

INVESTIGACIÓN BÁSICA O CLÍNICA

**AUTOINJERTO SUBCUTÁNEO DE CARTÍLAGO
NEOSINTETIZADO UTILIZANDO EL POLÍMERO ETHISORB®
EN CONEJOS**

**A. CAPITÁN GUARNIZO, E. VIVIENTE RODRÍGUEZ, J. M. OSETE ALBALADEJO, C. TORREGROSA
CARRASQUER, J. A. DÍAZ MANZANO, J. PÉREZ-MATEOS CACHÁ, C. SPREKELSEN GASSÓ**

SERVICIO DE OTORRINOLARINGOLOGÍA. HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE MURCIA.

RESUMEN

Realizamos un autotransplante subcutáneo, en animales inmunocompetentes (24 conejos), de cartilago extraído del pabellón auricular, tratado mediante técnicas de ingeniería tisular y embebidos en un polímero reabsorbible (Ethisorb®) que le sirve de sostén. Encontramos que se produce un cartilago de buena calidad, con la expresión del colágeno tipo II y sin observar fenómenos de rechazo del injerto.

PALABRAS CLAVE: Autotrasplante de cartilago. Polímero reabsorbible. Ingeniería tisular.

ABSTRACT

**SUBCUTANEOUS AUTOGRAFT OF NEO-SYNTHETIC CARTILAGE USING THE ETHISORB®
POLYMER IN RABBITS**

We perform a subcutaneous autograft, in animals with preserved immunity (24 rabbits), of cartilage taken from the auricle, treated with tissue engineering technics and embedded in a reabsorbable polymer (Ethisorb®) that acts as base. We observed a good quality cartilage with the expression of collagen type II and without graft rejection phenomenon.

KEY WORDS: Cartilage autograft. Reabsorbable polymer. Tissue engineering.

Correspondencia: Dr. Alfonso Capitán Guarnizo. Servicio de Otorrinolaringología. Hospital General Universitario de Murcia. 6ª Planta del Hospital Morales Meseguer. Av. Marqués de los Vélez, s/n. 30008 Murcia.

Fecha de recepción: 19-2-2002

Fecha de aceptación: 28-8-2002

INTRODUCCIÓN

El tejido cartilaginoso es uno de los pilares fundamentales en la especialidad de Otorrinolaringología. En caso de pérdida no se puede restituir por lo que su conservación debe ser prioritaria. Al no encontrar un tejido que pueda reemplazar al cartílago, tanto en su estructura, como en su flexibilidad, todas las investigaciones han discurrido en el intento de encontrar una manera de poder "fabricar" cartílago. Con los avances científicos en el campo de la ingeniería tisular, a partir de unas pocas células de cartílago se pueden obtener una gran cantidad de ellas, que si se siguen dividiendo podrán formar un tejido cartilaginoso que pueda sustituir al dañado o extraído.

En la especialidad de Otorrinolaringología el trasplante de cartílago ha tenido relevancia en el intento de sustituir defectos de éste para conseguir una integridad anatomofuncional completa tanto en lesiones de la laringe, nariz, traquea, pabellón y oído medio. Los problemas vienen derivados de la necesidad de obtener una cantidad buena de cartílago con unas características similares al tejido a trasplantar.

Cuando se cultivan condrocitos en monocapa nos enfrentamos a un problema de desdiferenciación de estos hacia una línea fibroblástica¹. En este proceso, es difícil mantener la morfología y la funcionalidad de los condrocitos normales, es decir las células cambian a un aspecto estrellado y modifican su capacidad de producir colágeno tipo II y proteoglicanos específicos del cartílago. Efectivamente los fibroblastos que se obtienen del cultivo de condrocitos producen colágeno tipo I y tipo III y fibronectina^{2,3}. En 1982, Benya y Schaffer⁴ consiguieron aislar condrocitos de conejo demostrándose que pueden ser cultivados de manera extensiva, en su forma desdiferenciada, para aumentar el número de células y que, cuando se realizaban subcultivos de agarosa, se reexpresaba el fenotipo condrocítico normal. Bujía y cols⁵ en 1993, demostraron que la rediferenciación de los condrocitos en medio tridimensional (suspensión y gel de agarosa) era completa, adquiriendo de nuevo una morfología y funcionalidad completas, observando además la formación de matriz pericelular en los cultivos con agarosa. En este sentido cuanto más diferenciado estaba el cultivo más disminuía la tasa de crecimiento celular.

Para poder estructurar un tejido a base de células independientes se necesita una sustancia o medio de sostén, que produzca una distribución tridimensional del cultivo celular y que a su vez sean capaces de inducir la producción de matriz. Más recientemente se ha intentado encontrar una sustan-

cia o material que, sirviendo de soporte pueda producir matriz, y que posteriormente se reabsorba o desaparezca tras el trasplante^{6,9}.

Las ventajas de usar una estructura sólida radica en la mayor resistencia mecánica dando mayor estabilidad a la forma del tejido obtenido. La relación entre el volumen y el área de contacto debe ser alta, para obtener la mayor adhesión celular homogénea. En este sentido un transportador en forma de mechas no entrelazadas es el más adecuado para realizar el proceso de ingeniería tisular. Se debe tener en cuenta dos requisitos importantes a la hora de producir un injerto adecuado: La diferenciación y producción de la matriz extracelular debe ser comenzada "in vitro" para evitar la formación de fibrocartílago y que el trasplante rellene por completo el defecto estructural¹⁰.

Diversos han sido los polímeros que se han usado en la fabricación de tejido cartilaginoso. Cada día con el avance en los procesos de investigación se añaden a este campo nuevos productos que mejoran si cabe a los anteriores. El material debe ser una sustancia inocua, reabsorbible y que ofrezca una determinada estructura de sostén para que las células de los tejidos se adhieran a él y formen un entramado lo más parecido al tejido original. La geometría que tiene el material es un parámetro importante en la adhesión celular¹¹.

En los últimos años se ha usado mechas de material con polímeros reabsorbibles no entrelazados, ya que ofrecen la mayor superficie de adherencia, sirven de sostén y no interfieren con el tejido del huésped. Además esta distribución homogénea de las fibras procura una ordenación homogénea de las células incluidas en el material¹².

Viviente¹⁰ en 1997, utiliza mechas no entrelazadas de ácido poliláctico y ácido poliglicólico en sus experiencias en criopreservación.

Aigner y cols¹³ en 1998, emplean polímeros basados en el ester benzílico del ácido hialurónico en sus trabajos para la producción de cartílago para su sustitución en defectos previamente realizados.

El primer problema con el que nos encontramos es el de la desdiferenciación de los condrocitos en el cultivo monocapa y su posterior rediferenciación, con la expresión adecuada del colágeno tipo II, en el cultivo tridimensional.

Actualmente la postura más común y la más utilizada es la de emplear polímeros como transportadores y como medio de sostén para los condrocitos a la hora de trasplantar cartílago.

Park y Ward¹⁴ en 1995, presentan injertos auriculares en conejos realizados mediante cultivo tridimensional, implantándolos subcutáneamente, obteniendo buenos resultados morfofuncionales. Muy

recientemente las líneas de investigación se encaminan a la terapia génica como marcador del estado de diferenciación de los condrocitos y para evitar la degeneración y destrucción del cartilago, incluso participa en los mecanismos de reparación del cartilago.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos usado 24 conejos de la raza Nueva Zelanda (New Zeland) del Animalario de la Universidad de Murcia, utilizando animales recién destetados, con independencia de sexo y genéticamente dispares.

Se ha utilizado el Ethisorb® (Ethicon, Nordersadt, Alemania) que se trata de un polímero de fibras no entrelazadas reabsorbibles de ácido poliláctico (90%) y ácido poliglicólico (10%), siendo el Polidioxano (1%) el factor de adhesión entre las fibras.

A 12 conejos se les extrae una muestra del pabellón auricular. La muestra de cartilago se trocea en pequeños fragmentos de entre 1-2 mm². Se le añade colagenasa tipo II (Seromed, Alemania) con una concentración de 2 mg/ml, hialuronidasa (Serva, Alemania) con una concentración de 1 mg/ml y ADN-asa con una concentración de 0,5 mg/ml, para la digestión enzimática de la matriz. El material obtenido se filtra en un tamiz para separar los trozos grandes que no se hayan digerido. Los condrocitos que hemos obtenido se introducen en unas placas de crecimiento celular con diferentes tamaños de pocillos, con capacidad diferencial. Estas placas tienen la propiedad de que los condrocitos viables se adhieran al suelo. Se usan varios pocillos, dividiendo la muestra entre ellos y rellenándolos hasta el borde de medio de cultivo (DMEM con 4.500 mg/l de glucosa), suero de ternera fetal al 20% y gentamicina al 1% (unos 5 ml). Todos los días se revisan las placas para observar el crecimiento celular y cada 2-3 días se cambia el medio de cultivo, todo siempre en cámaras de flujo laminar y en condiciones de máxima esterilidad, ya que esta fase del experimento es en la que más fácilmente puede producirse una contaminación. Cuando todo el pocillo esté lleno de células (y dado que el contacto entre los fibroblastos inhibe su crecimiento), se realiza un proceso de tripsinación, que consiste en añadir tripsina + EDTA (quelante de Calcio) a una concentración de 0,05 mg/ml (tripsina 0,05 mg/ml y EDTA a 0,2 mg/ml), para que se separen las células. La cantidad obtenida se reparte entre los pocillos de una placa de cultivo con compartimentos de mayor capacidad y superficie. Este proceso se puede re-



Figura 1. A. Esquema del diseño del experimento. Al animal de experimentación (A) le extraemos una pequeña muestra de cartilago (B). Aislamos los condrocitos (C) mediante digestión enzimática de la matriz y realizamos el cultivo celular en monocapa (D). Añadimos los condrocitos al polímero (E) y se introduce en la Cámara de Perfusión Continua. El biomaterial obtenido (Ethisorb + condrocitos) (F) se implanta en el mismo conejo (G).

petir todas las veces que sean necesarias hasta obtener el número deseado de células.

Los condrocitos en suspensión en suspensión al 1% en agarosa se colocan en el material, se le añade poli-L-Lisina como adherente celular y se recubre toda la muestra con agarosa al 2%, polimerizada previamente con hielo. Esta muestra se introduce en una Cámara de Perfusión Continua (Minucells & Minutissue, Bad Abbach, Alemania) durante aproximadamente 30 días obteniéndose una pieza rectangular de 1 x 1,5 cm (Todo este proceso se realizó en colaboración con el Dr. Joaquín Aigner de Ludwig-Maximillan- Universität de Munich, Alemania).

A todos los conejos se les implanta en el pabellón auricular contrario a la toma de la muestra, el producto obtenido. A otros 12 conejos se les implanta en el pabellón auricular contrario a la toma de la muestra, una pieza del material Ethisorb® solo sin condrocitos. Se sacrifican al mes de la intervención a un grupo de conejos, a los 3 meses a otro y los restantes a los 6 meses (Fig. 1).

Se extrae una porción amplia del pabellón auricular englobando el implante. Se cubren con Tissu-Teck® (Miles, Elkhart, EE.UU.) y se ultracongelan con nitrógeno líquido y estudiándose posteriormente con las técnicas de Hematoxilina-Eosina, Azul Alcian, Tricrómico de Massón e Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-colágeno tipo II.

Las fotografías realizadas en las tinciones Azul Alcian y Tricrómico de Massón se analizan mediante un software informático específico: Adobe Photoshop 5,0®, con el cual se analizan las cantidades relativas de color que se han teñido, obteniendo

unos resultados cuantitativos de crecimiento y vitalidad del implante (Método de O'Driscoll)¹⁵.

Estos datos cuantitativos se estudian mediante un análisis estadístico utilizando una estadística descriptiva de las variables cuantitativas calculando los parámetros característicos: media, error de la media, desviación típica y rango. La comparación de grupos se ha realizado mediante un análisis de la varianza de dos vías complementado con contrastes de igualdad de pares de medias con el test de la t-Student y la corrección de Bonferroni, que nos determinará la validez de la demostración de nuestras hipótesis de trabajo.

RESULTADOS

A. ANÁLISIS MACROSCÓPICO

El aspecto morfológico era similar en todas ellas, teniendo la apariencia de una sobre elevación sobre la piel interna del pabellón. En cuanto a su textura, se apreciaron diferencias entre los implantes con condrocitos y los que no presentaban condrocitos. Los que sí tenían células presentaban una elasticidad aumentada sobre los que no incluían células.

B. ANÁLISIS MICROSCÓPICO

Con la tinción de Hematoxilina-Eosina encontramos un aumento importante de la celularidad a lo largo del tiempo en los implantes del polímero con condrocitos, en contraposición con el aumento mo-



Figura 2. Tinción con la técnica de Inmunohistoquímica. Se aprecia la importante coloración de la muestra de Ethisorb con condrocitos, que demuestra la existencia de colágeno tipo II, en relación con la pobre captación de tinción en la muestra de Ethisorb sin condrocitos.

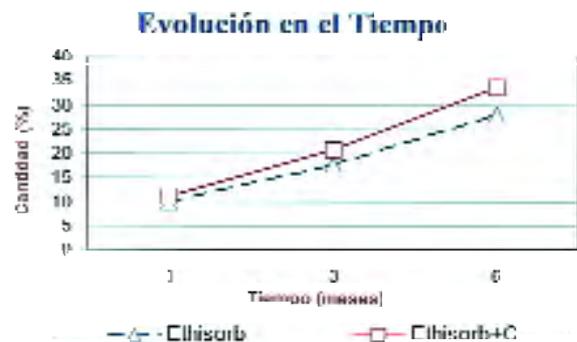


Figura 3. Gráfica de evolución en el tiempo del crecimiento de la matriz intercelular. Es estadísticamente significativo que existe un crecimiento de la producción de matriz a lo largo del tiempo y que es mayor en las muestras de Ethisorb con condrocitos.

derado de la celularidad en el caso del material solo. En el caso de la producción de mucopolisacáridos ácidos, detectado con la tinción de Azul Alcian, encontramos la existencia de un aumento muy significativo de la producción de matriz en el caso del polímero con cultivo celular. Con la tinción de tricómico de Massón encontramos un aumento significativo de la tinción en ambas preparaciones, en los dos procesos se produce una fibrosis colágena importante. Con la técnica de Inmunohistoquímica se aprecia, en el caso del implante con cultivo celular o con condrocitos, una intensa tinción que traduce una existencia de colágeno tipo II, en contraposición con el polímero solo que apenas se tiñe (Fig. 2).

C. ESTUDIO ESTADÍSTICO

Es estadísticamente significativo ($p = 0,0001$) que en el transcurso del tiempo desde los implantes, existe un crecimiento de los mucopolisacáridos ácidos, es decir, de la producción de matriz. Este crecimiento es mayor en los injertos de Ethisorb® que se asocian al cultivo de condrocitos, que en el mismo polímero solo (Fig. 3).

En cuanto a la producción de fibras, no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas. Esto se debe a que comparamos cuantitativamente la cantidad total de fibras colágenas, no específicamente la producción de colágeno tipo II.

DISCUSIÓN

La capacidad del implante de tener un comportamiento similar al cartílago nativo es una premisa pretendida en este trabajo. En este sentido Aigner y

cols¹³, Wambach y cols¹⁶ y en general la mayoría de los autores expresan la necesidad de obtener tejido cartilaginoso sin recurrir a utilizar el de otras partes del organismo, con la consiguiente limitación cuantitativa.

Las técnicas modernas de ingeniería tisular nos permiten disponer de cartílago sin importar la cantidad necesaria. Miura y O'Driscoll¹⁷ obtienen condrocitos del periostio. Los resultados más favorables del autotrasplante con el polímero Ethisorb® con condrocitos nos indican que en el futuro el uso de esas fibras reabsorbibles es la opción más adecuada. Además con los avances de la industria farmacéutica se obtendrán materiales bioreabsorbibles más modernos que mejoraran estos resultados.

Katsube y cols¹⁸ y Park y cols¹⁹ experimentan con nuevos polímeros, indicando sus buenos resultados pero observando que con los avances de la técnica se podrían mejorar.

La necesidad de evitar el sistema inmunológico nos lleva a utilizar células cultivadas del propio organismo que, al dividirse mediante técnicas de ingeniería tisular, podrían alcanzar el número deseado para sustituir cualquier cantidad de cartílago dañado. En este punto si no se produce una matriz extracelular adecuada, que impida el paso de las moléculas responsables de la inmunidad, los condrocitos y el material podrían ser destruidos.

Son muy importantes los trabajos de Bujía y Pitzke^{20,21} donde describen la presencia de moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) en la aparición de los fenómenos de rechazo.

Nada más lejos de la realidad, el implante del polímero Ethisorb® con condrocitos en cultivo obtiene buenos resultados en cuanto a la vitalidad y la capacidad de reexpresar el fenotipo condrogénico. En cuanto a los injertos de material solo, sin condrocitos, se observa una baja capacidad formadora de cartílago en los implantes subcutáneos, ya que no presentan células que puedan crecer y formar un tejido cartilaginoso. Aunque en algunos pocos casos aparecen fenómenos de condrogénesis (formándose formas juveniles de cartílago), en la mayoría se produce su reabsorción y desaparición, dejando un resto de fibrosis.

Cuando el polímero va acompañado de condrocitos, la capacidad de formar un tejido fibroso no se refleja. En este caso pierden esa característica y se comportan como materiales inertes. Rudert y cols²² establecen la total reabsorción del material cuando éste va acompañado de células, sin encontrar restos fibrosos en la zona del implante. Ésto sería la consecuencia de la formación por parte del implante de un cartílago de buena calidad, sustituyendo

poco a poco al polímero y rellenando todo el espacio ocupado por éste.

En las zonas próximas al pericondrio, en algún caso durante la intervención quirúrgica, es muy difícil no rozar la capa externa del pericondrio. En este punto (encontrado sólo en una de las preparaciones) hemos encontrado focos de condrogénesis. Miura y cols¹⁷ observan este fenómeno incluso cuando el implante se coloca o roza el periostio en autoinjertos osteocondrales. La importancia del pericondrio por su disposición condrogénica es un hecho demostrado.

Los procesos de desdiferenciación celular y posterior rediferenciación no afectan en nuestro experimento a la calidad del cartílago implantado. La capacidad de reexpresar el fenotipo de condrocito se restituye totalmente tras la inclusión de los condrocitos en el material y la construcción de la pieza a implantar.

Este punto está muy contrastado por la mayoría de los autores en sus experiencias tanto "in vivo" como "in vitro".

La viabilidad de los condrocitos implantados es muy alta, encontrando pocos procesos de degeneración de las células o de vacuolización, lo que se correspondería con un injerto avital y al posible estrés de las células del tejido en la intervención. A lo largo del tiempo se observa un crecimiento del número de condrocitos, ya que, aunque cuando se implanta el biomaterial ya se ha formado cartílago, continúa creciendo de manera progresiva hasta rellenar casi todo el espacio diseccionado, guiado por los restos de fibras no reabsorbidas todavía del polímero.

Aigner y cols¹³, Wambach y cols¹⁶, Rahfoth y cols²³ y Katsube y cols¹⁸ obtienen altas tasas de vitalidad celular en sus implantes, sin encontrar procesos de vacuolización ni degeneración del injerto.

Los procesos de creación de la matriz extracelular y la producción de tejido cartilaginoso comienzan a las pocas horas del cultivo tridimensional, deduciendo que cuando hemos implantado la pieza ya existe tejido cartilaginoso. "In vivo" continúa produciéndose matriz hasta que se rellena toda la zona del autotrasplante.

Con las nuevas investigaciones en el campo de la ingeniería genética²⁴⁻²⁶ además de evitar la degeneración del tejido cartilaginoso, se pretende ayudar a los implantes en el crecimiento adecuado, diferenciación más rápida y evitar fenómenos poco frecuentes de reabsorción. En los casos de pérdida accidental o exéresis quirúrgica, el autotrasplante de cartílago neosintetizado con polímeros reabsorbibles sería la única alternativa eficaz.

CONCLUSIONES

El cartílago que se produce en los implantes con condrocitos es un tejido similar, en todos los aspectos morfofuncionales, al normal encontrado en el resto del organismo.

Los polímeros sin células producen focos de condrogénesis pero con un cartílago de baja calidad y con poca síntesis tanto de mucopolisacáridos ácidos como de colágeno tipo II (fenómenos de fibrosis). Los injertos de polímeros con condrocitos

presentan previamente al implante una estructura similar al cartílago al visualizarlos por microscopía electrónica, diferenciándose sólo en la presencia del material. La viabilidad de las piezas con condrocitos trasplantadas es muy alta, presentando una evolución en el tiempo progresiva hacia la formación de cartílago maduro. No se han producido fenómenos de rechazo agudo ni subagudo en todos los animales de la investigación. En pocos casos se han producido reacciones a cuerpo extraño en la periferia del implante.

REFERENCIAS

- 1.- Aulhouse AL, Beck M, Griffey E, Sanford J, Arden K, Machado MA, Horton WA. Expression of the human chondrocyte in vitro. *In vitro Cell and Dev Biol* 1989; 25 (7): 659-667.
- 2.- Deshmukh K, Kline WG. Characterization of collagen and its precursors synthesized by rabbit-articular-cartilage cells in various culture systems. *Eur J Biochem* 1976; 69: 117-123.
- 3.- Sokoloff L, Malemud CD, Srivastava VML, Morgan WD. In vitro culture of articular chondrocytes. *Fed Proc* 1973; 32: 1499-1502.
- 4.- Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30: 215-224.
- 5.- Bujia J, Sittinger M, Pitzke P, Wilmes E, Hammer C. Synthesis of human cartilage using organotypic cell culture. *ORL* 1993; 55: 347-351.
- 6.- Vacanti CA, Langer R, Cchloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88: 753-759.
- 7.- Cooper ML, Hansbrough JF, Spielvogel RL, Cohen R, Bartel RL, Naughton G. In vivo optimization of a living dermal substitute employing cultured human fibroblasts on a biodegradable polyglycolic acid or polyglactin mesh. *Materials* 1991; 12: 243-248.
- 8.- Von Schroeder HP, Kwan M, Amiel D, Coutts RD. The use of poly(lactic acid) matrix and periosteal grafts for reconstruction of rabbit knee articular defects. *J Biomed Mater Res* 1991; 25: 329-339.
- 9.- Wald HL, Sarakinos G, Lyman MD, Mikos AG, Vacanti JP, Langer R. Cell seeding in porous transplantation devices. *Materials* 1993; 14: 270-278.
- 10.- Viviente E. Criopreservación de cartílago. Tesis doctoral 1978.
- 11.- Saldanha V, Grande DA. Extracellular matrix protein gene expression of bovine chondrocytes cultures on reabsorbable scaffold. *Material* 2000; 21: 2427-2431.
- 12.- Sittinger M, Bujia J, Minuth WW, Hammer C, Burmester GR. Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers in perfusion culture. *Materials* 1994; 15: 451-456.
- 13.- Aigner J, Tegler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured material based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater Res* 1998; 42: 172-171.
- 14.- Park SS, Ward MJ. Tissue-engineered cartilage for implantation and grafting. *Facial Plast Surg* 1995; 110: 278-283.
- 15.- O'Driscoll SW, Marx RG, Fitz-Simmons JS, Beaton DE. Method for automated cartilage histomorphometry. *Tissue Eng* 1999; 5(1): 13-23.
- 16.- Wambach BA, Cheung H, Josephson GD. Cartilage tissue engineering using thyroid chondrocytes on a type I collagen matrix. *Laryngoscope* 2000; 110 (12): 2008-2011.
- 17.- Miura Y, O'Driscoll SH. Culturing periosteum in vitro: the influence of the different sizes of explants. *Cell Transplantation* 1998; 7 (5): 453-457.
- 18.- Katsube K, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Matsusaki M, Tobita M, Iwasa J. Repair of articular cartilage defects with cultured chondrocytes in atelocollagen gel. Comparison with cultured chondrocytes in suspension. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000; 120: 121-127.
- 19.- Park DJ, Bong JPB, Park SY, Hong KS. Cartilage generation using alginate-encapsulated autogenous chondrocytes in rabbits. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109: 1157-1161.
- 20.- Bujia J, Behrends U, Rotter N, et al. Expression of ICAM-1 on intact cartilage and isolated chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996; 32: 116-122.
- 21.- Pitzke P, Bujia J, Wilmes E, Hammer C. Expression of ICAM-1 on isolated human nasal, auricular and costal chondrocytes. *Acta Otolaryngol (Stoch)* 1994; 114: 81-86.
- 22.- Rudert M, Hirschmann F, Schulze M, WIRTH CJ. Bioartificial Cartilage. *Cells Tissues Organs* 2000; 167: 95-105.
- 23.- Rahfoth B, Weisser J, Sternkopf F, Aigner T, Van der Mark K, Bräuer R. Transplantation of allograft chondrocytes embedded in agarose gel into cartilage defects in rabbits. *Osteoarthritis & Cartilage* 1998; 6: 50-65.
- 24.- Kameda T, Koike C, Saitoh K, Kuroiwa A, Iba H. Analysis of cartilage maturation using micromass culture of primary chondrocytes. *Develop Growth Differ* 2000; 42: 229-236.
- 25.- Crombrugge B, Lefebvre V, Behringer RR, Bi W, Murakami S, Huang W. Transcriptional mechanism of chondrocyte differentiation. *Matrix Biology* 2000; 1: 389-394.
- 26.- Evans CH, Chivizzani SC, Smith P, Shuler FD, Mi Z, Robbins PD. Using gene therapy to protect and restorage cartilage. *Clin. Orthopaedics & Related Res* 2000; 379s: 214-219.