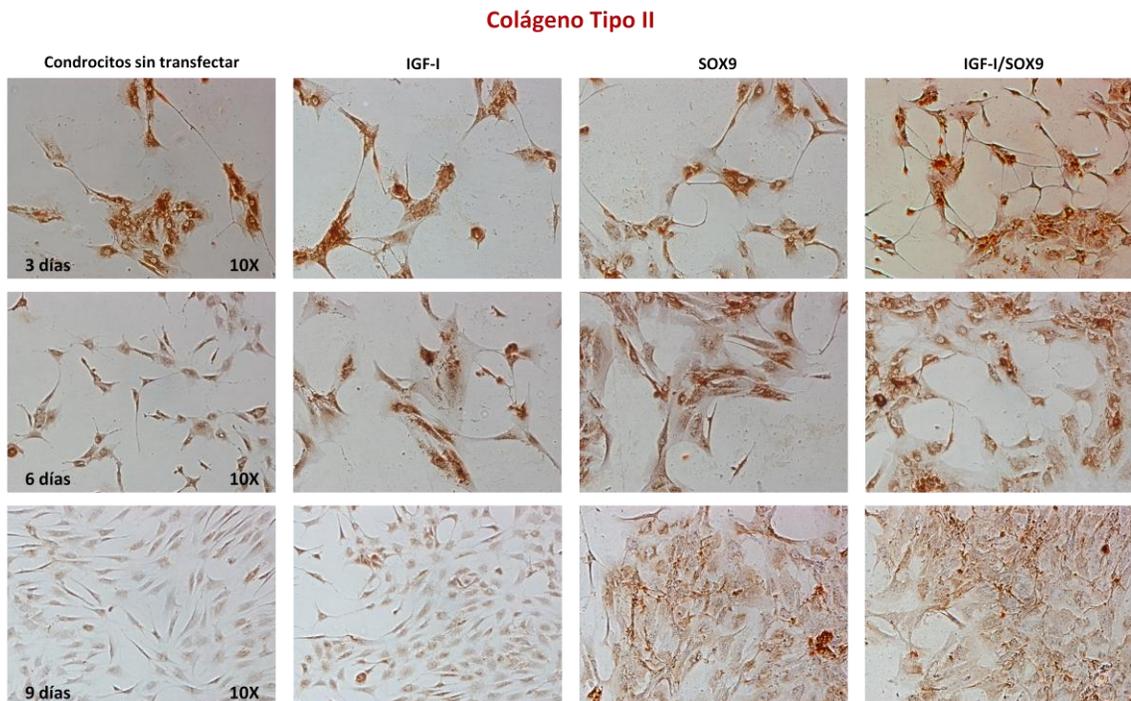


Figura 15. Detección de colágeno tipo II mediante tinción ICQ en condrocitos humanos cultivados en monocapa en cámaras de cultivo. Se aprecian células sin transfectar (Condrocitos sin transfectar), transfectados sólo con IGF-I (IGF-I), transfectados sólo con SOX9 (SOX9) y en condrocitos cotransfectados (IGF-I/SOX9) a los 3, 6 y 9 días de cultivo post transfección.

6.5. Producción de Glucosaminoglucanos.

Se evaluó la producción glucosaminoglucanos (GAG's), de otro de los componentes principales de la matriz extracelular del cartílago producidos por los condrocitos. Se cuantificó la presencia de los GAG's por medio de un ensayo espectrofotométrico con la ayuda de la sonda DMB en los sobrenadantes de los mismos cultivos de donde se obtuvo el RNA total de los condrocitos. En primera instancia se realizó una curva de calibración utilizando como estándar concentraciones conocidas de condroitín sulfato, en un rango de 0.1532 a 5 µg/mL. La curva realizada mostró un valor para el coeficiente de determinación (R^2) de 0.988 (Figura 16).

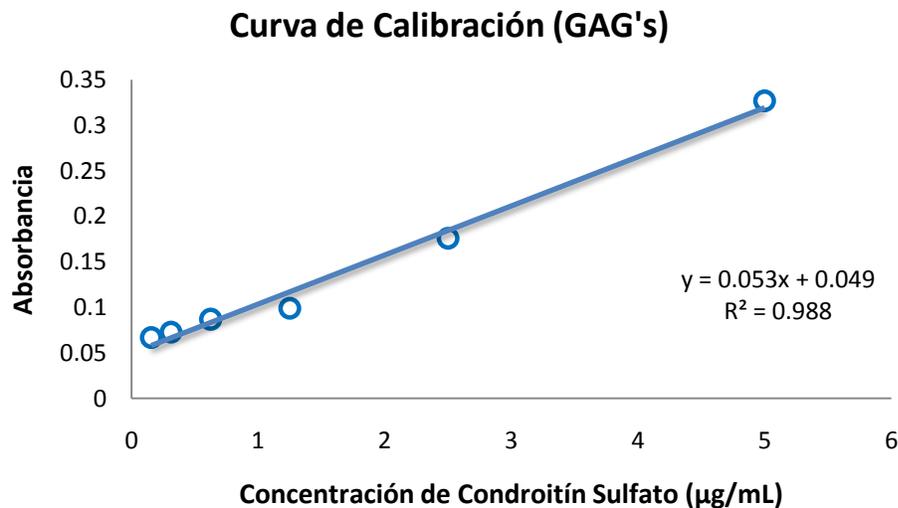


Figura 16. Curva de calibración para la cuantificación del contenido de GAG's en los sobrenadantes de los cultivos.

La Figura 17 muestra que la producción de GAG's presentes en los sobrenadantes de los cultivos fue mucho mayor en aquellas células que fueron transfectadas con ambos plásmidos, ni los condrocitos que permanecieron sin alguna modificación ni aquellos que fueron transfectados sólo con alguno de los

plásmidos presentaron una respuesta similar. En estos últimos hubo un ligero aumento en la producción de estos componentes, en comparación con los condrocitos no modificados. En todos los casos se observó un incremento en el contenido de GAG's con el paso de los días de cultivo después de su transfección.

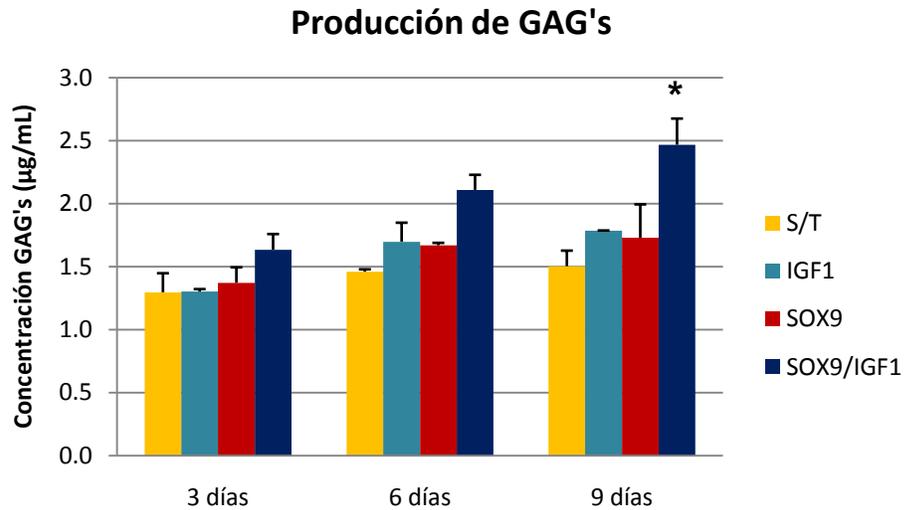


Figura 17. Cuantificación del contenido de GAG's en los sobrenadantes de condrocitos cultivados bajo las diferentes condiciones de transfección.

7. DISCUSIÓN.

Uno de los principales inconvenientes dentro de la ingeniería de tejidos, particularmente en lo que se refiere a la regeneración del cartílago articular, es el problema que se presenta en la clínica para obtener un número suficiente de condrocitos a partir de biopsias, esto para tratar de cubrir en su totalidad la zona lesionada en búsqueda de la reparación del tejido. De aquí que las células se tengan que expandir en cultivo antes de implantarse en el lugar de la lesión. Con la intención de que los condrocitos que sean implantados produzcan su propia matriz extracelular para reponer el tejido perdido, éstos se incluyen en diversos tipos de matrices para generar un cultivo tridimensional. En años recientes han ganado terreno las matrices de componentes biológicos y biodegradables. También se ha estudiado de manera importante el hecho de tratar a las células aisladas con agentes terapéuticos como los factores de crecimiento, ya sea adicionando las proteínas recombinantes al medio de cultivo o modificando genéticamente a los condrocitos con plásmidos que contengan las secuencias nucleotídicas codificantes. Aparte de los factores de crecimiento, otro tipo de moléculas terapéuticas sobre las cuales se han realizado importantes avances son los factores de transcripción. La transferencia de genes o cDNA que codifican para agentes terapéuticos como los ya mencionados, es una de las estrategias más empleadas en la actualidad orientadas a la reparación de las lesiones del cartílago articular. En general hay pocos reportes acerca del uso de plásmidos como estrategia de transfección en condrocitos humanos, en 2005 Schmal y colaboradores evaluaron la estimulación de condrocitos humanos al ser transfectados, por separado, con plásmidos que contenían las secuencias codificantes para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (SCHMAL *et al.* 2005). Más recientemente, en el reporte de Shi y colaboradores se comparó la expresión de los factores de crecimiento IGF-I y FGF-2 al utilizar dos estrategias de transfección en condrocitos articulares bovinos empleando plásmidos como vectores de expresión, primero realizando una cotransfección y después transfectando un solo plásmido, el cual contenía

dentro de su estructura las secuencias codificantes para ambos factores (SHI *et al.* 2009). En el presente trabajo se probó el efecto de la sobreexpresión del factor de crecimiento IGF-I y del factor de transcripción SOX9 en condrocitos humanos cultivados en monocapa, a través de su transfección con los vectores plasmídicos que contienen las secuencias codificantes para ambos factores.

Después de realizar la transfección en los condrocitos, el análisis densitométrico de los geles en los ensayos de RT-PCR muestra que la expresión de IGF-I en condrocitos transfectados fue hasta 4 veces más que la expresión basal de condrocitos que no fueron modificados. Para SOX9, también se dio un aumento en la expresión, el cual fue hasta 3.5 veces más comparado con la expresión basal en condrocitos que no fueron transfectados. La expresión de IGF-I se vio incrementada en condrocitos que fueron cotransfectados en comparación con condrocitos que fueron transfectados sólo con IGF-I a los tres tiempos de cultivo.

Por otra parte, a los 9 días de cultivo la expresión de SOX9 fue mayor en condrocitos que fueron transfectados sólo con el plásmido que contenía la secuencia de este gen en contraste con la expresión de SOX9 en condrocitos que fueron cotransfectados, mostrando una diferencia estadísticamente significativa. Cabe señalar que no hay datos que se puedan comparar directamente con nuestros resultados en cuanto a la expresión conjunta de SOX9 e IGF-I, sólo existen reportes del efecto que presentan estos dos genes en condrocitos ya sea por separado (AKIYAMA 2008; CAPITO and SPECTOR 2007; CUCCHIARINI *et al.* 2007; FORTIER *et al.* 2002; IZAL *et al.* 2008; MADRY *et al.* 2005) o en combinación con otros factores de crecimiento (CUCCHIARINI *et al.* 2009; LOESER *et al.* 2003; ORTH *et al.* 2011).

También se observaron diferencias importantes en cuanto a la expresión de colágeno tipo I, la cual disminuyó de manera significativa a los 9 días de cultivo post-transfección en condrocitos que fueron transfectados sólo con SOX9 (0.5 veces) y en condrocitos cotransfectados (0.6 veces), contrastando con lo que sucedió en las células que permanecieron sin modificación alguna donde la

expresión de este gen aumentó. Esta misma situación se presentó en las tinciones inmunocitoquímicas, donde se pudo confirmar la ausencia gradual de colágeno tipo I en condrocitos que estuvieron bajo la influencia de la sobreexpresión de SOX9. Por el contrario, al analizar los resultados de la expresión de colágeno tipo II se pudo notar como ésta se incrementó de manera significativa 0.85 y 0.6 veces desde los 6 y hasta los 9 días, respectivamente, cuando los condrocitos fueron transfectados con ambos factores, en comparación con lo expresado por las células que no fueron transfectadas. También se pudo observar este mismo incremento en las tinciones inmunocitoquímicas al notar como la cantidad de células así como la intensidad de la marca generada por la unión del anticuerpo iba siendo mayor en condrocitos que habían sobreexpresado sólo SOX9 y SOX9 e IGF-I simultáneamente.

Estos resultados concuerdan con trabajos anteriores en donde se reporta que la sobreexpresión de SOX9 en condrocitos articulares favorece la expresión y producción de colágeno tipo II al mismo tiempo que produce el efecto contrario con respecto al colágeno tipo I (CUCCHIARINI *et al.* 2009; CUCCHIARINI *et al.* 2007; HARDINGHAM *et al.* 2006). Al igual que en el caso de colágeno tipo II, también se logró una producción significativamente mayor de glucosaminoglucanos, otro tipo de moléculas importantes presentes en la matriz extracelular del cartílago articular, por parte de los condrocitos que fueron cotransfectados. Se observó que en condrocitos que fueron transfectados sólo con uno de los factores, la cantidad de glucosaminoglucanos aumentó con respecto a los condrocitos que no fueron transfectados, sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa.

Juntos, estos hallazgos son bastante alentadores ya que lo que principalmente se busca al modificar genéticamente los condrocitos es que sean capaces de producir una matriz extracelular lo más parecida posible a la del cartílago articular, en donde la cantidad de colágeno tipo II sea mayor que la de colágeno tipo I. Esto último, debido a que el colágeno tipo I es característico de un

fibrocartílago, el cual si se produce en el lugar de la lesión, no le proporcionará las propiedades tensiles necesarias para que el tejido nuevo sea igualmente resistente.

8. CONCLUSIONES.

Se logró una mayor producción de componentes principales de la matriz extracelular (Col II, GAG's) en condrocitos transfectados. El estímulo fue más evidente en la expresión simultánea de SOX9 e IGF-I (cotransfección).

La sobreexpresión de ambos factores en conjunto influyó en la expresión de proteínas características de la matriz extracelular aumentando el colágeno tipo II y disminuyendo el colágeno tipo I.

Con estos resultados se apoya una vez más la hipótesis de que el tratamiento con más de un agente terapéutico representa una alternativa atractiva para el tratamiento de las lesiones articulares.

Este podría ser el primer reporte del efecto de la combinación de la sobreexpresión de SOX9 e IGF-I en condrocitos humanos sobre la producción de componentes de la matriz extracelular del cartílago.

9. LITERATURA CITADA.

- AKIYAMA, H., 2008 Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol* **18**: 213-219.
- AKIYAMA, H., M. C. CHABOISSIER, J. F. MARTIN, A. SCHEDL and B. DE CROMBRUGGHE, 2002 The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* **16**: 2813-2828.
- ALFORD, J. W., and B. J. COLE, 2005a Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation, and treatment options. *Am J Sports Med* **33**: 295-306.
- ALFORD, J. W., and B. J. COLE, 2005b Cartilage restoration, part 2: techniques, outcomes, and future directions. *Am J Sports Med* **33**: 443-460.
- BUCKWALTER, J. A., and J. MARTIN, 1995 Degenerative joint disease. *Clin Symp* **47**: 1-32.
- BUCKWALTER, J. A. A. M. H. J., 1997 Articular Cartilage. Part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions. *The Journal of Bone and Joint Surgery* **79**: 600-611.
- CAPITO, R. M., and M. SPECTOR, 2007 Collagen scaffolds for nonviral IGF-1 gene delivery in articular cartilage tissue engineering. *Gene Ther* **14**: 721-732.
- CUCCHIARINI, M., and H. MADRY, 2005 Gene therapy for cartilage defects. *J Gene Med* **7**: 1495-1509.
- CUCCHIARINI, M., E. F. TERWILLIGER, D. KOHN and H. MADRY, 2009 Remodelling of human osteoarthritic cartilage by FGF-2, alone or combined with Sox9 via rAAV gene transfer. *J Cell Mol Med* **13**: 2476-2488.
- CUCCHIARINI, M., T. THURN, A. WEIMER, D. KOHN, E. F. TERWILLIGER, 2007 Restoration of the extracellular matrix in human osteoarthritic articular cartilage by overexpression of the transcription factor SOX9. *Arthritis Rheum* **56**: 158-167.
- CHEN, F. H., K. T. ROUSCHE and R. S. TUAN, 2006 Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**: 373-382.
- CHIANG, H., and C. C. JIANG, 2009 Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. *J Formos Med Assoc* **108**: 87-101.
- FORTIER, L. A., J. U. BARKER, E. J. STRAUSS, T. M. MCCARREL and B. J. COLE, 2011 The Role of Growth Factors in Cartilage Repair. *Clin Orthop Relat Res*.
- FORTIER, L. A., H. O. MOHAMMED, G. LUST and A. J. NIXON, 2002 Insulin-like growth factor-I enhances cell-based repair of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* **84**: 276-288.

- FOX, A., A. BEDI and S. RODEO, 2009 The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition and Structure. *Sports Health: A Multidisciplinary Approach* **1**: 461-468.
- FRENKEL, S. R., P. B. SAADEH, B. J. MEHRARA, G. S. CHIN, D. S. STEINBRECH, 2000 Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg* **105**: 980-990.
- GELSE, K., 2005 Gene Therapy Approaches for Cartilage Injury and Osteoarthritis *Current Medicinal Chemistry - Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* **4**: 265-279.
- GETGOOD, A., R. BROOKS, L. FORTIER and N. RUSHTON, 2009 Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? *J Bone Joint Surg Br* **91**: 565-576.
- HARDINGHAM, T. E., R. A. OLDERSHAW and S. R. TEW, 2006 Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. *J Anat* **209**: 469-480.
- HILDEBRAND, A., M. ROMARIS, L. M. RASMUSSEN, D. HEINEGARD, D. R. TWARDZIK *et al.*, 1994 Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J* **302 (Pt 2)**: 527-534.
- IBARRA, C., D. GARCADIAGO, V. MARTÍNEZ and C. VELASQUILLO, 2007 Ingeniería de Tejidos y Osteoartritis. *Reumatol Clin* **3**: 19-22.
- IKEDA, T., S. KAMEKURA, A. MABUCHI, I. KOU, S. SEK., 2004 The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum* **50**: 3561-3573.
- INOUE, A., K. A. TAKAHASHI, Y. ARAI, H. TONOMURA, K. SAKAO, 2006 The therapeutic effects of basic fibroblast growth factor contained in gelatin hydrogel microspheres on experimental osteoarthritis in the rabbit knee. *Arthritis Rheum* **54**: 264-270.
- IZAL, I., C. A. ACOSTA, P. RIPALDA, M. ZARATIEGUI, J. RUIZ, 2008 IGF-1 gene therapy to protect articular cartilage in a rat model of joint damage. *Arch Orthop Trauma Surg* **128**: 239-247.
- JAMES, C. B., and T. L. UHL, 2001 A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate. *J Athl Train* **36**: 413-419.
- KOLETTAS, E., H. I. MUIR, J. C. BARRETT and T. E. HARDINGHAM, 2001 Chondrocyte phenotype and cell survival are regulated by culture conditions and by specific cytokines through the expression of Sox-9 transcription factor. *Rheumatology (Oxford)* **40**: 1146-1156.

- KURODA, T., T. MATSUMOTO, Y. MIFUNE, T. FUKUI, S. KUBO, 2011 Therapeutic strategy of third-generation autologous chondrocyte implantation for osteoarthritis. *Ups J Med Sci* **116**: 107-114.
- LEFEBVRE, V., W. HUANG, V. R. HARLEY, P. N. GOODFELLOW and B. DE CROMBRUGGHE, 1997 SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* **17**: 2336-2346.
- LOESER, R. F., C. A. PACIONE and S. CHUBINSKAYA, 2003 The combination of insulin-like growth factor 1 and osteogenic protein 1 promotes increased survival of and matrix synthesis by normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* **48**: 2188-2196.
- MADRY, H., G. EMKEY, D. ZURAKOWSKI and S. B. TRIPPEL, 2004 Overexpression of human fibroblast growth factor 2 stimulates cell proliferation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *J Gene Med* **6**: 238-245.
- MADRY, H., G. KAUL, M. CUCCHIARINI, U. STEIN, D. ZURAKOWSKI, 2005 Enhanced repair of articular cartilage defects in vivo by transplanted chondrocytes overexpressing insulin-like growth factor I (IGF-I). *Gene Ther* **12**: 1171-1179.
- MADRY, H., D. ZURAKOWSKI and S. B. TRIPPEL, 2001 Overexpression of human insulin-like growth factor-I promotes new tissue formation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *Gene Ther* **8**: 1443-1449.
- MARA, C. S., A. S. DUARTE, A. SARTORI, A. C. LUZO, S. T. SAAD, I. B. COIMBRA, 2010 Regulation of Chondrogenesis by Transforming Growth Factor- β 3 and Insulin-like Growth Factor-1 from Human Mesenchymal Umbilical Cord Blood Cells. *J Rheumatol* **37**: 1519-1526.
- MAROUDAS, A., E. WACHTEL, G. GRUSHKO, E. P. KATZ and P. WEINBERG, 1991 The effect of osmotic and mechanical pressures on water partitioning in articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* **1073**: 285-294.
- MARTIN, I., R. SUETTERLIN, W. BASCHONG, M. HEBERER, G. VUNJAK-NOVAKOVIC, 2001 Enhanced cartilage tissue engineering by sequential exposure of chondrocytes to FGF-2 during 2D expansion and BMP-2 during 3D cultivation. *J Cell Biochem* **83**: 121-128.
- MARTINEK, V., P. UEBLACKER and A. B. IMHOFF, 2003 Current concepts of gene therapy and cartilage repair. *J Bone Joint Surg Br* **85**: 782-788.

- MOLLER, H. D., F. H. FU, C. NIYIBIZI, R. K. STUDER, H. J. GEORGESCU, 2000 [TGF-beta-1 gene transfer in joint cartilage cells. Stimulating effect in extracellular matrix synthesis]. *Orthopade* **29**: 75-79.
- MURAKAMI, S., M. KAN, W. L. MCKEEHAN and B. DE CROMBRUGGHE, 2000 Up-regulation of the chondrogenic Sox9 gene by fibroblast growth factors is mediated by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 1113-1118.
- NESIC, D., R. WHITESIDE, M. BRITTBURG, D. WENDT, I. MARTIN, 2006 Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease. *Adv Drug Deliv Rev* **58**: 300-322.
- O'CONNOR, W. J., T. BOTTI, S. N. KHAN AND J. M. LANE, 2000 The use of growth factors in cartilage repair. *Tissue Eng Orth Surg* **31**.
- ORTH, P., G. KAUL, M. CUCCHIARINI, D. ZURAKOWSKI, M. D. MENDER, 2011 Transplanted articular chondrocytes co-overexpressing IGF-I and FGF-2 stimulate cartilage repair in vivo. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.*
- PANDA, D. K., D. MIAO, V. LEFEBVRE, G. N. HENDY and D. GOLTZMAN, 2001 The transcription factor SOX9 regulates cell cycle and differentiation genes in chondrocytic CFK2 cells. *J Biol Chem* **276**: 41229-41236.
- SCHINDLER, O. S., 2009 Cartilage Repair Using Autologous Chondrocyte Implantation Technique. *Clinical Feature* **19**: 60-64.
- SCHMAL, H., A. T. MEHLHORN, J. ZWINGMANN, C. A. MULLER, G. B. STARK, 2005 Stimulation of chondrocytes in vitro by gene transfer with plasmids coding for epidermal growth factor (hEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF). *Cytherapy* **7**: 292-300.
- SHI, S., S. MERCER, G. J. ECKERT and S. B. TRIPPEL, 2009 Growth factor regulation of growth factors in articular chondrocytes. *J Biol Chem* **284**: 6697-6704.
- SUMARSONO, S. H., T. J. WILSON, M. J. TYMMS, D. J. VENTER, C. M. CORRICK, 1996 Down's syndrome-like skeletal abnormalities in Ets2 transgenic mice. *Nature* **379**: 534-537.
- TRIPPEL, S., M. CUCCHIARINI, H. MADRY, S. SHI and C. WANG, 2007 Gene therapy for articular cartilage repair. *Proc Inst Mech Eng H* **221**: 451-459.
- TRIPPEL, S. B., S. C. GHIVIZZANI and A. J. NIXON, 2004 Gene-based approaches for the repair of articular cartilage. *Gene Ther* **11**: 351-359.
- TROJANOWSKA, M., 2000 Ets factors and regulation of the extracellular matrix. *Oncogene* **19**: 6464-6471.

- TULLI, R., W. J. LI and R. S. TUAN, 2003 Current state of cartilage tissue engineering. *Arthritis Res Ther* **5**: 235-238.
- ULRICH-VINTHER, M., M. D. MALONEY, E. M. SCHWARZ, R. ROSIER and R. J. O'KEEFE, 2003 Articular cartilage biology. *J Am Acad Orthop Surg* **11**: 421-430.
- VACANTI, C. A., 2006 The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* **10**: 569-576.
- VEGA, J. A., 2001 Cartílago Articular: Estado Actual del Problema. *Revista de Patología de la Rodilla* **3**: 316-340.
- VEGA, J. A., O. GARCÍA, D. FERNÁNDEZ and M. E. DEL VALLE, 2002 Bioquímica y biología del cartílago articular. *Rev Ortop Traumatol* **5**: 391-400.
- ZHAO, G. Q., H. EBERSPAECHER, M. F. SELDIN and B. DE CROMBRUGGHE, 1994 The gene for the homeodomain-containing protein Cart-1 is expressed in cells that have a chondrogenic potential during embryonic development. *Mech Dev* **48**: 245-254.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.

Mario Alberto Simental Mendía

Candidato para el grado de

Maestro en Ciencias con orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería
Genética

Tesis: EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE SOX9 E IGF-I SOBRE LA PRODUCCIÓN DE ALGUNOS COMPONENTES DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN CONDROCITOS HUMANOS CULTIVADOS *IN VITRO*.

Campo de Estudio: Terapia Celular.

Biografía.

Datos personales: Nacido en la Ciudad de Victoria de Durango, Durango el 10 de Abril de 1985.

Educación Superior.

Egresado de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, obteniendo el grado de Químico Farmacéutico Biólogo en Noviembre de 2008.