

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

***DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA***



**INGENIERIA TISULAR PARA EL  
TRATAMIENTO DE LAS LESIONES  
OSTEOCONDRALES**

***David Pescador Hernández***



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**D. JUAN FRANCISCO BLANCO BLANCO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado " Ingeniería tisular para el tratamiento de las lesiones osteocondrales" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. David Pescador Hernández en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al **Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.**

Salamanca, a 23 de Diciembre de 2011.

Fdo. Dr. D. Juan Francisco Blanco Blanco.



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**D. FERMÍN MARTÍN SANCHEZ-GUIJO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA  
POR LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR ASOCIADO DEL  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado " Ingeniería tisular para el tratamiento de las lesiones osteocondrales" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. David Pescador Hernández en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al **Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.**

Salamanca, a 23 de Diciembre de 2011.

Fdo. Dr. D. Fermín Martín Sánchez-Guijo



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA**

**D. JESUS GARCÍA BRIÑÓN, DOCTOR EN BIOLOGÍA POR LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y PROFESOR TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA UNIVERSIDAD DE  
SALAMANCA,**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo titulado " Ingeniería tisular para el tratamiento de las lesiones osteocondrales" ha sido realizado bajo mi dirección por el Ldo. D. David Pescador Hernández en el Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca, y reúne a mi juicio las condiciones de originalidad requeridas para optar al **Grado de doctor de la Universidad de Salamanca.**

Salamanca, a 23 de Diciembre de 2011.

Fdo. Dr. D. Jesús García Briñón

**Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto GRS/516/A/10 otorgado por la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este trabajo:

Al Dr. Juan Blanco, mi maestro, por haberme introducido en el mundo de la investigación y haberme animado en la realización del presente trabajo. También agradecerle las actitudes y conocimientos, tanto científicos como humanos, aportados en mi desarrollo como traumatólogo.

Al laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca, especialmente a las Dras. Sandra Muntión y Soraya Carrancio y al Dr. Fermín M. Sánchez-Guijo, co-director de esta tesis, por aportar sus esfuerzos en el campo de la biología celular de este trabajo doctoral. A la colaboración del Grupo Bioforge de la Universidad de Valladolid (dirigido por el Profesor Rodríguez Cabello) que nos ha permitido disponer del biogel empleado en los experimentos.

Al Dr. Jesús García Briñón, por la realización de tan precisos análisis histológicos, sin los cuales, este estudio no tendría valor.

A la Dra. Cristina Hernández, mi radióloga, y a su técnico de rayos, por la ayuda tan desinteresada y esencial en el análisis radiológico. Gracias por tu tiempo, para poder realizar la resonancia y valorar tan precisamente las imágenes.

A Lourdes, por aguantar tantos días mi dedicación a este proyecto y tu ayuda diaria, para poder llevarlo a cabo.

A mi hermano, mi madre y mi padre por confiar siempre en mi y ayudarme cada día.

Especialmente quiero agradeceréselo a mi padre, por haberme ayudado durante toda mi vida para llegar a ser médico, haber colaborado en todos mis proyectos formativos y gracias sobre todo, porque sé que sin ti no sería quien soy en todos los aspectos de mi vida.

A mi familia



## **ABREVIATURAS**

**MEC:** Matriz extracelular.

**COL:** Dominio colagénico.

**NC:** Dominio no colagénico.

**FACIT:** Fibre associated collagens with interrupted helix.

**GAG:** Glucosamino glucanos.

**CAD:** Condroadherina.

**COMP:** Proteína oligomérica de la matriz del cartílago.

**ATP:** Adenosintrifosfato.

**IL:** Interleucina.

**NO:** óxido nítrico.

**IGF:** Factor de crecimiento insulinoide.

**PGE:** Prostaglandina E.

**TNF:** Factor de necrosis tumoral.

**MMP:** Metaloproteinasas.

**TIMP:** Inhibidor tisular de metaloproteasas.

**PAI1:** Activador inhibidor 1 del plasminógeno.

**TGF:** Factor de crecimiento transformados.

**OCD:** Osteocondritis disecante.

**PDGF:** Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.

**BMP:** Proteína ósea morfogenética.

**SGRM:** Scaffold guided regenerative medicine.

**RMN:** Resonancia magnética nuclear.

**K:** Kirschner.

**MSC:** Mesenchymal stem cell.

**ACI:** Implante de condrocitos autólogos.

**ICRS:** Clasificación de Sociedad Internacional de Investigación del cartílago.

**MACI:** Implante de condrocitos autólogos en una matriz.

**PGA:** Ácido poliglicólico.

**PLGA:** Ácido poliláctico co-glicólico.

**HA:** Ácido hialurónico.

**PEa:** Óxido de polietileno.

**MPEG:** Metoxipoly-etileno glicol.

**PLA:** Ácido poliláctico.

**CFU-FS:** Colony forming units fibroblastic.

**FACS:** Células activas por fluorescencia.

**MO:** médulas ósea.

**MAPC:** Multipotent Adult Progenitor Cells.

**MIAMI:** “human marrow isolated adult multilineage inducible cells”.

**VSEL:** very small embryonic-like stem cells.

**CPH:** Célula progenitora hematopoyética.

**CSM:** Célula *stem* mesenquimal.

**CMN:** Células mononucleadas.

**SP:** Sangre periférica.

**ISCT:** Sociedad Internacional de Terapia Celular “Internacional Society for Cellular Therapy”.

**BCIT:** 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato.

**NBT:** 4-nitroazul de tetrazolio.

**BM:** Biomateriales.

**SIS:** Matriz derivada de la submucosa intestinal porcina.

**BSM:** Matriz derivada de la submucosa de la vejiga.

**CEIC:** Comité ética de investigación clínica.

**FITC:** Ácido de fluoresceína.

**PE:** Ficoeritina.

**PCy5:** Ficoeritina cianica 5.

**APC:** Aloficocianina.

**rELP:** Elastina recombinante.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**PCL:** Ácido policaprolactone.

**PEG:** Copolímero de polipropileno fumarato de etilenglicol.

## ÍNDICES

# ÍNDICE

1. Introducción: .....	2
1.1. El cartílago articular. ....	3
1.1.1. Aspecto macroscópico.....	4
1.1.2. Aspecto microscópico.....	4
1.1.3. Propiedades del cartílago y capacidad regenerativa. ....	12
1.1.4. Lesiones del cartílago articular. ....	16
1.2. Abordajes terapéuticos de la lesión condral.....	21
1.2.1. Técnicas de reparación .....	22
1.2.2. Técnicas de sustitución .....	23
1.2.3. Técnica de regeneración: terapia celular.....	26
1.3. Terapia celular: empleo de las células “stem” en ingeniería tisular....	32
1.3.1. Concepto y antecedentes .....	32
1.3.2. Las MSCs y el nicho hematopoyético.....	36
1.3.3. Otras fuentes de obtención de MSCs .....	38
1.4. Biomateriales en la terapia celular. ....	39
1.4.1. Principios básicos de los BM .....	39
1.4.2. Propiedades de los BM.....	40
1.4.3. Tecnología en la fabricación de los BM .....	42
1.4.4. Biomateriales para la terapia celular.....	43
2. Hipótesis .....	46
3. Objetivos .....	46
4. Material y métodos:.....	48
4.1. Obtención de las células mesenquimales. ....	48
4.1.1. Pacientes.....	48
4.1.2. Proceso del aspirado de cresta ilíaca .....	48

4.1.3.	Separación de las células mononucleadas.....	48
4.1.4.	Aislamiento y expansión .....	49
4.1.5.	Caracterización inmunofenotípica.....	50
4.1.6.	Diferenciación multilineal de las MSC.....	51
4.2.	Obtención, preparación y diseño del hidrogel proteico .....	53
4.2.1.	Diseño de las arquitecturas moleculares de los rELPs que formarán el biogel: .....	53
4.2.2.	Construcción del gen que codifica cada uno de los ELPs previamente diseñado: .....	54
4.2.3.	Expresión de los ELPs:.....	54
4.2.4.	Purificación de los ELPs: .....	54
4.2.5.	Caracterización de los ELPs:.....	55
4.3.	Modelo animal.....	57
4.4.	Análisis radiológico .....	60
4.5.	Análisis histológico.....	61
4.5.1.	Análisis macroscópico .....	61
4.5.2.	Análisis microscópico .....	61
5	Resultados.....	79
5.1	Análisis de la diferenciación y caracterización celular.....	79
5.1.1.	Aislamiento y expansión in vitro.....	79
5.1.2.	Estudio inmunofenotípico.....	79
5.1.3.	Diferenciación celular. ....	79
5.2	Análisis radiológico. ....	79
5.2.1	Análisis radiológico con RMN. ....	79
5.2.2.	Análisis radiológico con TAC multicorte.....	82
5.3.	Análisis histológico.....	84
5.3.1.	Análisis histológico macroscópico. ....	84
5.3.2.	Análisis histológico microscópico.....	85

6. Discusión .....	103
7. Conclusiones .....	118
8. Bibliografía .....	120

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. BM usados en la terapia celular .....	41
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los BM.....	42
Tabla 3. BM para la terapia celular.....	43
Tabla 4. Anticuerpos monoclonales para el estudio del inmunofenotipo .....	51
Tabla 5. Escala modificada de Wakitani.....	77
Tabla 6. Resumen de los datos de la escala de valoración histológica.....	98
Tabla 7. Resultados del análisis mediante Kruskal-Wallis.....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Separación de las células mononucleadas .....	49
Figura 2. Aislamiento y expansión.....	49
Figura 3. Esquema de la composición del hidrogel .....	53
Figura 4. Esquema de características y uso del hidrogel .....	56
Figura 5. Modelo animal .....	59
Figura 6. Análisis de RMN del grupo intervenido con hidrogel sin MSCs.....	80
Figura 7. Análisis de RMN del grupo intervenido con hidrogel con MSCs.....	81
Figura 8. Análisis de TAC tanto del grupo control como el de casos. ....	83
Figura 9. Reconstrucción 3D de cóndilo femoral totalmente regenerado .....	83
Figura 10. Muestra de dos conejos tratados con MSC y con la control.....	85
Figura 11. Tinciones del cartílago articular normal .....	88



Figura 12. Tinción de Von Kossa. ....	91
Figura 13. Tinción de Azul de Toluidina .....	92
Figura 14. Tinción de Azul- Alcían + PAS+ Hematoxilina.....	93
Figura 15. Tinción Orceína Azul Alcían y Tinción de Movat .....	93
Figura 16. Tinciones del grupo control .....	96
Figura 17. A. Inmunofluorescencia. Rodillas derechas .....	100
Figura 17. B. Inmunofluorescencia. Rodillas izquierdas.....	101

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. Introducción:

El cartílago hialino es una estructura anatómica avascular, lisa, brillante y nacarada, que recubre el hueso subcondral de las articulaciones. Presenta unas propiedades fisicoquímicas muy específicas para poder soportar y distribuir adecuadamente las fuerzas, permitiendo la movilidad articular con un bajo índice de fricción y desgaste en los movimientos de cada articulación.

El cartílago articular es una estructura con una capacidad regenerativa escasa, como tejido especializado, debido a su nutrición avascular y a su estructura celular e intersticial diseñada para soportar las exigencias biomecánicas de las articulaciones.

El cartílago está expuesto a múltiples traumatismos y por diversos mecanismos lesionales pueden originar diversas entidades patológicas como las lesiones osteocondrales, osteocondritis disecantes, osteoartrosis...

Los defectos osteocondrales son lesiones relativamente frecuentes en nuestro medio, pudiéndose producir en el contexto de lesiones deportivas, ocasionándose en población joven y laboralmente activa. Alteraciones de la estructura articular conducen al desencadenamiento de una artrosis secundaria, con la implicación económica y social que esto supone.

Múltiples esfuerzos se llevan realizando para encontrar un tratamiento eficaz, que evite la afectación generalizada de la articulación de las lesiones osteocondrales.

Debido a esta débil capacidad regenerativa y reparativa, las lesiones desencadenan alteraciones condrales. Por ello los tratamientos se han dirigido a la estimulación de la reparación del propio cartílago, a la sustitución de los defectos, mediante el empleo de injertos condrales y en los últimos tiempos, a la restauración por ingeniería tisular.

Desde la utilización de las células pluripotenciales (que desde este momento, denominaré con el término anglosajón stem cells), en el campo de la ingeniería tisular, se ha abierto un gran abanico de posibilidades en el tratamiento de las lesiones osteocondrales. Bien es conocida, la gran capacidad plástica y reparadora de estas células, pudiendo al menos en teoría, conseguir la regeneración del tejido lesionado, evitando así los inconvenientes que las técnicas clásicas presentan.

Las dificultades encontradas en el tratamiento de las lesiones osteocondrales por medio de la ingeniería tisular, radica en poder reconstruir una matriz

extracelular adecuada, tanto en su composición, como en su compleja estructura tridimensional, que aporta las propiedades al cartílago hialino.

Para solventar esto, una de las claves es la de encontrar carriers adecuados para poder transportar y estimular a las stem cells, así como proporcionar un microambiente favorecedor para la regeneración del tejido condral lesionado.

Para entender el objetivo de este trabajo doctoral es necesario conocer la estructura y propiedades del cartílago hialino, así como los tratamientos actuales de su lesión y la situación actual de la ingeniería tisular en el ámbito de la terapia celular.

### ***1.1. El cartílago articular.***

El cartílago es un tejido conectivo viscoelástico, aneural, alinfático y avascular que funciona hidrodinámicamente para soportar y distribuir cargas y proporcionar un movimiento casi libre de fricción en las articulaciones.

Al diseccionar una articulación sana se puede observar el cartílago articular liso y brillante, lo que es sinónimo de hialino, palabra que deriva del griego y significa “como un espejo”, La coloración del cartílago es de un blanco azulado en animales que se encuentran en el estadio de inmadurez, blanco denso en la edad adulta y ligeramente amarillo en la vejez.

Este tejido se caracteriza por estar compuesto de una población celular homogénea, los condrocitos, que son células caracterizadas por producir macromoléculas estructurales que le confieren sus características biomecánicas.

El cartílago hialino no transmite presiones, absorbe impactos y distribuye las cargas y las fuerzas, resistiendo el desgaste físico hasta límites sorprendentes. Estas propiedades mecánicas dependen de la matriz extracelular producida por los condrocitos, así como el contenido de agua.

Probablemente, el componente tisular más importante del cartílago sea el agua, que constituye entre un 60-80% del tejido, de tal forma que una proporción elevada de fluido intersticial se mueve en este tejido como respuesta a gradientes de presión. El 20-40% restante del cartílago está compuesto por células, colágeno, proteoglicanos, glucoproteínas y lípidos.

En cuanto a la fisiopatología de este tejido, sabemos que, debido a sus características únicas, las lesiones profundas generadas como consecuencia

de daños traumáticos o trastornos degenerativos, tienen escasa o nula capacidad de autocuración.

Las lesiones que afectan a todo el espesor del cartílago pueden dar lugar a la aparición de síntomas clínicos articulares, como dolor, hinchazón, alteraciones mecánicas, impotencia funcional, y finalmente, artrosis degenerativa, que en ausencia de un tratamiento adecuado, conduce a la destrucción de la articulación.

Para comprender los procesos de formación y regeneración de este tejido es imprescindible ahondar en el conocimiento de la composición y función del cartílago.

### **1.1.1. Aspecto macroscópico**

El cartílago articular normal del adulto muestra una superficie blanca, algo translúcida (de donde proviene el nombre de hialino), lisa y brillante. La aplicación suave de una pinza sobre su superficie muestra cierta flexibilidad y capacidad de deformación bajo presión moderada. El grosor varía según la articulación. El cartílago más grueso es el de la articulación femorrotuliana con 6-7 mm y el femorrotibial de unos 5-6 mm.<sup>1</sup>

### **1.1.2. Aspecto microscópico**

A diferencia del cartílago de crecimiento, donde el condrocito sigue un proceso de maduración celular activo y complejo que conduce por último a la osificación endocondral, el cartílago articular se distingue por una maduración celular extremadamente lenta. Sin duda alguna, este hecho es secundario a la interrupción, a una edad no precisada aún, de la incorporación de precondrocitos jóvenes, cuya consecuencia es una detención casi completa de la maduración celular para conservar intactas la altura y la presencia del cartílago articular. De igual modo, el proceso de apoptosis, o etapa final de maduración de los condrocitos en el cartílago de crecimiento, se halla en gran parte en el cartílago articular normal<sup>2-7</sup>. Es la razón por la que no se describe el cartílago articular como capas superpuestas, que en el cartílago de crecimiento corresponden a etapas sucesivas de diferenciación y maduración. Así pues, el cartílago articular se describe como capas que difieren entre sí según criterios bioquímicos (cantidad de proteoglicanos) y anatómicos (*disposición de las fibras de colágeno*: con luz polarizada es posible observar la birrefringencia de la red de colágeno, que varía desde la superficie hasta la profundidad en cantidad de células.<sup>2-7</sup>

En la superficie del cartílago hay una *zona acelular*, denominada *tanina slenda*, que reviste la capa superficial. Es una zona importante, porque en ella se produce el enganche de macromoléculas del líquido sinovial y, de ese modo, se convierte en una capa protectora del cartílago (en especial contra los

radicales libres). Así, el ácido hialurónico, algunos fosfolípidos y la lubricina revisten dicha superficie.<sup>2-7</sup>

En el cartílago se distinguen cuatro capas:

- *Una capa superficial o zona tangencial* de condrocitos pequeños y planos (aspecto fibroblástico), que podrían corresponder a precondrocitos. Las fibras colágenas se disponen en sentido paralelo a la superficie y la zona contiene fibronectina en abundancia, pero los proteoglicanos son relativamente escasos. A raíz de la disposición de la red de fibras de colágeno, es un área que resiste a las fuerzas de tensión.<sup>8,9</sup>
- *Una capa intermedia o transicional* (5% de la altura total) de condrocitos gruesos y esféricos; la red de fibras colágenas no sigue una dirección concreta.<sup>8,9</sup>
- *Una capa profunda o radial* (92% de la altura total) que se puede dividir en varias partes, atendiendo a la organización de los condrocitos. En la parte más superior, las células aparecen aisladas, mientras que en la zona media e inferior forman grupos de tres o cuatro células con estructura columnar. La unidad funcional no son condrocitos, sino lo que se denomina “condrón”. Se sabe que los condrocitos contenidos en el cartílago están rodeados de una pequeña porción de matriz especializada y diferente en esencia de aquella que forma el resto de la matriz que se interpone entre las células. El condrón se considera como un condrocito, su “espacio lacunar” y un anillo perilacunar, sugiriendo que esta estructura representa la unidad funcional y metabólica primordial responsable de la homeostasis del cartílago. La matriz pericelular que envuelve el condrón contiene condroitín sulfato y una importante proporción del contenido total de ácido hialurónico de la matriz cartilaginosa, así como elevadas cantidades de proteoglicanos y un gran número de finas fibras de colágenos y otros materiales filamentosos que actúan como envoltura. Esta última descansa sobre la llamada *capa calcificada o transicional* (5-10% de la altura total) que se adosa a la lámina ósea subcondral. Es una zona pobre en proteoglicanos y las fibras de colágeno se disponen en forma radiada, aunque no guardan continuidad con las fibras colágenas del hueso subyacente. La capa calcificada del cartílago está separada de la zona profunda por una línea de demarcación basófila y ondulada (tide-mark para los anglosajones), que forma una barrera que impide el paso de los vasos del hueso subcondral, pero no de algunas sustancias. Esta zona se caracteriza por la presencia de condrocitos hipertróficos, que pueden contribuir a la formación de la placa ósea subcondral mediante el proceso

denominado calcificación endocondral. La parte subyacente a esta última zona del cartílago articular corresponde ya a tejido óseo organizado, sostenido por el tejido óseo trabecular.<sup>8,9</sup>

### **1.1.2.1. Células: condrocitos**

#### **Descripción**

El cartílago hialino está formado por un solo tipo de células, los condrocitos, encerradas en una matriz “extracelular”.

En microscopia electrónica, el condrocito es esférico y ovoide y mide 30-40  $\mu\text{m}$  de diámetro. Dentro de la matriz cartilaginosa no hay contacto intercelular directo. Los condrocitos ocupan el 10% del volumen total del cartílago (1-10% del volumen seco del cartílago), pero la densidad celular varía según el tipo de articulación, la zona en que se encuentran y la edad. El contenido celular es mayor en la capa superficial, y el número de células disminuye con la edad.

Los condrocitos tienen un núcleo central desarrollado, mitocondrias y vacuolas lisosómicas. Estas células trabajan principalmente en anaerobiosis y forman uno de los pocos tejidos que funcionan en hipoxia: hay un gradiente hipóxico que varía del 10% de concentración de oxígeno en la superficie al 1% en la profundidad. Sin embargo, se ha observado que los condrocitos de las capas más superficiales podrían funcionar, en parte, en aerobiosis por difusión de los gases ( $\text{O}_2$ ) presentes en el líquido sinovial. Los condrocitos no migran y se multiplican poco o nada en el cartílago normal.<sup>2, 10, 11</sup>

#### **Nutrición celular**

Con motivo de la índole avascular del cartílago, los nutrientes básicos provienen casi exclusivamente del líquido sinovial. En condiciones normales, éste contiene menos de 300 elementos por  $\text{mm}^3$  y corresponde a un filtrado plasmático selectivo al que le faltan las proteínas de alto peso molecular. El líquido sinovial actúa como lubricante articular, amortigua los golpes y evita el contacto de los cartílagos articulares entre sí. El poder lubricante del líquido sinovial obedece a la abundancia de ácido hialurónico de alto peso molecular (de ahí su viscosidad) y facilita la evacuación de los residuos procedentes del cartílago articular.

La entrada de las moléculas a los condrocitos a través del espacio extracelular depende de la forma esférica y de la carga. La glucosa es el principal sustrato energético del condrocito. Se metaboliza básicamente por la vía de la glucólisis anaeróbica y se transforma en glucosamina para la síntesis de los proteoglicanos.<sup>12, 13</sup>

### **Matriz extracelular (MEC)**

La matriz extracelular está compuesta por agua (65-80% del peso húmedo) y macromoléculas (proteínas y glucosaminoglucanos: 20-35% del peso húmedo del cartílago). Contiene abundantes cationes que equilibran las cargas negativas de los proteoglicanos.<sup>14</sup>

La matriz extracelular más alejada de la célula se denomina “zona interterritorial” que asegura la integridad del tejido y le confiere sus propiedades biomecánicas.

### **Espacio pericelular**

En la periferia inmediata de la célula hay acumulación de moléculas, adheridas en cierto modo a aquella. Se distinguen colágenos de tipo VI, agregados de proteoglicanos destinados a pasar a la matriz extracelular, ácido hialurónico para la adherencia de los proteoglicanos neosintetizados, y moléculas no colágenas como ancorita y fibronectina. Cada grupo de proteínas se fija a diferentes receptores transmembranosos. Los principales receptores son integrinas que actúan como correas de transmisión entre las proteínas submembranas ligadas al citoesqueleto y las moléculas del espacio pericelular (18 integrinas). Cada integrina está compuesta por dos subunidades: una  $\alpha$  y otra  $\beta$ . Así, los colágenos de tipo II se adhieren a las integrinas de la membrana celular de tipo  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  y  $\beta 1$ . Un modelo de esa naturaleza se aplica también a los receptores de los condroitín sulfatos y estos a los receptores CD44 y al ácido hialurónico. El condrocito ajusta su actividad metabólica en función de las informaciones recibidas a través de sus integrinas. El condrocito puede modificar su fenotipo ante cualquier cambio en el medio circundante.<sup>7, 15</sup>

#### **1.1.2.2. Matriz extracelular interterritorial**

Como la mayor parte de los tejidos del cuerpo humano el cartílago hialino está muy hidratado, presentando un contenido en agua que oscila entre el 75 y el 80%. La asombrosa capacidad del cartílago para amortiguar impactos y sobrellevar la continua fricción a la que es sometido en las articulaciones, es el resultado de las propiedades mecánicas de la MEC secretada y mantenida continuamente por los condrocitos.<sup>16</sup>

Esta MEC está formada por macromoléculas, de las cuales, las más abundantes y características del cartílago hialino es el colágeno tipo II. Otro componente fundamental por su abundancia es una gran proteoglucano con función agregante, denominado agregano. Además de estas dos sustancias, el cartílago hialino incluye en su composición colágenos tipo IX, X y XI y en situaciones especiales los tipos de proteoglicanos sulfatados y proteínas de unión, además de ácido hialurónico y otros componentes menos abundantes,



aunque no por ello menos importantes, como biglucano, decorita, fibromodulina, fibronectina, periecano, lípidos.<sup>16</sup>

La matriz tiene dos componentes principales: fibras de colágeno de tipo II y moléculas de gran tamaño, los agregados de proteoglicanos.

### **Fibras de colágeno**

Estas macromoléculas desempeñan un papel central en la estructura de la matriz del cartílago. Las fibras de colágeno soportan una elevada tensión dentro de la MEC y, en gran medida, su función radica en soportar la presión osmótica de hinchado creada por la elevada carga negativa de los proteoglucanos. Los colágenos más abundantes en el cartílago hialino son los de tipo II, IX y XI, que representan más del 99% del contenido total de colágeno. De estas tres formas, el colágeno tipo II es el más abundante con mucha diferencia, constituyendo entre el 90-95% de todo el colágeno presente en este tejido.

El colágeno de tipo II representa el 95% de los colágenos del cartílago. Es un homotrímero  $\alpha$  (II) del que existen dos formas que resultan de un empalme alternativo del exón II: la forma IIA, la más larga y expresada por los condrocitos en el curso del desarrollo, y la forma IIB, que no posee el exón II y se expresa en el cartílago del adulto. Es interesante señalar que los condrocitos de la artrosis expresan nuevamente el colágeno IIA. La trama fibrilar tridimensional formada por la unión de las moléculas de colágeno II entre sí, confiere al cartílago propiedades de resistencia a la compresión y resulta fundamentalmente para la conservación de su forma y volumen<sup>17</sup>.

Los colágenos no fibrilares se caracterizan por dominios NC terminales anchos y dominios NC cortos que interrumpen la triple hélice. Por último, existen colágenos de tipo FACIT –*fibre associated collagens with interrupted helix*- (IX, XII, XIV y XIX) y colágenos en forma de redes o de filamentos (IV, VI, VIII y X). Hasta ahora se conocen 19 colágenos diferentes<sup>17</sup>.

Los colágenos del cartílago son los tipos VI, IX, X y XI. Salvo el tipo X, ninguno de los otros es específico del cartílago articular, porque también se hallan en el cartílago de crecimiento, los fibrocartílagos, la córnea y el humor vítreo. Sin embargo, el colágeno de tipo II, sin ser totalmente específico del cartílago articular del adulto, es un marcador del condrocito normal e indica en cultivo la diferenciación del mismo<sup>1, 18, 19</sup>.

El colágeno de tipo X es un homotrímero  $\alpha_1$  (X) expresado de forma específica en el tejido cartilaginoso, sobre todo en la zona hipertrofia tardía de los cartílagos de crecimiento. Se encuentra también alrededor de los condrocitos de la zona mineralizada del cartílago articular y participaría en el proceso de mineralización de la matriz extracelular<sup>19-21</sup>.

El colágeno de tipo IX es un heterotrímero. Una de sus cadenas  $\alpha_2$  (IX) glucosilada se convierte en un grupo condroitinsulfato que le confiere naturaleza proteoglicánica. Posee un dominio NC4 ancho N-terminal de la cadena  $\alpha_1$  (IX) y dos segmentos NC intrahélice. En el exterior de las fibrillas se une de modo covalente y antiparalelo con los telopéptidos del colágeno de tipo II. Podría actuar como conector entre las diferentes fibrillas, estabilizando de ese modo la red colagénica tridimensional <sup>19, 22-24</sup>.

El colágeno de tipo IV, heterotrimérico, posee dos dominios cortos en hélice triple y un dominio globular terminal voluminoso que ocupa dos tercios de la molécula. Se dispone en el espacio pericelular del condrocito y no se une directamente a las fibrillas de colágeno de tipo II, pero podía participar en la adhesión del condrocito a la matriz extracelular <sup>19, 22, 23</sup>.

El colágeno de tipo IX sólo representa el 2-3% del colágeno total. Es un colágeno fibrilar heterotrimérico localizado dentro de las fibrillas de colágeno II, de las cuales es indisociable. Probablemente controla la organización tridimensional y el diámetro de las fibrillas <sup>19, 22, 23</sup>.

La importancia de los diferentes colágenos en el mantenimiento de la integridad del cartílago se traduce clínicamente por la descripción de displasia o de artrosis precoz, más o menos acentuadas, en pacientes con mutaciones en los genes que codifican esos colágenos <sup>19, 25-27</sup>.

### **Proteoglicanos**

Como su nombre indica, estas macromoléculas poseen una parte proteica que contiene regiones glucosiladas. Los proteoglicanos de la MEC son cadenas de carbohidratos (glucosaminoglucanos) unidas de forma covalente a un núcleo proteico.

En el cartílago articular se distinguen dos tipos de proteoglicanos según su capacidad de agregación al ácido hialurónico:

- Los macroproteoglicanos de masa molar elevada, representados en su mayoría por el agregano.
- Los proteoglicanos de masa molar reducida: decorina, biglicano y fibromodulina.

### **Agreganos**

Los proteoglicanos están formados por una proteína axial (*core protein*) ligada de modo covalente a una o varias cadenas de glucosaminoglucanos (GAG). Los GAG son cadenas polisacarídicas largas formadas por la repetición de disacáridos compuestos de azúcar aminada y un hexuronato. Cada unidad disacáridica contiene por lo menos una carga negativa en el grupo carboxilo o sulfato, que convierte a las moléculas en cadenas aniónicas largas, rechaza las

moléculas negativas y capta los iones  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  que atraen a las moléculas de agua<sup>28, 29</sup>.

El monómero de agrecano está formado por una proteína axial de 237-248 kDa, sobre la cual se fijan unas cien cadenas de condroitinsulfato y unas treinta cadenas de queratansulfato. Un solo gen de 16 exones codifica esta proteína transportadora. La región N-terminal de la proteína es la que se une de modo covalente a una molécula de ácido hialurónico. Una glucoproteína pequeña o proteína de enlace (*link protein*) estabiliza esta unión. Una molécula de ácido hialurónico puede contener más de 300 moléculas de agrecanos que, de ese modo, forman superagreicanos de un peso molecular muy elevado ( $5 \times 10^7$ - $5 \times 10^8$  Da)<sup>30</sup>.

Los agrecanos representan alrededor del 90% de los proteoglicanos. Los proteoglicanos grandes no agregados representan algo menos del 10% y los proteoglicanos pequeños alrededor del 3%. Los proteoglicanos se encuentran en las mallas formadas por la red de colágeno. El tamaño elevado de los agregados de proteoglicanos garantiza su permanencia dentro de las fibras de colágeno II. Por sus propiedades biofísicas (cargas negativas que atraen las moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ ), los GAG crean una presión osmótica elevada que asegura la hidratación del cartílago y pone en tensión la red de colágeno, participando de ese modo en las propiedades biomecánicas del cartílago. Los macroagregados de proteoglicanos se comparan con esponjas aprisionadas en una red de mallas apretadas: fibras de colágeno de tipo II. Así se explica que una alteración de la red de las fibras de colágeno pueda desorganizar la estructura del cartílago y que modificaciones cuantitativas o cualitativas de los proteoglicanos influyan en el poder hidrófilo del mismo<sup>31</sup>.

### **Proteoglicanos pequeños**

La decorina, el biglucano y la fibromodulina tienen en común una misma proteína transportadora central (*core protein*) y sólo se diferencian por la calidad y cantidad de sus GAG. Esas moléculas pertenecen a la familia de las "proteínas ricas en leucina". La decorina posee una sola cadena de condroitinsulfato (o dermatansulfato), el biglucano dos, mientras que la fibromodulina y el lumicano constan de cuatro cadenas de queratansulfato. La decorina y el biglucano tienen un peso molecular de 70 y 100 kDa respectivamente. Estos dos pequeños proteoglicanos presentan la peculiaridad de poder unir muchas moléculas de la matriz extracelular, igual que los colágenos II y VI, la fibronectina y algunos factores de crecimiento<sup>20, 32-34</sup>.

La fibromodulina tiene un peso molecular de 59 kDa y también puede unir el colágeno de tipo II. Al igual que la decorina y el biglucano, es muy probable que participe en la fibrillogénesis del colágeno II<sup>35</sup>.

Considerando la carga reducida de sulfato de los proteoglicanos pequeños, es importante señalar que las técnicas de incorporación de sulfato para demostrar la producción de proteoglicanos – in Vitro o in vivo- por los condrocitos reflejan básicamente la producción de agreganos, que representan alrededor del 95% de los proteoglicanos pequeños sólo representan aproximadamente el 3% de la masa de los proteoglicanos totales del cartílago, la cantidad de sus moléculas es idéntica a la de los proteoglicanos grandes.

### **Ácido hialurónico**

Este polisacárido forma largas cadenas que dan lugar a un esqueleto al cual se unen, como ya hemos indicado, las moléculas de agregano. Las moléculas de hialuronato son extremadamente largas, con una longitud que puede alcanzar la sorprendente longitud de 10µm (aproximadamente, la mitad del diámetro de un condrocito), aunque su longitud media ronda los 0,5-1 µm. Lógicamente, la longitud de estas cadenas de ácido hialurónico determina cuántos proteoglicanos se pueden unir a cada una de ellas de forma que una cadena larga puede unir hasta 800 moléculas de agregano. La unión de los proteoglicanos a las cadenas de ácido hialurónico se refuerza mediante un pequeño polipéptido conocido como proteína de unión. Puesto que una vez que los proteoglicanos son secretados por los condrocitos, estas moléculas serían libres de migrar a través de la matriz y difundir hacia el espacio articular, su capacidad de agregarse, específicamente, con las cadenas de ácido hialurónico, los inmoviliza dentro de la matriz, razón por la cual el ácido hialurónico desempeña un importante papel en la organización de la matriz cartilaginosa.

### **Glucoproteínas**

Además de los diferentes colágenos y de los proteoglicanos mencionados, la matriz extracelular incluye otras proteínas que se agrupan bajo la denominación de “glucoproteínas y proteínas no colagénicas”. Su función en el cartílago se conoce mal, pero muy probable que la mayoría intervenga en la estructura y la conservación tridimensional de la matriz extracelular. Para definir el conjunto de esas moléculas se habló de “liga intercolagénica”, que permitiría la adhesión de las moléculas entre sí.

La condroadherina (CAD) pertenece a la familia de las proteínas ricas en leucina, como la decorina, el biglucano y la fibromodulina. Intervendría sobre todo en los procesos de interacción celular con la integrina  $\alpha_2\beta_1$ . Recientemente se ha demostrado que esta proteína también podía interactuar con el colágeno de tipo II <sup>36</sup>.

La fibromodulina sería una molécula clave para la unión de las fibras de colágeno entre sí. La “fractura” o el ataque enzimático de esta glucoproteína de enlace podría ser de suma importancia en la fisiopatología de la artrosis <sup>37</sup>.

La fibronectina es una glucoproteína de 220 kDa dimerizada, presente de sobra en a mayoría de los tejidos conectivos. Se han identificado diferentes dominios funcionales: sitios de uniones a las integrinas y sitios de interacción con distintos colágenos o el ácido hialurónico. Hay diferentes isoformas de la molécula, entre ellas una forma cartilaginosa resultante de empalmes alternativos. Esta glucoproteína se estudia en especial porque algunos de los fragmentos pueden aumentar las síntesis de diferentes metaloproteasas, sobre todo MMP13, por medio de enlace a las integrinas  $\alpha_5\beta_1$ <sup>38-40</sup>.

La tenascina se expresa especialmente en la artrosis, pero su función sería importante en la modulación de la fijación del condrocito a la fibronectina.

La proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP) se halla en relativa abundancia dentro de la MEC, y hay estudios que sugieren que funciona como mediador en las interacciones matriz-matriz y matriz-células en el cartílago y otros tejidos musculoesqueléticos. De hecho, parece ser que puede interactuar con los glucosaminoglucanos, uniendo proteoglucanos a la membrana de los condrocitos, hecho relevante para la formación y mantenimiento de la matriz extracelular del cartílago, además de contribuir a la fijación y la migración de los condrocitos<sup>41</sup>.

Todas estas consideraciones microscópicas descritas anteriormente, se verán ampliadas en el apartado de resultados, considerando las distintas tinciones realizadas sobre el cartílago articular nativo.

### **1.1.3. Propiedades del cartílago y capacidad regenerativa.**

#### **1.1.3.1. Propiedades generales**

El cartílago articular facilita el deslizamiento de las superficies óseas gracias a un coeficiente de fricción extremadamente bajo. El cartílago es resistente, elástico y está lubricado. En cierto modo, actúa como amortiguador y así absorbe las presiones que recibe. La base ósea sobre la que se apoya (hueso subcondral) desempeña también un papel importante en las funciones de resistencia y deformidad.

La composición y la estructura del cartílago explican sus propiedades biomecánicas. Se habla de un tejido elástico y resistente, lo que explica su deformabilidad y su resistencia a la compresión. La índole elástica se explica por la hidrofilia de los proteoglucanos, que permite el movimiento de vaivén de las moléculas de agua ante cargas mecánicas cíclicas. La rigidez del sistema se mantiene por efecto de una red de fibras de colágeno de tipo II.

Los efectos de la carga sobre el cartílago dependen de la magnitud y la duración de ésta.

### 1.1.3.2. Influencia de la presión en el comportamiento de los condrocitos

¿Cómo se pueden explicar las relaciones entre la carga mecánica aplicada sobre la superficie del cartílago y las modificaciones del comportamiento de los condrocitos a escala microscópica?

Cualquier modificación física, química o de la zona de la matriz del condrocito repercute en su metabolismo. Uno de los puntos clave para comprender el funcionamiento del cartílago es considerar las relaciones entre las células y la matriz. Las fuerzas físicas aplicadas sobre un cartílago producen modificaciones fisicoquímicas y de la estructura del espacio pericelular: modificación del pH, apertura de algunos canales iónicos, defecto de transporte de los nutrientes, en especial de adenosintrifosfato (ATP), y cambios en las relaciones célula-matriz por la vía de las integrinas. El último punto fundamental y condiciona en parte el comportamiento normal o anormal de la célula por efecto del estrés mecánico. Las integrinas también se fijan, en su porción citoplasmática, a una red de proteínas submembranas que pueden activar el mecanismo de transducción celular a través de fosforilaciones en cascada. Cualquier modificación de las proteínas extracelulares (ya sea cuantitativa o cualitativa) y/o cualquier cambio en la expresión de las integrinas pueden desencadenar señales de respuesta del condrocito <sup>15, 42</sup>.

En estado normal, la aplicación de fuerzas cíclicas sobre el cartílago sirve para mantener las síntesis del condrocito. Existe un bucle de regulación positiva que implica la producción de interleucinas (IL 4) y la expresión de las integrinas normalmente presente ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_{10}$ ,  $\beta_1$ ,) etc. Ese ámbito matricial puede ejercer influencia sobre diferentes funciones celulares como la supervivencia, la capacidad de proliferación, el grado de desdiferenciación y la actividad metabólica. De este modo se demostró que la extinción del gen de la subunidad  $\alpha_1$  de las integrinas favorecía el desarrollo rápido de artrosis espontánea en una línea de ratones. Sobre todo, se produce aumento del número de condrocitos muertos e n la descendencia defectiva debido a la acción de la integrina  $\alpha_1$ . Así mismo, la aplicación de fuerza a baja frecuencia, con producción de un estrés mecánico limitado, tiene propiedades antiinflamatorias <sup>42-44</sup>.

In vitro, la aplicación de una fuerza cíclica superior a 6 MPa o de una fuerza única superior a 15 MPa produce muerte celular. Esta inducción de la muerte del condrocito depende también de la velocidad de aplicación de las fuerzas mecánicas capaces de debilitar el cartílago (mecanismos de los crujidos). Después de una agresión física, muchas células sufren condensación precoz de la cromatina como expresión de apoptosis <sup>45</sup>.

### 1.1.3.3. Factores proapoptóticos del condrocito

Es preciso insistir en la acción de dos agentes deletéreos: el NO y el estrés oxidativo, que probablemente actúan en conjunto. El NO (óxido nítrico) aparece como el factor proapoptótico principal y también como inhibidor de las síntesis, sintetizado por NO sintetasas bajo la influencia de IL1. Sin embargo, el NO tiene una vida media muy corta y actúa parcialmente en conjunto con los radicales libres, con objeto de formar peroxinitritos tóxicos para el metabolismo celular. El condrocito puede morir por necrosis (acción predominante de los radicales libres) o por apoptosis (acción predominante del NO). El estrés oxidativo, que se expresa como una producción aberrante de derivados oxigenados, se desencadena apenas reproduce la lesión molecular de la matriz. La tensión de oxígeno no es nula, sobre todo en las capas superficiales del cartílago. Los radicales libres, entre otros, podrían inhibir la producción de Hif 1 $\alpha$ , un factor anabólico que hace posible la secreción de enzimas de la glicólisis y de otros factores metabólicos de la célula. Por el contrario, la acción de factores de crecimiento podría proteger la célula del estrés oxidativo. Es lo que se sugiere en un artículo reciente acerca del receptor del IGF-I. En resumen, el equilibrio entre supervivencia y muerte del condrocito responde sin duda a procesos complejos que determinan la cantidad de factores de supervivencia y de factores proapoptóticos <sup>46-48</sup>.

### 1.1.3.4. El papel de la inflamación en la destrucción del cartílago articular

No se conoce la etiología exacta de la artrosis, pero se sospecha que la degradación de los componentes de la matriz del cartílago se debe a un exceso de síntesis y activación de proteinasas extracelulares, principalmente, metaloproteinasa. Aunque la artrosis se define como una artropatía no inflamatoria, se cree que la citocina proinflamatoria IL-1, es un importante mediador de la enfermedad. En respuesta a la IL-1, los condrocitos aumentan la producción de óxido nítrico (ON) y prostaglandina E2 (PGE2), dos factores que producen múltiples cambios celulares relacionados con la artrosis.

Se ha descrito que en el sinovium de pacientes con artrosis, predominan los linfocitos T CD4 sw ruoi Th1, lo que indica claramente que existe una regulación inmune. Recientemente, se ha hecho un estudio para determinar si, además de los condrocitos, el menisco de pacientes con artrosis también produce ON y PGE2, principalmente mediadores de la inflamación en la artrosis. Los resultados demuestran que todos los meniscos producen de manera constitutiva ON y PGE2 y que esta producción se ve incrementada en presencia de factores como IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  o IL-17 <sup>49</sup>.

Los fragmentos de fibronectina y otras sustancias y células que aparecen en el tejido alterado pueden mantener una producción continua de IL-1, comenzando así una cascada inflamatoria de degradación que incluye la presencia de ácido

araquidónico, prostaglandinas E<sub>2</sub>, leucotrienos y que estimula también la liberación de proteasas. Es decir, algunas enzimas, como estromelina, plasmina, colagenasas, gelatinasa, catépsinas ácidas, etc., desempeñan un papel muy importante en la destrucción del cartílago articular.

Otra alteración bioquímica notable en el cartílago artrósico es la actividad catabólica extraordinariamente elevada, cuyo efecto destructivo se ve reforzado por el aumento de fricción y el consiguiente desgaste que la articulación sufre, como consecuencia de la pérdida de las propiedades que caracterizan el cartílago sano. En el momento actual existen evidencias que apoyan la teoría de la destrucción del cartílago mediante enzimas lisosómicas y extralisosómicas. Se ha encontrado catépsinas ácidas en los lisosomas de los condrocitos que tienen una acción hidrolítica muy potente sobre la proteína de unión del macroagregado de proteoglicano, también están aumentadas en el cartílago artrósico algunas enzimas dependientes de metales, como la estromielina. Pese a todos estos hallazgos, probablemente el más activo y nocivo de los materiales proteolíticos encontrados en el cartílago enfermo sean las colagenasas.

Las colagenasas pertenecen a una familia de endopeptidasas dependientes de Zn, llamadas metaloproteinasas de la matriz (MMP). La colagenasa-1 o MMP-1, la colagenasa-2 o MMP-8 y la colagenasa-3 o MMP-13 son únicas enzimas conocidas capaces de iniciar la ruptura proteolítica de la triple hélice del colágeno a pH neutro.

Las colagenasas intervienen en algunos procesos de remodelación del tejido normal, como la reabsorción y crecimiento óseo, y el desarrollo embrionario, entre otros, pero se describió un aumento importante de número y actividad de estas MMP en procesos degenerativos, como la artrosis. Los condrocitos expresan y secretan MMP-1, MMP-13 y MMP-8, y esta expresión aumenta de forma muy significativa en presencia de IL-1 y de TNF- $\alpha$ .

Mediante la tecnología del cDNA-*microarray* se ha estudiado los perfiles de expresión génica durante la degeneración del cartílago en la artrosis, comparando muestras de cartílago en la artrosis, comparando muestras de cartílago normal con muestras de cartílago artrósico en los estadios iniciales y finales de la enfermedad. Entre las MMP, la MMP-3 se expresa en gran cantidad en los estadios iniciales de la artrosis y la MMP-2 y MMP-11 en los estadios más avanzados. No se detecta MMP-1 ni MMP-8 y MMP-13 y MMP-2 solamente se expresan en los estadios más avanzados de la artrosis, lo que sugiere que los estadios iniciales de esta patología están caracterizados más por la degradación de otros componentes de la matriz como el agregano y otras moléculas no relacionadas con el colágeno, que con la degradación de las fibras de colágeno tipo II. Las agreganasas son un tipo de enzimas



pertenecientes a la familia de las MMP, recientemente, se ha demostrado que uno de sus miembros, el AOAMTS4, está sobreexpresado en los condrocitos de pacientes con osteoartrosis y desempeña un papel fundamental en la degradación del agregado en la MEC de estos pacientes<sup>50</sup>.

Para defenderse de esta serie de ataques enzimáticos, el cartílago utiliza ciertas defensas, la secreción del inhibidor tisular de metaloproteasas (TIMP) y del activador del inhibidor 1 de plasminógeno (PAI 1), que tratan de estabilizar el sistema de degradación, a la vez que diversos mitógenos, como IGF 1, TGF- $\beta$  y b-FGF, intentan iniciar una respuesta de reparación del tejido. También los condrocitos contribuyen a la reparación tisular, incrementando su replicación para producir nuevas células, algunas de las cuales se vuelven metabólicamente muy activas en un intento de reproducir mayores cantidades de proteoglucanos, colágeno y ácido hialurónico. Sin embargo, estos nuevos materiales, probablemente, sean anormales en el sentido que no se agregan de una forma correcta, contribuyendo, así, a aumentar las alteraciones en la distribución de los glucosaminoglucanos en los proteoglucanos de nueva síntesis. El proceso degradativo, una vez desencadenado, es inevitable y siempre más acusado que el proceso de regeneración, de forma que cuando las propiedades mecánicas del cartílago se ven finalmente comprometidas es inevitable la destrucción mecánica de las superficies articulares como resultado de la fricción y el desgaste.

#### **1.1.4. Lesiones del cartílago articular.**

El cartílago articular es una estructura relativamente débil y fácilmente lesionable incluso tras traumatismos de baja intensidad. En múltiples ocasiones pasan desapercibidas, en un primer examen, siendo necesario practicar una resonancia magnética nuclear para llegar a su diagnóstico.

La acción traumática produce tres tipos de lesión diferentes, según su profundidad: lesión microscópica por impacto, lesión condral y osteocondral. La lesión microscópica por impacto muestra una superficie del cartílago de aspecto normal. La lesión condral se caracteriza por rotura del cartílago articular de diferente profundidad pero sin llegar a la línea de marea (tidemark). La lesión osteocondral afecta tanto al cartílago como al hueso. Cada una de estas lesiones tiene diferentes posibilidades de curación y un pronóstico diferente. Sin duda, existen otros factores asociados que tienen su importancia: extensión de la lesión, tamaño y localización, edad del paciente, nivel de actividad, obesidad y mal alineamiento de la extremidad; todos ellos pueden considerarse como factores de riesgo.<sup>51</sup>

Otro tipo especial de lesión condral es la osteocondritis disecante (OCD) que es una lesión focal osteocartilaginosa que se caracteriza por la separación de un fragmento osteocondral hacia la superficie articular. El proceso patológico

se caracteriza por la sucesión de una serie de acontecimientos que van desde una situación inicial que afecta a un pequeño fragmento estable hasta un total desprendimiento del fragmento osteocondral en la articulación, con una etiología generalmente desconocida.<sup>51</sup>

#### **1.1.4.1. Lesión microscópica por impacto**

El impacto puede ser único e intenso o múltiples pequeños impactos repetidos. En ambos casos pueden ocurrir microfracturas en la matriz, con la consiguiente respuesta. La primera pérdida de condrocitos es por apoptosis hasta un 34%. También la matriz se degrada en sus constituyentes: colágeno y proteoglicanos. La repetición de cargas excesivas también acaba afectando al hueso subcondral o a la zona de cartílago calcificado, que se engruesa y calcifica en exceso, con adelgazamiento del cartílago articular, lo cual induce artrosis. Ulteriormente, la suelta de enzimas de degradación y citoquinas por los condrocitos aumenta la degradación de la matriz. Es dudoso que la lesión microscópica pueda ser reversible.<sup>51, 52</sup>

#### **1.1.4.2. Lesión condral y osteocondral**

En esta lesión se rompe la línea de marea (tidemark) del cartílago, llegando hasta el hueso subcondral, con importante lesión del cartílago. La afectación del hueso condral crea una respuesta inflamatoria: hematoma que se organiza, coágulo de fibrina que se transforma en tejido fibrovascular de reparación. Las células madre mesenquimales de la médula ósea proliferan y se diferencian en condrocitos por acción de factores locales de crecimiento. Al cabo de 6 a 8 semanas existen gran cantidad de condrocitos en el tejido de reparación que sintetizan colágeno de tipo II y agregados de proteoglicanos. Las células más profundamente situadas en el defecto sufren osificación endocondral que cicatriza el defecto del hueso subcondral y a continuación se produce degeneración de la matriz fibrocartilaginosa con una cociente de colágeno tipo I/ tipo II mayor que el cartílago hiliario normal. Estos cambios degenerativos se inician con fibrilación superficial, pérdida de proteoglicanos de la matriz, muerte celular de tipo condrocítico y figuración de la superficie articular. A los 12 meses de la lesión, las células restantes toman forma de fibroblastos, con una matriz envolvente formada por fibras de colágeno tipo I. Este tejido suele desintegrarse al cabo de un año, dejando el hueso expuesto.<sup>51, 53</sup>

Hay otros factores que influyen en el desarrollo de este proceso. El grado de desplazamiento de la lesión y el tamaño de los espacios entre los fragmentos influyen en la extensión y resultado de la respuesta de reparación y remodelación, según cómo se reduzca la lesión.<sup>54, 55</sup>

### 1.1.4.3. Proceso de reparación de las lesiones osteocondrales.

La reparación de las lesiones osteocondrales con separación interfragmentaria, no se ha estudiado lo suficiente, si bien lo que se sabe sobre el proceso que nos ocupa se basa en estudios de reparación osteocondral de defectos experimentales, en un primer lugar se forma un hematoma de origen óseo que rellena temporalmente el punto de lesión, luego se forma fibrina y las plaquetas reúnen un colágeno fibrilar. El colágeno sigue rellorando el defecto, extendiéndose en el cartílago a distancia variable. Las plaquetas sueltan mediadores vasoactivos y factores de crecimiento o citoquinas, tales como factor de crecimiento transformador beta (TGF- $\beta$ ) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). La matriz ósea también contiene factores de crecimiento como TGF- $\beta$ , proteínas óseas morfogénicas (BMPs), PDGF, factor de crecimiento insulinoide IGF-I, factor de crecimiento II (IGF-II) y otros. La liberación de estos factores de crecimiento puede jugar un papel importante en la reparación de defectos osteocondrales y en particular estimulando, posiblemente, la invasión y migración de células indiferenciadas en el coágulo y también influyendo en la actividad proliferativa y sintetizadora de las células<sup>54, 55</sup>.

Inmediatamente penetran en el defecto tisular, las células mesenquimales indiferenciadas proliferan y sintetizan nueva matriz. Al cabo de 2 semanas de la lesión algunas células mesenquimales toman forma redondeada como condrocitos y comienzan a sintetizar una matriz que contiene colágeno tipo II y una concentración de factores de crecimiento relativamente alta. Estas células producen zonas de cartílago parecido al hialino en las porciones cartilaginosa y ósea del defecto. A 6-8 semanas, el tejido de reparación del defecto osteocondral tiene muchas células de tipo condrocítico en una matriz con colágeno tipo II, factores de crecimiento, algo de colágeno tipo I y proteínas no colágenas. Las células de la parte ósea del defecto, a diferencia de las de la parte cartilaginosa, producen hueso inmaduro, tejido fibroso y cartílago de tipo hialino. El tejido de reparación está bien vascularizado, si bien los vasos sanguíneos apenas penetran en la parte cartilaginosa del defecto. Al cabo de 6-8 semanas, el tejido de reparación condral tiene una estructura y composición intermedia entre cartílago hialino y fibrocartílago, y apenas presenta la estructura del cartílago articular normal.<sup>54, 55</sup>

El tejido reparador del defecto osteocartilaginoso es menos rígido y permeable que el normal, la orientación y organización de las fibrillas de colágeno, incluso en las zonas más parecidas al cartílago hialino, no tienen las características del cartílago normal. Además, las células no establecen las normales relaciones entre sí, ni tampoco con la matriz, ni entre las moléculas de la matriz; de manera particular, la organización de las partes de matriz pericelular, territorial e interterritorial, las concentraciones de macromoléculas de matriz y las

relaciones entre factores de crecimiento del cartílago y la red de fibrillas de colágeno, se presentan de manera anormal en la mayoría de las muestras de tejido de reparación condral. La disminución de la rigidez y el aumento de la permeabilidad en la matriz cartilaginosa pueden incrementar la carga de la trama de macromoléculas con el uso de la articulación, conduciendo a daño estructural progresivo del colágeno de la matriz y de los factores de crecimiento, de manera que se expone a los condrocitos de la zona reparada a cargas excesivas que comprometen además su capacidad restauradora de la matriz.<sup>54, 55</sup>

#### **1.1.4.4. Remodelación de la superficie articular**

No es bien conocida la capacidad de remodelación del tejido cartilaginoso reparado de las lesiones osteocondrales, si bien la experiencia con experimentación animal y clínica que se conoce sobre lesiones de este tipo hace pensar que este tipo de tejido cartilaginoso ocasionalmente se remodela progresivamente para formar una superficie articular funcional. Sin embargo, en lesiones osteocondrales importantes no ocurre así, sino que al cabo de un año o antes aparece degeneración, depleción de factores de crecimiento de la matriz, fragmentación y fibrilación, aumento del colágeno y pérdida de células con aspecto de condrocitos. Las células restantes adoptan con frecuencia el aspecto de fibroblastos y la matriz que rodea está formada por fibrillas densas de colágeno; el tejido fibroso suele fragmentarse y desintegrarse, dejando expuestas zonas de hueso. Lógicamente, las propiedades mecánicas del tejido de reparación cartilaginosa son responsables de su frecuente deterioro.<sup>56</sup>

Con los años, la remodelación de este tejido varía. En sujetos de experimentación animal, los condrocitos presentan una mayor respuesta proliferativa y sintetizan mayores moléculas de factores de crecimiento que en animales maduros. Ulteriormente el tejido sinovial puede crecer y reformar la superficie articular para mejorar las alteraciones mecánicas del defecto.<sup>56</sup>

En casos de grandes defectos, la remodelación de la superficie articular es más compleja. Las lesiones osteocondrales crean una brecha o vacío con parte de la superficie ausente o desplazada, así como escalones con desigualdad nivel de la superficie articular, que cuando son grandes conducen a inestabilidad articular, mal alineamiento o ambas cosas, y no tienen probabilidad posible de repararse y remodelarse para crear una superficie articular funcional. Si mediante tratamiento, cruento o no, se pueden reducir, no se producen tales alteraciones.<sup>56, 57</sup>

#### 1.1.4.5. Factores de riesgo en artrosis postraumática

Las diferencias entre diversos tipos de lesión y su posibilidad de cicatrización y remodelamiento se explican por la presencia de factores de riesgo, que cuando se conocen bien podrán evitar la degeneración postraumática.

- **Gravedad de la lesión.** Hay que aceptar que a mayor intensidad del impacto agudo de carga contra la superficie articular ocurrirá mayor muerte de condrocitos y lesión de la matriz, si bien esta hipótesis no ha sido comprobada en estudios experimentales rigurosos.<sup>57</sup>
- **Incongruencia residual.** Las fracturas articulares, además del daño producido por impacto, cargas rotatorias o cizallamiento, pueden crear irregularidades residuales que de una manera crónica aumentan los estrese de contacto, como lo han demostrado experimentalmente Brown y cols., que llegan a la conclusión que la sensibilidad de los escalones se encuentra en relación inversa al grosor del cartílago. Los estudios clínicos van de acuerdo con los experimentales. También sugieren que para la mayoría de los pacientes la meniscectomía es un factor importante que incrementa la posibilidad de artrosis.<sup>58, 59</sup>
- **Inestabilidad residual.** La inestabilidad postraumática puede deberse a un fallo de los ligamentos, meniscos, cápsula articular, así como a escalones o grietas de las superficies articulares. Los estudios experimentales muestran que la inestabilidad que se produce en la rodilla al provocar sección del ligamento cruzado anterior y meniscectomía conduce a degeneración articular progresiva, incluso en articulaciones normales, pero si a la inestabilidad se suma incongruencia de la superficie articular, la progresión del deterioro es todavía mayor y, más todavía, si esto se añade alteración de la sensibilidad articular, que ocurre cuando se produce un desgarro de tejidos periarticulares y se hacen abordajes quirúrgicos amplios. Los estudios clínicos avalan las propuestas experimentales. Es evidente que los fallos articulares en situaciones de inestabilidad crean, en cualquier caso, estreses de contacto importantes que interfieren con los procesos de reparación y remodelación de las superficies articulares.<sup>60, 61</sup>

## **1.2. Abordajes terapéuticos de la lesión condral.**

La experiencia quirúrgica histórica en el tratamiento de las lesiones articulares ha establecido entre los cirujanos el concepto comprobado de que el cartílago hialino no cicatriza por sí mismo o lo hace de forma deficiente. Se han publicado múltiples estudios encaminados a explicar la fisiopatología y biomecánica de este tejido con el objetivo final de conocer y controlar los mecanismos de mantenimiento del tejido sano, así como los mecanismos lesionales y su consecuencia final en degeneración articular, aunque paralelamente los cirujanos aplicaron prácticas de reparación y regeneración tisular que en la actualidad ocupan mucha dedicación en el campo de la llamada biomedicina regenerativa <sup>62</sup>.

El cartílago articular actúa como un sistema de absorción de fuerzas que disminuye la intensidad de impactos sobre la placa subcondral. Su composición y lubricación da lugar a una muy baja fricción, no reproducible en la actualidad por la industria de biomateriales.

La reparación del cartílago articular, habitualmente en la rodilla, debe ajustarse a las expectativas del paciente como aliviar el dolor, mejorar la función, retrasar la progresión del deterioro articular y retrasar la cirugía de reemplazamiento articular

Con el perfeccionamiento de la artroscopia y el progresivo aumento del número de esta técnica practicada, se siguen defendiendo tratamientos como el lavado y el desbridamiento articular. No obstante, la artroscopia de rodilla para artrosis leve o moderada no es más beneficiosa que la cirugía placebo <sup>63</sup>.

Se han descrito varias técnicas para reparar el cartílago lesionado, pero todas ellas se pueden englobar en métodos reparativos, reconstructivos o regenerativos. Los métodos reparadores ayudan a la formación de un nuevo tejido fibrocartilaginoso, facilitando el acceso tanto de los vasos y de las células osteoprogenitoras capaces de conseguir una condrogénesis.

Los métodos reconstructivos buscan rellenar el defecto con tejido autólogo o aloinjertos. Por último, los métodos regenerativos que aprovechan técnicas de bioingeniería para desarrollar un cartílago hialino.

## 1.2.1. Técnicas de reparación

### 1.2.1.1. Desbridamiento artroscópico.

Está indicado cuando hay síntomas meniscales y lesiones condrales tipo Outerbridge II, para regularizar el cartílago sin buscar ningún efecto curativo cuando ya los resultados son mediocres.

### 1.2.1.2. Estimulación de la médula ósea: Microfracturas.

Los fundamentos de la técnica están basados en el mecanismo de la mesengénesis o capacidad que tienen células mesenquimales indiferenciadas en optar por un fenotipo concreto, en respuesta a la acción de factores inductores o de crecimiento. Una célula indiferenciada de la médula ósea puede inducirse a distintos tipos celulares como osteoblastos, con posterior maduración a osteócitos, condroblastos y condrocitos, pero también a células endoteliales, mesoteliales, fibroblastos, adipocitos. Se trata de un proceso de señalización celular de citocinas locales sobre células locales. Para conseguir todo lo anterior, la técnica quirúrgica se basa en perforar la placa ósea subcondral con el fin de conseguir un sangrado, un supercoágulo que sirva como almacén y aporte de células y factores bioactivos.

#### **Descripción de la técnica de microfractura**

Inicialmente se debe de extraer el cartílago destruido o inseguro, dejando las paredes verticales al hueso, para proceder luego a las perforaciones, pero con una técnica que permita mantener la estabilidad ósea. Se emplean unos punzones cónicos y angulados (picahielo de Streadman) siempre perpendiculares a la placa subcondral para producir los orificios compactos y, evidentemente, de forma cónica, evitando la confluencia de las perforaciones, que deberían de estar separadas entre sí unos 2-3 mm, comenzando por la periferia de la lesión <sup>64</sup>.

Para evitar que el sangrado desaparezca de la lesión se ha propuesto el SGRM (*scaffold guided regenerative medicine*) que aplica una matriz, un polímero natural, como el quitosán sobre la lesión, como una parche que se reabsorbe pero deja todos los productos sanguíneos y las células troncales en la zona de la lesión, protegidos del agresivo líquido sinovial, para que forme el cartílago hialino <sup>65</sup>.

#### **Indicaciones**

Los mejores resultados de esta técnica se dan en pacientes jóvenes con lesiones traumáticas pequeñas <sup>66</sup>.

Defectos de hasta 2 cm<sup>2</sup> en pacientes menores de 40 años y en hallazgos artroscópicos hasta 3 cm<sup>2</sup> en áreas de no carga.

## 1.2.2. Técnicas de sustitución

### 1.2.2.1. Injertos osteocondrales autólogos.

El trasplante de autoinjerto osteocondral consiste en trasladar algún número de cilindros osteocondrales de una zona sana articular, generalmente no de carga, al defecto cartilaginoso, con el fin de cubrirlo con un tejido hialino y creando una superficie congruente. Los fundamentos de la técnica están basados en estudios previos con cilindros grandes, con los que se pudo demostrar la persistencia de cartílago hialino <sup>67</sup>.

En la actualidad se trasplantan cilindros de poco diámetro con el fin de facilitar la congruencia articular, disminuir la morbilidad de la zona donante y la posibilidad de obtener un mayor número de injertos.

#### **Técnica quirúrgica**

Los injertos se obtienen de áreas de no carga, como la zona periférica del cóndilo femoral o del surco intercondíleo en su zona central, mediante escoplos cilíndricos huecos y cortantes. Se obtienen así cilindros osteocondrales de distintos tamaños, hasta 10 mm, recomendándose los menores de 7 mm de diámetro y, utilizando distintos tamaños, se puede rellenar entre el 90 y el 100% del defecto, creando una superficie uniforme, convexa, es un objetivo primordial para obtener buenos resultados, implantando así injertos perpendiculares a la placa subcondral. A pesar de todo, la técnica debe de ser muy precisa, buscándose una buena congruencia, evitando espacios interinjertos e incluso discrepancias de nivel de la superficie articular, puesto que diferencias de 1mm provocan una peor integración.

Esta técnica está recomendada principalmente para lesiones pequeñas, menores de 2 cm<sup>2</sup>. Un problema importante con esta técnica es la limitación de la obtención de autoinjertos, lo que reduce las indicaciones a lesiones de tamaños pequeños, focales, teniendo también en cuenta la morbilidad en las zonas donantes. Defectos anchos y profundos en forma de cráter son poco apropiados para la técnica. Es imprescindible y difícil restaurar el contorno del defecto y cubrirlo con cartílago hialino, debiendo de procurar dejar los mínimos espacios entre los injertos por la facilidad a formar fibrocartílago y la ausencia de unión con el tejido local.

La mosaicoplastia, por lo tanto, tiene sus desventajas como son, un área de donación limitada, diferencias en la orientación tisular, en el grosor y propiedades del cartílago hialino de la zona donante y receptora, hundimiento de la superficie del injerto y la precaria concreción del defecto remanente. Algunos autores no encontraron tejido conectando entre el trasplantado y el local e histológicamente hallaron signos de degeneración del cartílago trasplantado <sup>68</sup>.



A pesar de los buenos resultados publicados, siguen siendo motivo de observación las consecuencias de la zona donante y sus síntomas en rodillas previamente lesionadas, a largo plazo. Hay estudios que explican la variabilidad de respuesta de la zona donante según tipos de pacientes, por lo que sería aconsejable explicarle al paciente los riesgos de dolor anterior de rodilla y la posibilidad de síntomas mecánicos por hipertrofia del fibrocartilago<sup>69</sup>.

### **1.2.2.2. Aloinjertos osteocondrales**

La implantación de aloinjertos en lesiones articulares constituye un recurso muy conocido, sobre todo en lo que se refiere a cirugía tumoral. Sin embargo, la utilización de aloinjertos en forma de cilindros osteocondrales para defectos de cartilago hialino ha sido menos utilizada que otros tratamientos<sup>70, 71</sup>.

Los fundamentos de la técnica están basados en la experiencia clínica y experimental, que muestra la evidencia de la viabilidad y la función de los condrocitos que se mantienen en el espesor del cartilago trasplantado.

Los métodos de conservación de los aloinjertos comenzaron a atraer la atención de clínicos e investigadores, y hay estudios que comparan el efecto de estos métodos en cuanto a la relación entre el medio de conservación y las características celulares, metabólicas y mecánicas<sup>72</sup>.

Las características inmunológicas de los aloinjertos han sido motivo de múltiples estudios. Las células de este tejido poseen capacidad antigénica, pero al estar inmersas en la matriz extracelular, se considera al cartilago fresco, intacto, como un tejido con privilegio inmunológico, los aloinjertos se implantan en formas geométricas regulares, habitualmente como cilindros, que incluyen hueso subcondral. Hay estudios que muestran la respuesta inmunológica al aloinjerto de hueso fresco.

### **Técnica quirúrgica**

En primer lugar, es necesaria una planificación preoperatoria para lo que se debe de disponer de un conocimiento adecuado de la lesión como el tamaño, la profundidad, lesiones asociadas, etc., bien sea con imágenes de RMN (resonancia magnética nuclear) o/y artroscopia. Una vez sentada la indicación, el paciente se incluye en una lista de espera para la obtención del donante adecuado. El hecho de cultivar el injerto permite un margen de tiempo para poner en alerta al paciente.

Se pueden emplear como cilindros grandes o como mosaicos e incluso fragmentos de parte de un cóndilo femoral solo o combinándolo con parte de la meseta tibial<sup>73</sup>.

En la actualidad existe instrumental específico para la realización de la técnica de forma más precisa, implantando los cilindros a presión sin necesidad de usar sistemas de fijación interna; no obstante, si fueran necesarios se recomiendan clavos de polidioxanona. Se practica una artrotomía y se expone la lesión, que se delimita en tamaño y forma circunferencial mediante un cilindro de plástico transparente y perforado en su centro. Se dibuja la circunferencia de todos los defectos procurando que se recubra toda la lesión. A continuación se introduce un clavo de K a través del cilindro y perpendicular a la placa subcondral y se retira el cilindro. El clavo servirá de guía para introducir una fresa del tamaño del defecto marcado y se procede a perforar las distintas capas de tejido hasta una profundidad mínima de unos 8-10 mm para crear un espacio con hueso esponjoso viable o sangrante. Se mide la profundidad en los cuatro cuadrantes del hueco para recortar el aloinjerto con el fin de que asiente firmemente en el fondo, con la superficie del cartílago a nivel con el del área receptora.

El aloinjerto cultivado se fija en un soporte y se identifican las áreas del mismo que se correspondan con el defecto, para proceder a continuación a extraer el cilindro con una fresa hueca. Se recorta el hueso subcondral a la forma y profundidad del hueco y éste se dilata 0,5 mm y a continuación se implanta el aloinjerto.

### **Indicaciones**

Cualquier paciente con lesiones osteocondrales simples o múltiples, de tamaños grandes, con pérdida de hueso subcondral, y, aunque la edad no es una limitación mayor, se prefiere entre 50-55 años, puede ser candidato para esta técnica. Defectos que no sean susceptibles de otro tipo de técnicas o en aquellos en los que hayan fracasado tratamientos previos. Lesiones traumáticas directas o indirectas, incluso osteocondritis disecante, osteonecrosis, rescate de meseta tibial. Como quiera que sea, la selección del paciente en cuanto a sus expectativas, su motivación, historia clínica y relación de los síntomas con la lesión, etc. es uno de los factores importantes.

En pacientes mayores, con actividad baja, en lesiones grandes con pérdida de hueso subcondral y profundidades importantes, mayores que 6 y 8 mm, creemos que esta técnica de aloinjerto es recomendada.

### **1.2.2.3. Cilindros sintéticos**

Los sustitutivos osteocondrales sintéticos facilitan mucho las técnicas de relleno de los defectos osteocondrales; su ventaja es que se elige el grosor adecuado y se talla su longitud según la profundidad del defecto. Además, se pueden combinar con células troncales o factores de crecimiento. Sin embargo, a pesar de acortar el tiempo quirúrgico no parece que puedan sustituir, en

estos momentos, a los auto o aloinjertos pues se ha visto que pierden resistencia en poco tiempo.

### **1.2.3. Técnica de regeneración: terapia celular.**

Debido a las limitaciones regenerativas del cartílago articular nativo y a los nuevos conocimientos sobre la terapia celular, se han generado múltiples líneas de investigación en el tratamiento de los defectos osteocondrales con esta técnica<sup>70, 74</sup>.

Las dos líneas de tratamiento consisten en el uso de trasplantes de condrocitos maduros, obtenidos del propio paciente o de un donante y el empleo de células progenitoras.

El conocimiento de la capacidad regenerativa y de diferenciación celular de las células progenitoras las hacen candidatas fundamentales en la terapia celular. También destacar la gran evolución en la fabricación de bioelementos, necesarios como soporte en la terapia tisular.

#### **1.2.3.1. Implante de condrocitos autólogos (ACI)**

Los principios de esta técnica se basan en la capacidad de adhesividad de las células a ciertas superficies sobre las que se esparcen y proliferan produciendo su matriz extracelular específica, formando así un tejido. Los condrocitos se pueden adherir al cartílago vivo o desvitalizado. Otro estudio mostró que los condrocitos, tanto frescos como subcultivados, se adhieren a todas las superficies de los defectos osteocondrales, aunque las células subcultivadas presentaban una cierta tendencia mayor a la adherencia que los aislados frescos, con resultados no estadísticamente significativos. Las células expresan colágeno tipo II y agregano, a las dos horas del implante, lo que parece relacionado con el estado de diferenciación celular<sup>75-77</sup>.

La técnica de implante de condrocitos autólogos (ACI-P) se comenzó a aplicar en la práctica clínica en 1994. Este hecho dio lugar a muchos estudios y controversias, lo que estimuló el interés científico y condujo a la formación de grupos de subespecialización para desarrollar métodos de regeneración del cartílago, que incluye la ingeniería de tejidos.

#### **Técnica quirúrgica**

Se requieren dos estadios. El primero consiste en practicar una artroscopia para evaluar el tipo de defecto, tamaño, localización, estabilidad del cartílago que lo rodea, profundidad, etc., ya que las imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) en la actualidad no arrojan todavía una clara información. Durante esta intervención se realizan biopsias de cartílago para cultivar y hacer proliferar sus células para, posteriormente, reimplantarlas.

Los condrocitos se obtienen mediante biopsias del espesor total de cartílago de la zona superomedial del cóndilo femoral medial. Otras opciones podrían ser el espacio intercondíleo, sobre todo al reparar el ligamento cruzado anterior, e incluso de la periferia superior del cóndilo externo. Estudios recientes mostraron la capacidad de las capas superficiales del cartílago de poseer células progenitoras, lo que podría evitar, en el futuro, extraer todas las capas del tejido. La cantidad de tejido obtenido es de unos 200-300 mg, extrayendo al mismo tiempo 10 x 10 ml de sangre con el fin de conseguir suero autólogo para enriquecer el medio de cultivo celular <sup>8</sup>.

El segundo estadio consiste en implantar las células cultivadas en el defecto articular. Con este objetivo se establecen varios pasos: disociación, cultivo, expansión de las células e identificación.

El cultivo se hace con el fin de aumentar el número de células. Una vez recibidas las biopsias en el laboratorio se procede a la disociación celular mediante una digestión enzimática, para luego continuar con el cultivo añadiendo medio enriquecido con suero autólogo. Se subcultivan hasta alcanzar el número adecuado al defecto articular, por lo que es conveniente que se informe al laboratorio del tamaño del defecto.

Una vez obtenido el número suficiente de células que cumplen un control de calidad se procede a una cirugía lo menos agresiva posible para preparar el defecto e implantar los condrocitos. Se interviene el paciente practicando una artrotomía, se identifica la lesión y los bordes estables del cartílago. Con unas curetas en forma de anillo se corta el cartílago dañado, creando paredes perpendiculares a la placa subcondral dando lugar a la formación de un defecto contenido. Evitar que sangre la placa subcondral, en cuyo caso se puede utilizar epinefrina o fibrina y presionar. Se hace un dibujo de la periferia del defecto mediante un papel y un rotulador estériles añadiendo 1 o 2 mm para obtener una copia lo más exacta posible de periostio. A continuación, se hace una incisión en el extremo superomedial de la tibia y se identifica una zona de periostio poco grueso, eliminando tejido graso. Se pone una marca con el rotulador en la capa superficial para identificar la capa de cámbium que debe de colocarse hacia la cavidad creada poniendo la plantilla de papel sobre el periostio, cortando y despegando este con periostotomo, teniendo cuidado de no producir ningún orificio. Se mantiene el periostio húmedo con suero y se sutura sobre el defecto, para provocar un compartimento estanco, utilizando vycril de 5-0 o 6-0 pasando la aguja de afuera adentro atravesando el periostio a unos 2 mm y cruzando el cartílago también a 2 mm. En las lesiones con zonas sin cartílago periférico, se debe de fijar el periostio con anclajes al hueso. Al termina la sutura se introduce, por la parte superior del defecto, un catéter (angiocatéter) del número 18, se inyecta (jeringa tipo tuberculina) suero fisiológico sin antibióticos, comprobándose la estanqueidad y cerrando con más

puntos, si fuera necesario. Se sella la zona de sutura con gel de fibrina. Se aspira el contenido que pueda quedar y a continuación se aspiran las células del envase sellado y se inyectan en la cavidad, retirando el catéter suavemente, cerrando con sutura el orificio de entrada y añadiendo gel.

### **Indicaciones**

La técnica de implantación de condrocitos autólogos es ideal para pacientes con defectos sintomáticos, unipolares, de todo el espesor del cartílago dañado, rodeado de cartílago sano, con pérdida ósea menor de 6-8 mm (excepto si se rellena el fondo con hueso) y tamaños que oscilen entre 2 y 12 mm<sup>2</sup>. Está muy indicada en lesiones grado III y IV de la clasificación de la Sociedad Internacional de Investigación del Cartílago (ICRS) en las zonas del cóndilo femoral o tróclea, en pacientes jóvenes, entre 15 y 55 años con actividades físicas altas y con buena cooperación y motivación. Sin embargo, es difícil de tener el defecto ideal, puesto que es frecuente encontrar lesiones no contenidas, lo que quiere decir que una de las zonas no está rodeada de cartílago, u otras enfermedades asociadas de rodilla. La microfractura o mosaicoplastia son procedimientos iniciales aceptables para lesiones menores de 2 cm<sup>2</sup>. Si fracasan estas técnicas, los defectos cartilaginosos podrán tratarse con ACI. Los resultados iniciales de la implantación en rótulas no fueron tan satisfactorios, pero en la actualidad esta técnica se asocia a la osteotomía de la tuberosidad tibial y la anteromedialización de la patela con mejores respuestas de los pacientes.

### **Implantes de condrocitos autólogos sellados con membrana de colágeno**

La técnica utiliza una membrana de colágeno I y III en vez del periostio. El resto del procedimiento es igual que el ACI con periostio.

Se aplica el término de ACI asociados a colágeno. La superficie porosa de la membrana se coloca hacia el defecto y la zona lisa hacia la cavidad articular. La ventaja es la pretensión de conseguir ausencia de hipertrofia del periostio, pero con la imposibilidad de añadir células indiferenciadas del cambium<sup>78</sup>.

#### **1.2.3.2. Implantes de condrocitos autólogos en una matriz (MACI)**

Otra generación de ACI (ACI-3) es la implantación de condrocitos adheridos a membranas o en matrices tridimensionales como colágeno I y III, polímeros en gel, el ácido hialurónico, etc. En este proceso de preparación se emplean entre cinco y seis semanas. El método se hace más sencillo, ya que consiste en rellenar el defecto con el gel y recubrirlo con fibrina<sup>74</sup>.

Podría practicarse por vía artroscópica. Se está produciendo un paso hacia la ingeniería del cartílago. Sin embargo, se necesitan más estudios sobre las matrices a emplear, el mantenimiento de la diferenciación celular, así como las

propiedades mecánicas, la interacción del injerto-huésped y la duración del nuevo cartílago formado. Los resultados de ACI y MACI son buenos y comparables.

La aplicación de técnicas de ingeniería de tejidos se practica utilizando células en cultivo, factores de crecimiento inductores del fenotipo celular y armazones como estructuras para el desarrollo del cartílago.

Entre los armazones empleados están los polímeros, que pueden ser de origen natural o biológicos, como el colágeno o el ácido hialurónico, alginato, xenoinjerto de submucosa, aloinjertos dérmicos; sintéticos, como el poliláctico, poliglicólico (PGA), poliláctico-glicólico (PLGA); de base mineral, como fosfato tricálcico, hidroxiapatita (HA, sulfato cálcico). El método de aplicación podría ser utilizando polímeros inyectables como el alginato o el óxido de polietileno (PEa) que se entrecruzan químicamente *in situ*.

El armazón ideal debería reunir una serie de requisitos para el adecuado desarrollo tisular, entre los cuales estarían una distribución uniforme de células en la estructura tridimensional, que facilite la difusión eficiente de moléculas bioquímicas y que la degradación del mismo se produzca a igual ritmo que el reemplazamiento por el tejido nuevo.

Las inquietudes que surgen con el empleo de algunos armazones se pueden resumir en primer lugar en su eficacia para la retención de las células implantadas y la ausencia de efectos inflamatorios locales, así como la reducción del contenido de glucosaminoglicanos, la baja eficiencia en el sembrado celular, a consecuencia de lo cual se necesita la utilización de un número muy elevado de células. También se ha observado una distribución celular irregular, así como una mínima retención de las moléculas de la matriz extracelular.

### **Tipo de matrices**

La mayoría de las matrices disponibles son polímeros naturales, como el colágeno, el ácido hialurónico o derivados de animales o sintéticos como los polilácticos. Las matrices naturales producen un medio más adecuado para el desarrollo, la adhesión y proliferación celular y pueden dividirse en matrices proteínas, como el colágeno, la fibrina y las matrices carbohidratadas, como el alginato, la azarosa, el chitosan y el hialurónico, aunque hasta el momento sólo se han evaluado mediante ensayos clínicos, el colágeno, el ácido hialurónico y el chitosan.

### **Polímeros de colágeno**

El colágeno es la proteína básica de los tejidos conectivos del esqueleto y dispone de ligandos que facilitan la adhesión celular, la migración y la

diferenciación. El MACI (Matriz-induced ACI) (MACI® (Matrices, Hezzenrath, Alemania; Cándor-Gide® ; Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Suizterland) son colágeno tipo I/tipoll porcino dispuestas en dos capas con condrocitos adheridos. Estas membranas se degradan por digestión enzimática y tienen dos superficies diferentes, la externa más resistente que actúa como una barrera mientras que la interna es porosa y estimula a las células para que produzcan moléculas específicas de la matriz del cartílago.<sup>79</sup>

### **Polímeros basados en el ácido hialurónico**

El ácido hialurónico es el mayor componente de la matriz del cartílago. El ácido hialurónico es un componente de la matriz extracelular que estimula la condrogénesis de las MSC. La combinación de la membrana con cultivo de condrocitos ha mostrado buenos resultados tres años después de la intervención. Esta membrana no requiere incisiones amplias, incluso se puede realizar por vía artroscópica ya que no requiere fijación al hueso subcondral.

El Hyaff-11® (Fidia Advanced Biopolymers Laboratorios, Abano Terme, Italia) es derivado esterificado del ácido hialurónico biocompatible, que puede utilizarse para diseñar estructuras tridimensionales y se reabsorbe en tres meses. El Hyalograft® (Fidia Advanced Biopolymers Laboratorios, Abano Terme, Italia) es un implante de ingeniería tisular donde crecen los condrocitos en una matriz de Hyaff-11 y una red con fibras de 20 µm de grosor<sup>80, 81</sup>.

### **Matrices de fibrina**

La fibrina es un polímero natural homólogo que forma parte de la cicatrización de las heridas, por lo tanto, una estructura interesante como matriz para reparar el cartílago que se puede copolimerizar con hialurónico para producir una matriz tridimensional. La fibrina está envuelta en el proceso de la coagulación de la sangre y se forma por la polimerización del fibrinógeno, en presencia de trombina, es un biomaterial muy biocompatible. Se han utilizado en gel o en pegamentos. Visna et al presentaron su experiencia con un año de evolución en reparación de cartílago con fibrina (Tissucol®, Baxter, Austria) y también el Condrograft® (BHT Monterrey, México) ha demostrado muy buenos resultados. Además, se ha visto que experimentalmente los condrocitos en una matriz de fibrina sobreexpresan IGF-1, produciendo una mayor cantidad de tejido con mayor cantidad de matriz extracelular y producción de colágeno<sup>82, 83</sup>.

### **Matrices carbohidratadas**

El alginato es un polisacárido aniónico derivado de las algas marinas. En presencia de cationes de calcio, las cadenas de alginato se mantienen por sus uniones iónicas. Cuando las células se depositan en una solución de cloruro de calcio, en presencia de alginato, forman esferas. Didro et al han demostrado condrogénesis de las células mesenquimales pluripotenciales (MSC)

soportadas en bolas de alginato, en defectos osteocondrales del conejo. Sin embargo, hay dudas sobre la biocompatibilidad en clínica <sup>84</sup>.

### **Chitosan**

El chitosan es un biocopolímero de glucosalina y N-acetilglucosamina. Sus productos de degradación incluyen condroitín sulfato, dermatán sulfato, ácido hialurónico, queratín sulfato y colágeno tipo II glicosilado; no es un producto tóxico y está implicado en la síntesis del cartílago articular. El chitosan está patentado con el nombre de BST Cargel® (Biosynthec, Laval, Québec, Canadá) como un hidrogel de chitosan/glicerol copolímero que se mezcla con la sangre y se puede inyectar en los defectos condrales después de realizar una microfractura. Los resultados en ovejas y conejos han demostrado resultados superiores a las microfracturas aisladas <sup>85</sup>.

### **Otras matrices**

Lind et al <sup>86</sup> promueven la utilización de una matriz MPEG-PLGA (metoxipoly-etileno-glicol y ácido poliglicólico) por sus características hidrofílicas con condrocitos, obtiene buenos resultados experimentales en cabras. Las matrices porosas en combinación con condrocitos han demostrado una buena capacidad para regenerar cartílago hialino, tanto experimental como en clínica, y se han estudiado muchos biomateriales porosos combinados con condrocitos para reparar lesiones cartilaginosas, como son los polímeros poliláctidos, el colágeno en malla o en gel, el ácido hialurónico en fibras malladas, chitosan y muchos otros. El ácido poliglicólico (PGA), poliláctico (PLA) y sus copolímeros polilácticoglicólico (PLGA) se han empleado en ingeniería tisular para el cartílago. Estos polímeros son matrices interesantes para ingeniería tisular por su biodegradabilidad y por estar aprobados para otros usos. Las matrices de PLGA con MSC se han trasplantado en grandes defectos en rodillas de conejo demostrando un tejido liso blanco macroscópico e histológicamente, 12 semanas después de su implantación, un aspecto semejante al cartílago hialino <sup>87</sup>. Sin embargo, las matrices porosas son difíciles de manejar artroscópicamente y la suspensión de condrocitos en hidrogeles puede ser inyectada directamente en las lesiones cartilaginosas. Los factores de crecimiento pueden mejorar la adhesión, migración y proliferación celular. Una combinación de TGFβ y BMP han demostrado experimentalmente la reparación del cartílago al incluirlos en el gel con las MSC. Sin embargo, los factores de crecimiento también tienen sus inconvenientes ya que la administración directa exige dosis muy elevadas o repetir las inyecciones debido a la corta vida de estas proteínas libres en la articulación. Además, es una técnica muy cara que puede provocar efectos indeseados ahora desconocidos. La nueva generación de biomateriales deben estimular la regeneración de los tejidos vivos <sup>88</sup>.



### **1.3. Terapia celular: empleo de las células “stem” en ingeniería tisular.**

#### **1.3.1. Concepto y antecedentes**

##### **1.3.1.1. Células madre**

Una célula madre (también denominada célula “stem” ) se define como aquella que tiene las siguientes tres características <sup>89</sup>.

- Capacidad de autorrenovación o de formar durante su división al menos una copia idéntica de la célula inicial, con las mismas características y propiedades biológicas.
- Capacidad de diferenciación hacia una (o varias) células maduras con función especializada
- Capacidad de proliferación a largo plazo

En los años 60, los experimentos de Till y McCulloch basados en el trasplante de células mononucleadas de médula ósea en ratones letalmente irradiados, demostraron por primera vez la existencia de células con estas propiedades en la médula ósea, las células madre hematopoyéticas <sup>90</sup>.

Posteriormente, un número creciente de estudios han demostrado que la médula ósea contiene células madre con mayor versatilidad que las células madre hematopoyéticas, además de las células progenitoras del estroma medular, o células madre mesenquimales <sup>91</sup>. Hay por ello un interés creciente en el aislamiento y expansión de estos tipos celulares por su potencial empleo como herramienta terapéutica en programas de terapia celular somática.

Entre los tipos celulares aislados en M.O. con mayor versatilidad se encuentran las MAPC (del inglés “*Multipotent Adult Progenitor Cells*”), descritas inicialmente por el grupo de investigación de la Dra. Verfaillie <sup>89, 92-95</sup>, que poseen capacidad de diferenciación *in vitro* hacia tipos celulares derivados de las tres líneas embrionarias. Otro tipo de célula madre que está presente en la MO adulta es el denominado hemangioblasto (célula que previamente se creía limitada a etapas precoces del desarrollo embrionario), con capacidad de diferenciación tanto a línea hematopoyética como endotelial <sup>96-99</sup>.

Diversos autores han descrito otros tipos celulares en la médula ósea, y dependiendo del método y/o características de los mismos los han denominado de distinta forma. Así, podrían existir en la MO las llamadas células MIAMI (del inglés “human marrow isolated adult multilineage inducible cells”) o las células VSEL (del inglés “very small embryonic-like stem cells”).

Finalmente, junto a éstas, existen otras células madre más restringidas en su capacidad de diferenciación y descritas con anterioridad, como las células progenitoras hematopoyéticas (CPH), y las células stem mesenquimales (CSM), sobre las que profundizaremos en el presente trabajo.

Las CPH son las encargadas de la regeneración del tejido hematopoyético y por tanto de mantener la producción celular durante toda la vida del individuo para cubrir el recambio celular que se produce continuamente

Las MSC fueron estudiadas por primera vez por Friedestein y col. denominándolas entonces CFU-F (unidad formadora de colonias fibroblásticas)<sup>100</sup>.

El interés por estas células ha ido creciendo debido a las posibles funciones que pueden desarrollar gracias a su papel, como células progenitoras del estroma medular en el soporte de la hematopoyesis y también por su actividad inmunoreguladora<sup>101</sup>. Se ha demostrado también la multipotencialidad de dichas células, la posibilidad de diferenciarse hacia distintas estirpes celulares y su papel en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (CPH). La interacción entre las células del estroma y las CPH es fundamental para mantener una hematopoyesis eficaz<sup>102-105</sup>.

#### **1.3.1.2. Células progenitoras hematopoyéticas**

La presencia de estas células se demostró tanto en cultivos *in vitro* como en modelos experimentales animales *in vivo* al realizar trasplantes hematopoyéticos en animales irradiados. Estos trasplantes conseguían regenerar la hematopoyesis lo que demostraba la presencia de alguna célula capaz de diferenciarse hacia cualquier línea hematopoyética<sup>106-110</sup>. Actualmente la forma más habitual de reconocerla es mediante la caracterización de marcadores por citometría de flujo; aunque no existe ningún marcador específico definido, es el CD34 el marcador más usado para identificarlas, porque la cuantificación de CD34 en los productos celulares para trasplante hematopoyético tiene interés clínico<sup>103-105</sup>.

#### **1.3.1.3. Células progenitoras mesenquimales**

Los estudios de Friedestein et al<sup>111-115</sup> sirvieron para la identificación de esta población celular por su capacidad para formar colonias de aspecto fibroblástico *in vitro* además de cuantificar su presencia entre las células mononucleadas (CMN) de la MO (1 por cada  $10^4$ - $10^5$  CMN). Además se demostró su capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares y para generar el microambiente hematopoyético<sup>116-120</sup>.

### **Caracterización de las MSCs**

A la hora de identificarlas, en cultivo estas células suponen una población heterogénea de células de aspecto fibroblástico y morfología fusiforme <sup>109</sup>.

Ahora bien, los datos existentes sobre su caracterización indican que estas células comparten características inmunofenotípicas con células endoteliales, epiteliales y musculares <sup>121-130</sup>. Además carecen de marcadores específicos de otros tipos celulares presentes en MO o en sangre periférica (SP), como son: CD14 (monocitos), CD34 (célula “stem” hematopoyética), CD45 (marcador panleucocitario) o CD19 (linfocitos B) <sup>89, 124-128, 130</sup>.

En la actualidad no se conoce ningún marcador específico que defina a las MSC. Por este motivo, y para evitar la dificultad a la hora de comparar diferentes trabajos sobre las MSC, la sociedad internacional de terapia celular (ISCT, del inglés “International Society for Cellular Therapy”) propone unos criterios mínimos para definir una MSC <sup>131</sup>. Estos criterios son:

1. Las MSC deben tener capacidad de adherencia al plástico cuando se mantienen en condiciones estándar de cultivo.
2. Deben expresar determinados marcadores (CD105, CD73 y CD 90) y no expresar otros marcadores específicos de diversas líneas hematopoyéticas como CD45 (panleucocitario), CD34 (células progenitoras hematopoyéticas), CD14 o CD11b (monocitos), CD79alfa o CD19 (linfocitos B) ni tampoco expresar moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad mayor (HLA-DR).
3. Las MSC deben mostrar capacidad de diferenciarse *in vitro* hacia osteoblasto, adipocito y condroblasto

Otra característica interesante de las MSC es la capacidad para secretar múltiples citocinas ya sea en reposo o tras estimulación. Estas citocinas incluyen tanto factores de crecimiento hematopoyético como no hematopoyético y sugieren que las MSC están implicadas en el desarrollo del estroma medular, y por tanto de las propias células mesenquimales por mecanismos autocrinos.

Además, se ha demostrado también la presencia de receptores para citocinas y factores de crecimiento. La interacción entre los distintos factores y sus receptores hace pensar que las MSC están implicadas de forma dinámica en el mantenimiento del micro ambiente celular <sup>128, 132</sup>.

### **Potencial de diferenciación**

En los primeros estudios sobre células mesenquimales se estudió la capacidad de éstas para diferenciarse únicamente hacia células del tejido al cual pertenecían. Sin embargo estudios posteriores han ido demostrando su capacidad de diferenciación hacia múltiples líneas <sup>133</sup>.

Una de las formas de identificación de las MSC es su capacidad para diferenciarse “in vitro” hacia hueso, grasa y cartílago <sup>100</sup>. Además, las MSC pueden diferenciarse hacia otros tejidos como tenocitos, miocitos esqueléticos, células del mesodermo, del ectodermo y del endodermo <sup>128, 134, 135</sup>.

A partir de esto se propone la posibilidad de diferenciar entre las células progenitoras mesenquimales, esto es, los precursores del estroma medular con capacidad de diferenciación mesenquimal, y las verdaderas células mesenquimales, con posibilidad de diferenciación hacia distintos tejidos tanto de origen ectodérmico como endodérmico <sup>134</sup>.

De cualquier modo, en algunos casos su capacidad para generar nuevos tejidos depende de la programación de expresión génica mientras que en otros casos depende probablemente de la presencia de ciertos factores solubles <sup>101</sup>.

Como ya hemos dicho, según la sociedad internacional de terapia celular, la diferenciación a adipocito, osteoblasto y condrocito es necesaria para la caracterización de las MSC:

#### **Diferenciación a osteocito**

La diferenciación osteogénica requiere la presencia de  $\beta$ -glicerolfosfato, ácido ascórbico-2-fosfato, dexametasona y suero bovino fetal. La diferenciación se hace evidente al adquirir las células morfología osteoblástica y por la expresión de la actividad de la fosfatasa alcalina, apareciendo incluso depósitos de calcio, que se observan tras la tinción con BCIT-NBT.

#### **Diferenciación a adipocito**

Para estimular la diferenciación hacia adipocito, las MSC deben incubarse con dexametasona, insulina, isobutylmetilxantina, e indometacina. En este caso se ven vacuolas lipídicas dentro de las células y expresan el receptor PPAR $\gamma$ 2, lipoproteinlipasa, y la proteína ácida P2 <sup>128</sup>. Con el tiempo las vacuolas lipídicas se van agrupando y llenando el citoplasma celular. Estos acúmulos de lípidos se estudian histológicamente con oil red O <sup>100</sup>. En distintos estudios se ha tratado de identificar el mecanismo que regula la conversión de las MSC en adipocito. El PPAR $\gamma$ 2, es un activador de la diferenciación hacia adipocito, mientras que actúa negativamente sobre la diferenciación a osteoblasto <sup>136</sup>. Esto hace pensar en una relación recíproca entre la osteogénesis y la

adipogénesis, de forma que la diferenciación por un camino restringe la expresión de genes específicos del otro linaje <sup>137</sup>.

### **Diferenciación a condrocito**

Para la diferenciación cartilaginosa la metodología es algo diferente a las anteriores, puesto que debe realizarse en un tubo Falcon para que se pueda expandir en tres dimensiones. De este modo se mantienen las células sin suero y en presencia de TGF- $\beta$ , hasta que pierden su morfología fibroblástica y comienzan a expresar componentes cartilaginosos específicos.

La presencia de TGF-  $\beta$  siempre se ha considerado necesaria <sup>138-140</sup>, pero estudios recientes <sup>141</sup> con médulas de origen bovino han demostrado que no hay diferencias en los resultados cuando los cultivos se realizan en ausencia de TGF-  $\beta$ .

Además de estos tejidos, el abanico de posibilidades de diferenciación de estas células es muy amplio. Todos los estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, demuestran que la población de células mesenquimales puede diferenciarse hacia distintos linajes. Se conoce como mesengénesis el proceso por el cual se diferencian los distintos tejidos mesenquimales a partir de las MSC. Así durante el estado adulto, los vertebrados conservan la capacidad de reparar sus huesos, cartílagos, tendones, músculos, el propio estroma medular, el tejido adiposo, y cualesquiera otros tejidos conectivos <sup>142</sup>.

### **1.3.2. Las MSCs y el nicho hematopoyético**

La hematopoyesis durante la vida fetal y la diferenciación hacia las células sanguíneas en la vida adulta depende de la existencia de un microambiente que aporta las señales necesarias a través de factores solubles e interacciones celulares. Las células que constituyen este micro ambiente, definidas como el nicho hematopoyético, derivan de un progenitor común de origen mesenquimal <sup>143</sup>.

Atendiendo a la evidencia de que la formación y resorción óseas son necesarias a la hora de establecer el desarrollo hematopoyético, es de prever que los osteoblastos tengan un papel crucial en la hematopoyesis y recientes estudios demuestran que son un factor importante del nicho hematopoyético <sup>144, 145</sup>.

Para la hematopoyesis medular se han definido al menos tres compartimentos especializados: nichos óseos, con los osteoblastos; el estroma medular, con células reticulares, fibroblastos, adipocitos, células endoteliales y macrófagos; y los adipocitos, que constituyen el espacio no hematopoyético dentro de los huesos largos <sup>101</sup>.

### **1.3.2.1. Células endoteliales:**

Podrían estar implicadas en la diferenciación de los adipocitos, puesto que tienen la capacidad de estabilizar la lipoproteinlipasa necesaria para el almacenaje lipídico. Por otro lado su capacidad endocítica hace que se comporten como la más importante barrera para la entrada y salida de agentes químicos y partículas del espacio hematopoyético <sup>146</sup>.

### **1.3.2.2. Células reticulares**

Proporcionan el soporte físico del nicho hematopoyético en tanto que sintetizan las fibras reticulares. La íntima relación entre las células reticulares y hematopoyéticas hace pensar que estas inducen y regulan la hematopoyesis <sup>147</sup>.

### **1.3.2.3. Adipocitos**

Puesto que en la hematopoyesis *in vitro* los adipocitos se sitúan en las áreas de granulopoyesis activa, su presencia se utiliza como marcador de productividad hematopoyética en un cultivo <sup>148, 149</sup>.

### **1.3.2.4. Fibroblastos**

Los fibroblastos constituyen una matriz de apoyo para el desarrollo de células del estroma, puesto que son capaces de mantenerse durante largos periodos de tiempo en cultivos *in vitro*. Su implantación en la cápsula renal induce la formación de estroma óseo y hematopoyesis <sup>150</sup>; Ahora bien, al no mantener la proliferación de la célula madre hematopoyética, no se pueden considerar como componentes funcionales del mismo <sup>147</sup>.

### **1.3.2.5. Macrófagos**

Aunque no tienen su origen en células del estroma, se consideran parte funcional del mismo <sup>146</sup>. Están implicados en la diferenciación granulopoyética, en la maduración de la línea eritroide y en la producción de diversos factores reguladores.

### 1.3.3. Otras fuentes de obtención de MSCs

La posibilidad de obtener MSC de distintas especies y localizaciones ha sido objeto de reciente interés.

Las MSC pueden, por un lado, aislarse de múltiples especies. Las más conocidas son aquellas de origen humano, ratón y rata <sup>128, 151</sup>. Ahora bien, la posibilidad de aislarlas de otras especies tales como babuinos, ovejas, perros, cerdos, vacas y caballos aportan una mejor oportunidad para comprobar sus posibilidades terapéuticas en mamíferos <sup>140, 152-154</sup>.

En cuanto a las localizaciones, como es esperable por su fácil accesibilidad, la fuente mejor estudiada es la médula ósea, aun sabiendo que su presencia en dicho tejido representa solamente 0,01-0,0001% de las células nucleadas de una médula ósea humana. Ahora bien, se han conseguido aislar MSC de recolecciones de células madres de sangre periférica movilizadas <sup>155</sup> (la modalidad de donación de progenitores hematopoyéticos de uso más extendido en la actualidad) <sup>156</sup> de muestras fetales obtenidas durante el primer trimestre de embarazo tanto sanguíneas, como de hígado o médula ósea, pulmón fetal, de las vellosidades coriónicas de la placenta y del fluido amniótico <sup>157-160</sup>. Una pequeña proporción de MSC puede también ser aislada de sangre procedente del cordón umbilical, de sangre periférica del adulto y de mujeres sanas durante el embarazo <sup>161-163</sup>. En este caso parecen ser células de origen fetal que persisten en el organismo durante más de 60 años <sup>101</sup>.

Otros trabajos proponen otros tipos de fuentes tan variadas como pueden ser la grasa, folículos pilosos, tejido del cuero cabelludo, ligamentos periodontales y tejidos prenatales como la placenta, médula ósea fetal, sangre, pulmón, hígado o bazo <sup>159, 164-166</sup>.

## **1.4. Biomateriales en la terapia celular.**

Los biomateriales (BM) son esenciales en la terapia celular ya que son componentes esenciales para formar una matriz de sostén y juegan un papel importante en la regeneración tisular. Se usan en múltiples terapias celulares como sustitutos de la función mecánica y de la matriz extracelular del tejido que se desea regenerar. Constituyen la estructura tridimensional para alojar las células y los factores biológicos que generarán los nuevos tejidos <sup>167, 168</sup>.

### **1.4.1. Principios básicos de los BM**

El BM ideal para la terapia celular sería el que presentara las propiedades de biodegradación y absorción pero sin generar una respuesta inflamatoria que interfiera con la función celular y de los tejidos. Los BM incompatibles generan respuesta inflamatoria y una respuesta de cuerpo extraño que conlleva a su expulsión o necrosis. Los BM deben tener una adecuada integridad mecánica para soportar la formación de tejido <sup>169</sup>.

Estos materiales requieren tres factores en la terapia celular, que son biocompatibilidad, biodegradación y estabilidad estructural y mecánica.

Así, estos materiales permiten la posible localización y permanencia de las stem cells en sitios específicos del cuerpo humano, manteniendo la estructura tridimensional, que permite y dirige la formación de nuevos tejidos con su adecuada función. La estabilidad de los BM depende primariamente de su estructura física, elasticidad, absorción y poder de degradación química.

Una microestructura porosa de los BM es considerada como requisito esencial ya que las células lo necesitan para poder activar los factores de crecimiento, oxigenación y nutrición.

El uso de cada BM debe ser seleccionado según las propiedades del nuevo tejido que se piensa generar.

El mecanismo de biodegradación de los polímeros se produce por una pasiva hidrólisis, y como resultado, se dan metabolitos como ácidos monoméricos. La degradación depende del peso de las moléculas, del grado de cristalización y el volumen del material. Otros factores que influyen en la degradación son de tipo químico, estructural, condiciones de fabricación, sitio de implantación y propiedades físicas entre otras <sup>170</sup>.

Los BM son utilizados en terapia celular como una matriz extracelular artificial que suplen las funciones biológicas, químicas y físicas de la matriz nativa. La producción y proliferación de la matriz extracelular es crucial en la terapia celular y se sabe que ésta afecta a la diferenciación y función celular <sup>171</sup>.



### 1.4.2. Propiedades de los BM

Los BM pueden dividirse dentro de metales, cerámicas, materiales naturales y polímeros sintéticos.

Algunas veces, dos tipos de materiales pueden ser combinados para formar una composición, por ejemplo cerámica o materiales naturales con polímeros sintéticos<sup>172</sup>.

En la Tabla 1 se presentan diferentes productos que se usan como BM. Los materiales de la tabla han mostrado una gran biocompatibilidad que es esencial en la terapia celular. Los materiales sintéticos y naturales tienen unas propiedades adecuadas y otras no tanto para la formación de la matriz extracelular que se resume en la Tabla 2<sup>173, 174</sup>.

El colágeno es la proteína más abundante en el cuerpo y ha sido utilizado en muchas aplicaciones de la terapia celular. El colágeno contiene dominios de adhesión celular, que sirven para la interacción celular, es biocompatible y presenta mínima respuesta inflamatoria y antigénica, degradándose por lisosomas<sup>175</sup>.

El alginato es otro BM comúnmente usado, está compuesto por polisacáridos, es biocompatible y aprobado por la FDA, a diferencia del colágeno no presenta dominios reconocedores y el grado de la estructura mecánica es limitado, presumiblemente se debe a la menor cantidad de iones.

Las queratinas extraídas desde las fibras del cabello humano han llegado a ser un prometedor BM para la terapia celular por cuatro razones<sup>176</sup>:

- Gran biocompatibilidad
- Fácil extracción como solución.
- Contiene sitios de reconocimiento molecular donde se integran las células
- Los BM derivados de las queratinas han sido investigados como aplicaciones médicas como fármacos, ingeniería tisular, piel sintética e implantes cocleares.

Las matrices derivadas desde la submucosa intestinal porcina (SIS) y de la vejiga (BSM) han sido usadas en muchas aplicaciones incluidas la formación de tejido de vejiga, fascias, uretra, vasos, cartílagos y huesos<sup>172</sup>.

Estos materiales han mostrado ser biocompatibles y poseen habilidad para inducir la proliferación celular.

Los polímeros sintéticos son atractivos por sus características de degradación y su consistencia en la producción. Por el contrario, sus productos de degradación causan efectos adversos o alteran el microambiente local.

Tabla 1: BM usados en la terapia celular

<b>Materiales naturales</b>		<b>Polímeros sintéticos</b>
<b><i>Polímeros</i></b>	<b><i>Matriz de tejidos</i></b>	
<b><u>Proteínas:</u></b>		Poliésteres:PGA,PLA, PLGA, PHB, PHV, PCL, PDO
Colágeno Albúmina	Venas	
Fibrina Gelatina	Dermis acelular	Polianhidrones
Celulosa Elastina	Válvulas cardiacas	Polifosfatos
queratina Polipéptidos	Nervios periféricos	Poliuretanos biodegradable
<b><u>Polisacáridos:</u></b>	Epitelio amniótico	Hidrogeles
Alginato Dextrans	Tendón	Propilénfumarato
Agarosa	Hígado	
<b><u>Glucosaminoglicanos</u></b>	SIS	
Hialuronidasa Condroitin	BSM	
Dermatan Heparan		
Heparina Keratan		

Los BM más usados en terapia celular son el PGA, PLA y copolímeros. Estos productos están ganando popularidad por su consistencia de fabricación, adecuadas propiedades mecánicas y biodegradación. Estos materiales se están usando en suturas y en fármacos. El poliuretano es uno de los polímeros más usados como BM en biomedicina por su durabilidad, elasticidad, resistencia, compliance y tolerancia <sup>177</sup>.

Tabla 2: Ventajas y desventajas de los BM.

<b>Biomateriales</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
<b>Polímeros sintéticos</b>	Fácil producción Biodegradación controlable Libre de patógenos Posible incorporación de moléculas bioactivas	Menor biocompatibilidad Productos de degradación.
<b>Polímeros naturales</b>	Biocompatibilidad Posible incorporación de moléculas bioactivas Matriz similar a la natural	Difícil control de la biodegradación Pobre estabilidad mecánica Sensible a temperatura Posible transmisión de patógenos
<b>Matriz de tejidos</b>	Propiedades mecánicas apropiadas Composición y estructura similar a tejidos nativos	Respuesta inmune Dificultad de penetrar las células Trasmisión de patógenos
<b>Materiales compuestos</b>	Efectos sinérgicos Control de la composición	Limitado proceso de fabricación Pobre interacción de la interfase.

### 1.4.3. Tecnología en la fabricación de los BM

Los BM usados para la terapia celular requieren diferentes configuraciones dependiendo del resultado que se desea para generar cada tipo tisular.

El principal objetivo de la terapia celular es reparar y reemplazar el daño tisular y restituir su función. El sistema de inyección celular ha sufrido muchos avances, es un proceso simple y no producen lesión tisular con su aplicación pero su uso es limitado donde no se puede inyectar. Para inyectar los BM se hacen de forma líquida, de gel o de hidrogeles. Para adecuar la función tisular

del huésped a la de los BM, se utiliza la biotecnología que modifica la superficie de estos materiales tanto química como físicamente aumentando así su biocompatibilidad. Los procedimientos químicos como la oxidación, hidrólisis y queratinización cambian la superficie química y modifica la función de los BM <sup>178, 179</sup>.

La adición de moléculas bioactivas como enzimas, proteínas, secuencias peptídicas y antibióticos añaden funciones a los materiales. Modificar la superficie de los BM consigue aumentar la especificidad de afinidad y el control de la motilidad. Moléculas bioactivas como citocinas y factores de crecimiento son potentes reguladores de la función biológica, como es la migración, proliferación y diferenciación celular. Incorporar estas moléculas dentro de los BM es otro de los avances de la terapia celular <sup>180</sup>.

El BM ideal sería un sinérgico entre un componente con propiedades mecánicas y el otro con compatibilidad biológica y fisiológica. Por ejemplo los BM naturales poseen microestructuras que contienen química y estructuralmente completamente definidos. Combinar este material con otro sintético, ofrecerá tanto las ventajas de uno, como las del otro. Los BM pretenden simular la matriz extracelular, por eso es muy importante conocer la estructura primaria de la matriz extracelular nativa.

#### 1.4.4. Biomateriales para la terapia celular

Varios materiales han sido usados para la aplicación de la terapia celular en el campo de la traumatología en forma de inyección o implantes que se resumen en la Tabla 3

Tabla 3 : BM para la terapia celular

<b>Tejido</b>	<b>Células somáticas humanas</b>	<b>Biomateriales</b>
<b>Cartílago</b>	Células mesenquimales derivadas de la médula ósea  Condrocitos articulares	PLA  Silk fibroin
<b>Hueso</b>	Células mesenquimales derivadas de la médula ósea	Matriz ósea desmineralizada  BSM y PLGA

Una de las recientes aplicaciones de la terapia celular, ha sido usando células del cartílago suspendidas en alginato cálcico para el tratamiento del reflujo e incontinencia vesicoureteral <sup>181</sup>.

Otra aplicación de las células derivadas del cartílago es para reparar el cartílago articular dañado. Esta satisfactoria aplicación requiere células capaces de diferenciarse en cartílago, que se consigue con la aplicación de factores bioquímicos y una estructura tridimensional porosa, que es aportada por los BM, capaces de generar un medio para el crecimiento de los condrocitos y la formación de la nueva matriz extracelular <sup>182</sup>.

Numerosos BM han sido usados para la regeneración de tejido óseo dentro de la clínica, los que más prometen en este campo son el uso de BM híbridos que generan unas condiciones ideales para la formación rápida de hueso.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## 2. Hipótesis

- La combinación de un hidrogel proteico y células madre mesenquimales humanas podría ser de utilidad para la reparación de un defecto osteocondral en la rodilla de un conejo.

## 3. Objetivos

Para responder a la hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos.

### ***3.1. General:***

- Evaluar de forma comparativa la eficacia de la ingeniería tisular con un hidrogel proteico y células madre mesenquimales humanas en el tratamiento de un defecto osteocondral en un modelo de xenotransplante en el conejo.

### ***3.2. Específicos:***

- Estudiar la viabilidad del hidrogel como soporte para la terapia celular con células mesenquimales.
- Evaluar los resultados radiológicos, comparando las rodillas tratadas con células madre mesenquimales humanas y sin ellas.
- Evaluar los resultados histológicos, comparando las rodillas tratadas con células madre mesenquimales humanas y sin ellas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **4. Material y métodos:**

El experimento consistió en incorporar un hidrogel de última generación junto con células mesenquimales humanas, en un defecto osteocondral realizado en un modelo animal. Analizando posteriormente mediante estudio radiológico e histológico la capacidad de esta técnica en la regeneración tisular.

### ***4.1. Obtención de las células mesenquimales.***

#### **4.1.1. Pacientes**

Todos los procedimientos se hicieron bajo aprobación del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario de Salamanca y de acuerdo con la Declaración de Helsinki de 1975, revisada en 2000, y con la obtención del consentimiento informado de cada paciente incluido en el estudio.

Durante la intervención de cirugía espinal a la que fueron sometidos los pacientes se extrajeron 5 ml de médula ósea mediante aspirado de la cresta ilíaca para la obtención posterior de las células mesenquimales.

#### **4.1.2. Proceso del aspirado de cresta ilíaca**

La extracción de la médula ósea (MO) humana (aproximadamente 5 mL) se realizó en todos los casos, bajo anestesia general, durante la cirugía espinal de pacientes sanos sometidos a una artrodesis vertebral, en los cuales de forma habitual se toma un aspirado de la cresta iliaca posterosuperior para su mezcla con un carrier y autoinjerto para obtener la fusión.

Todas las intervenciones se realizaron en el Servicio de Traumatología del Hospital Universitario de Salamanca.

Se utilizaron tubos estériles (Venoject; TerumetID) a los que se añadió heparina libre de aditivos (Heparina 5000U/ml; Seromed Biochrom KG), reconstituida con agua destilada (Vitulia estéril; Laboratorios ERN, Sal), para su transporte al laboratorio de Terapia Celular del Hospital Universitario de Salamanca.

#### **4.1.3. Separación de las células mononucleadas**

Tras aspirar la MO primero en jeringa con una aguja de 25G y después con otra aguja de 18G para asegurar la ausencia de coágulos y restos de fibrina de la muestra, se procedió a la separación de las células mononucleadas (CMN) mediante centrifugación en gradiente de densidad.

Para ello se diluyó la muestra en medio Hanks (Gibco, Invitrogen) hasta tener un volumen de 12 mL y se homogeneizó. Esta dilución se añadió a dos tubos a los que previamente se había añadido 4mL de Ficoll-Hypaque (Biochrom KG, Berlín, Alemania) y se centrifugó a 1500 rpm durante 30 minutos. Tras recuperar las CMN de la interfase se realizaron dos lavados con Hanks (10 minutos a 1200 rpm), y se resuspendió el botón celular en 1 mL de DMEM (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido), procediéndose al recuento celular en una cámara de Neubauer. (Figura 1)

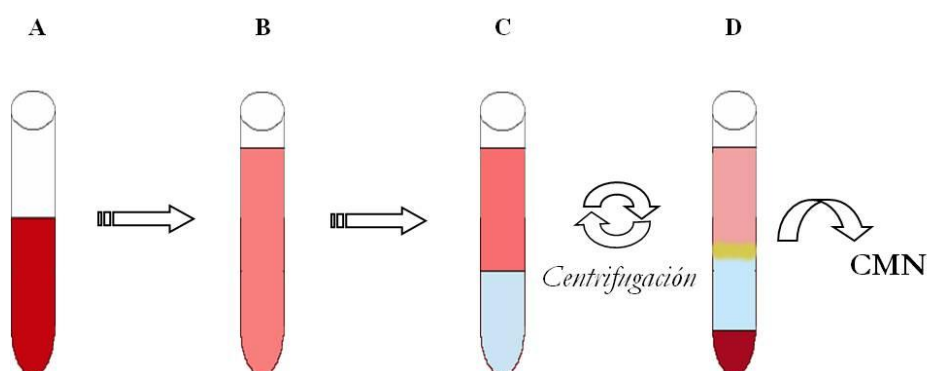


Figura 1: Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad. A) Muestra MO. B) Dilución de la muestra con Hanks. C) Muestra diluida sobre Ficoll. D) Interfase en la que están presentes las CMN.

#### 4.1.4. Aislamiento y expansión

Las CMN se plantaron a una concentración de  $10^6$  CMN/cm<sup>2</sup> en una placa de cultivo que contenía DMEM con 10% de suero bovino fetal (SBF; Bio Whittaker, Bélgica) y 1 % de penicilina-estreptomina, y se incubaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO<sup>2</sup>. El medio se recambió 2 veces por semana. (Figura 2)

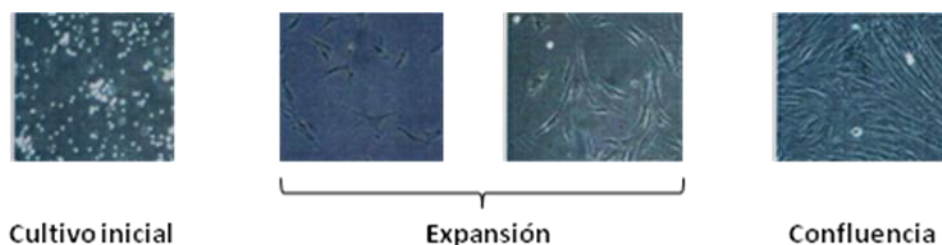


Figura 2: Aislamiento y expansión.

Tras alcanzar las células adherentes una confluencia mayor del 80% de la superficie de la placa de cultivo, se procedió a subcultivar nuevamente las células a una menor concentración en nuevas placas de cultivo.

Este procedimiento se denomina "pase". Para realizar el pase del cultivo, se retiró el medio de expansión, se lavó con PBS y posteriormente se añadió la tripsina (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido) dejándola actuar de 6 a 8 minutos en el incubador a 37°C. A continuación se añadió medio con DMEM y 10% de SBF para neutralizar la acción tóxica de la tripsina, se recogió la suspensión celular obtenida y se centrifugó durante 10 minutos a 1200 rpm, decantándose el sobrenadante, y procediendo a contar las células resultantes, para proceder a replantar, esta vez (y también en pases sucesivos) a una concentración de  $2.5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. En todos los casos, las MSC se expandieron hasta el tercer pase antes de proceder a los estudios inmunofenotípicos y de diferenciación multilineal, y a los estudios experimentales en el modelo animal, pues en este momento la pureza del cultivo de MSC supera el 98%, pues las células hematopoyéticas residuales se han ido retirando con los sucesivos recambios del medio de expansión.

#### **4.1.5. Caracterización inmunofenotípica**

Tras el tercer pase, para la caracterización inmunofenotípica en el citómetro de flujo de las muestras obtenidas, los cultivos se tripsinizaron y se resuspendieron en PBS para el posterior marcaje con los anticuerpos monoclonales conjugados con los siguientes fluorocromos (Tabla 4) de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), ficoeritrina-cianina-5(PCy5) y clorofil peridina (PerCP) o aloficocianina (APC) según las siguientes combinaciones:

- CD90-FITC / CD73-PE / CD45-PCy5 / CD34-APC
- CD105-FITC / CD166-PE / HLAOR-PerCP / CD19-APC
- CD14-FITC / CD106-PE / CD45-PCy5
- Control isotópico

Todos los anticuerpos monoclonales empleados se obtuvieron de BOB (San José, Estados Unidos), salvo el C0105-FITC, que se adquirió a InmunoStep (Salamanca, España). Tras incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos en oscuridad, se retiró el exceso de anticuerpo mediante lavado con PBS. El botón obtenido fue resuspendido en 0.5ml de PBS, y la muestra fue adquirida en un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences) que emite a una longitud de onda de 488nm, adecuadamente calibrado y compensado específicamente para el estudio de las MSC.

Tabla 4: Anticuerpos monoclonales utilizados para el estudio del inmunofenotipo de las células mesenquimales

	FLUOROCROMO	CLON	ISOTIPO	CANTIDAD /10 <sup>6</sup>
CD14	FITC	M5E2	Mouse IgG <sub>2b</sub> , K	10 IJL
CD90	FITC	5E10	Mouse IgG <sub>1</sub> , K	2IJL
CD105	FITC	2H6F11	Mouse IgG <sub>1</sub> ,	10 IJL
CD73	PE	AD2	Mouse IgG <sub>1</sub> , K	10 IJL
CD106	PE	51-10C9	Mouse IgG <sub>1</sub> , K	10 IJL
CD166	PE	3A6	Mouse IgG <sub>1</sub> , K	10 IJL
CD45	PE-Cy5	HI30	Mouse IgG <sub>1</sub> , K	10 IJL
HLA-DR	PerCP Cy5.5	L243	Mouse IgG <sub>23</sub> , K	10 IJL
CD19	APC	HIB19	Mouse IgG <sub>1</sub> , K	3IJL
CD34	APC	581	Mouse IgG <sub>1</sub> , K	3 IJL

Se adquirieron al menos 10<sup>5</sup> células por cada muestra. La adquisición se realizó utilizando el programa CellQuest y el análisis empleando el programa Paint-a-Gate Pro, ambos de Becton Dickinson Biosciences :BDB). Para cada antígeno se calculó el cociente entre de la intensidad media de fluorescencia (MFI, del inglés "Mean Fluorescence Intensitylt) para ese antígeno y la intensidad del control isotópico correspondiente.

#### 4.1.6. Diferenciación multilineal de las MSC.

Con el objetivo de demostrar la capacidad de diferenciación de las MSC del aspirado medular en cresta ilíaca se indujo su diferenciación in vitro hacia condrocito, osteocito y adipocito según los métodos previamente descritos, que se resumen a continuación.

De cada muestra se sembraron 4 placas de cultivo de 9,6 cm<sup>2</sup> de superficie de tipo "slide fiask" (Nunc, Dinamarca), a razón de 5x10<sup>3</sup> células/ cm<sup>2</sup> incubándose hasta obtener una confluencia del 80%. De estas 4 placas, 2 se usaron para la diferenciación adipocito y 2 para la de osteocito.

En el caso de la diferenciación a osteocito se incubaron con medio de diferenciación específico (NH Osteodiff Medium, Miltenyi Biotec, Alemania), recambiando el medio cada 3-4 días. Transcurridos 10 días se lavaron los cultivos con PBS y se fijaron con una solución de etanol frío al 70% durante 10 minutos. Tras lavarlas con PBS, se incubaron durante 20-30 minutos con 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato nitro azul de tetrazolio (BCIPNBT, Sigma-Aldrich) en agitación. Para mejorar la visualización se contrastaron con 1 mL de hematoxilina durante 2 minutos.

Para la diferenciación a adipocito, las muestras se incubaron con medio de diferenciación NH Adipodiff Medium (Miltenyi Biotec, Alemania), en las mismas condiciones (37°C y 5% CO<sub>2</sub>) durante 21 días. Para la tinción con oil-red-o, se retiró el medio de diferenciación y se fijaron las muestras con formaldehído al 3.7% durante 2 minutos. Después se añadió 1ml de solución de oil-red-o (Merck, Darmstadt, Alemania), y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación lenta.

En ambos casos se mantuvo una "slide flask" con MSC únicamente con medio de expansión (DMEM con 10% SBF) y sin medio de diferenciación específico en las mismas condiciones, que sirvió de control negativo de la diferenciación a osteoblasto y adipocito. Todas las muestras se lavaron y prepararon para su visualización en el microscopio óptico. En este caso utilizamos un microscopio Olympus BX41 utilizando el programa Micro DP70 controller and manager software pack (Olympus Optical, Barcelona, España).

Para la diferenciación condrogénica,  $5 \times 10^5$  células en pase 3 se centrifugaron en un tubo Falcon cónico de polipropileno de 15 mL (BOB). El botón obtenido se cultivó a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en 500 microlitros de medio de diferenciación condrogénico (NH Chondrodif Medium, Miltenyi Biotec, Alemania), siguiendo el protocolo correspondiente que acompaña al producto. El medio se cambió cada 3-4 días y tras 21 días de cultivo los botones celulares se incluyeron en parafina, para ser cortados en secciones de 5 mm de grosor. Para el análisis de los cortes, éstos se marcaron con anticuerpos monoclonales de ratón anti-colágeno tipo II humano (Chemicon International, Alemania) seguido de incubación con anticuerpos conjugados conCy2 (Jackson Immunoresearch Europe. Ud., Suffolk, Reino Unido). El análisis de la muestra se realizó en un microscopio de fluorescencia Olympus Provis equipado con epifluorescencia y con los filtros correspondientes (Olympus Europe GmbH, Hamburg, Alemania). Las imágenes se tomaron con una cámara digital Olympus Optical CO, GmbH, Hamburg, Alemania), adaptada al ordenador utilizando como soporte informático el programa OP Controller v.1.2.1.108 and the OP Manager v.1.2.1.107 software (Olympus Optical CO., GmbH, Hamburg, Alemania).

Posteriormente las células madre sin diferenciación fueron mezcladas simplemente con el hidrogel proteico, que se describe a continuación.

## 4.2. Obtención, preparación y diseño del hidrogel proteico

El hidrogel fue fabricado y proporcionado por el grupo BIOFORGE de la Universidad de Valladolid.

BIOFORGE es un grupo de investigación de la Universidad de Valladolid que trabaja en el desarrollo de hidrogeles multifuncionales, termogelificables y multibioactivos basados en polímeros proteicos recombinantes tipo elastina (rELPs) entrecruzados, que son diseñados conteniendo secuencias de adhesión específicas de células mesenquimales y de endotelio.

Los hidrogeles desarrollados por BIOFORGE se caracterizan por ser extremadamente biocompatibles, termogelificables y por lo tanto inyectables (con posibilidad de cambiar la temperatura de gelificación al modificar la arquitectura molecular), y por presentar capacidad para promover la adhesión celular a través de la inclusión de dominios específicos.

### 4.2.1. Diseño de las arquitecturas moleculares de los rELPs que formarán el biogel:

El biogel utilizado estará formado por dos rELPs que poseen la siguiente arquitectura molecular:



Figura 3: Esquema de la composición del hidrogel.

Se trata de dos pentabloques constituidos por dos bloques polares, dos apolares y un bloque final que contiene la secuencia de adhesión celular. Ambos polímeros se diferencian precisamente en el bloque final portador del dominio de adhesión celular: el primer rELP portará la secuencia RGD para células mesenquimales y el segundo REDV para células de endotelio.

El bloque apolar será responsable de la gelificación física del sistema por encima de su temperatura de transición, el bloque polar será responsable de mantener la estructura de gel hidratada y el bloque que contiene la secuencia

de adhesión celular será una variación del bloque polar pero conteniendo los dominios RGD y REDV. (Figura 3)

#### **4.2.2. Construcción del gen que codifica cada uno de los ELPs previamente diseñado:**

Los rELPs propuestos en este proyecto tienen estructura mutibloque, de manera que gran parte de los bloques son comunes a ambos rELPs. Por este motivo se va a llevar a cabo un diseño modular en la construcción del gen, de manera que los diferentes bloques pueden ser producidos independientemente a nivel de gen y finalmente ser fusionados para obtener el gen que codifica la molécula final.

Los genes codificantes de los bloques que constituyen los rELPs serán contruidos por repetición de un monómero formado por la secuencia nucleotídica correspondiente al péptido monomérico diseñado previamente. Esta secuencia se creará por amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de dos cebadores que presenten sus 20 bases del extremo 3' cohesivas. La longitud y secuencia de los cebadores serán dictadas por la composición aminoacídica necesaria mientras que la elección de los codones se hará en base a las tablas publicadas de frecuencia de utilización de codones por la bacteria *Escherichia coli*.

Una vez que los bloques están listos pueden ser combinados fácilmente para obtener el gen del rELP final.

#### **4.2.3. Expresión de los ELPs:**

Una vez seleccionada la cepa de expresión más adecuada, se estudiarán las condiciones óptimas de crecimiento celular y de la expresión de los polímeros para aumentar la producción final. El crecimiento bacteriano se realizará en un fermentador del tamaño adecuado para que la producción se dimensione a las necesidades y requerimientos de cada polímero.

#### **4.2.4. Purificación de los ELPs:**

La purificación de los rELPs resulta ser la etapa más crítica del proceso de producción. Sin embargo, gracias a la solubilidad y al comportamiento inteligente de estos polímeros (respuesta a variaciones de temperatura) se pueden diseñar protocolos de purificación de los mismos mediante simples ciclos de inversión de la temperatura de trabajo (Inverse Temperature Cycling – ITC): el ELP es soluble por debajo de una determinada temperatura e insoluble por encima de la misma, siendo esta transición completamente reversible.

#### **4.2.5. Caracterización de los ELPs:**

Se llevará a cabo la caracterización química de los rELPs con el fin de determinar si la estructura molecular obtenida coincide o no con la diseñada inicialmente (MALDI-TOF y electroforesis), así como la caracterización física del gel (medida de la temperatura de transición mediante DSC, de las propiedades mecánicas mediante reología) (Figura 4)



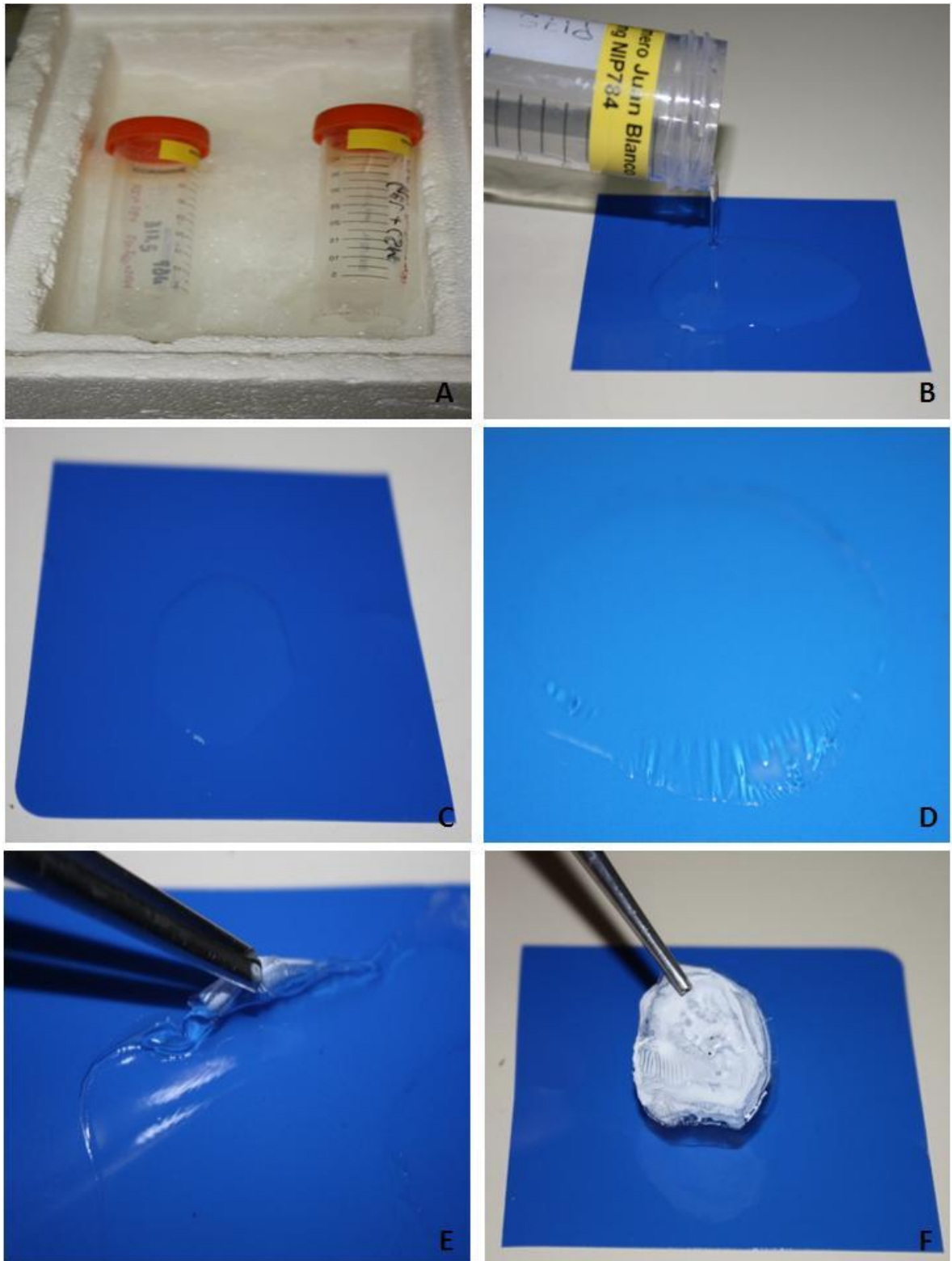


Figura 4: A Muestras del gel con células y sin ellas; B: Vertiendo el gel líquido; C-F: Solidificación del gel con el aumento de la temperatura.

### **4.3. Modelo animal.**

Fueron intervenidos 6 conejos New Zealand machos de 6 meses de edad, bajo las condiciones que indican y marcan el manejo del animal de experimentación, manteniéndose una cuarentena en el animalario del Edificio Departamental de la Universidad de Salamanca previa a la cirugía.

Se intervinieron ambas patas traseras de cada conejo, insertándose en las derechas el biogel junto con células mesenquimales y en las izquierdas solamente el biogel sin células (grupo control).

Previamente a la aplicación de la anestesia general fue pesado cada espécimen, siendo los pesos respectivamente de 3500, 3700, 3050, 3400, 3725 y 3330 gramos.

Se inyectó en el músculo biceps femoris una mezcla de Xilacina 5mg/Kg (Rompun® 2%, 25ml) y Ketamina 35mg/Kg (Ketolar® 50 mg/ml) según el peso de cada conejo, mediante una jeringa de 10ml (Braun, Omnifix®) y una aguja intramuscular (BD Microlance® 0,8x40 mm, 21 G)

Una vez anestesiado cada conejo, se procedió al lavado con clorexidina al 4% y rasurado de la zona quirúrgica de la rodilla de cada pata. Se preparó un campo quirúrgico con todos los elementos necesarios para cumplir con las medidas de asepsia reglamentarias de todo procedimiento quirúrgico.

La vía de abordaje consistió en una incisión en la cara anterior de la rodilla de las patas traseras de unos 3-4cm, realizada con un bisturí del número 24 (B Braun®), disección longitudinal entre el vastus medialis y el tendón del cuádriceps, seccionando los alerones mediales parapatelares, luxándose la rótula hacia externo y exponiéndose los condilos femorales.

Se practicó una lesión osteocondral, no reparable por sí sola, mediante una fresa de 4mm x 4 mm con un minimotor, la lesión en profundidad alcanzó en cada caso el hueso subcondral.

Cada lesión se trató con  $0.5 \times 10^6$  MSC diluidas en 2 mL de biogel con una jeringa de 5ml (Braun, Omnifix®) y una aguja de 19G (BD Microlance® 1,1x25mm). En el grupo de tratamiento se insertó el hidrogel con las MSC y en el grupo control únicamente el biogel. Se esperó antes del cierre del abordaje 5 minutos, para que el gel consiguiera la consistencia adecuada para su fijación, al adquirir la temperatura corporal del mamífero.

El cierre se practicó en dos planos, el primer plano cerrando la artrotomía con seda y aguja triangular (Ethicon®, 0/75 cm), y el segundo plano, cerrando la piel y tejido celular subcutáneo con grapas.

Se aplicó una dosis profiláctica para infecciones de Gentamicina 25mg/Kg (Genta- Gobens® 2ml/80 mg). Posteriormente los conejos fueron debultos a sus jaulas, monitorizándose en el postoperatorio inmediato, signos de dolor, infección o alteraciones en el comportamiento.

A los tres meses del tratamiento se procedió al sacrificio de los animales mediante inyección intravenosa de pentobarbital 120mg/kg (Penta- Hypnol®) . Las muestras para el análisis histológico y radiológico se obtuvo mediante desarticulación quirúrgica de ambos extremos distales del fémur el tratado, derecho y el control izquierdo para su comparación. (Figura 5)



Figura 5: A Conejo New Zealand; B Preparación del campo quirúrgico; C, D: Vía de abordaje; E, F: Creación del defecto osteocondral; G,H Implantación del injerto; I, J: Cierre de la vía; K Amputación de las patas; L RMN de las muestras.

#### **4.4. Análisis radiológico**

Las muestras fueron sometidas inmediatamente tras el sacrificio a dos pruebas de imágenes. El técnico radiológico y el radiólogo desconocían la distribución de las stem cells en las muestras.

##### Resonancia magnética nuclear:

Modelo: Signa LX Versión 9.1. General Electric. 1,5 Teslas

Secuencias realizadas:

- Oblique 3D FSPGR Special: Eco 1/1, angulación 10, TR 113, espesor (mm): 1.0, TE 2.5, espacio (mm):-0.5, diámetro de reconstrucción 10x10, matriz: 256x160, TI 30.0, Nex 4.
- Oblique DP: Eco 1/1, angulación 90, TR 2900, espesor (mm) 1.5, TE 11.3, espacio (mm) 0.1, diámetro de reconstrucción 10x10, matriz 256x192, Nex 4.

##### Tomografía axial computarizada:

Modelo: TAC Helicoidal multicorte 16 AQUILLON. Toshiba.

Secuencias realizadas:

- Secciones axiales de 0,5 mm de grosor e intervalo de reconstrucción de 0,5 mm en ventana de ósea.
- Reconstrucciones multiplanares en planos sagitales, coronales y 3D.

## **4.5. Análisis histológico**

### **4.5.1. Análisis macroscópico**

El análisis macroscópico se realizó tras una correcta disección de los cóndilos femorales de cada conejos, tanto en la pata caso como en la control, siendo analizadas por un observador, no conocedor del lugar de implantación de las MSCs.

### **4.5.2. Análisis microscópico**

#### **4.5.2.1. Obtención de la muestra y fijación**

La fijación debe realizarse lo más rápidamente posible y consiste en la inmersión en formol 4% y ácido pícrico 0,2% en tampón fosfato 0,1M pH7,3. Tanto la fijación como los siguientes pasos de deshidratación e infiltración deben realizarse a 4° C.

#### **4.5.2.2. Deshidratación**

La deshidratación se realiza en series de alcohol etílico de gradación creciente. Es posible que la deshidratación represente el punto crítico del procesado de las muestras calcificadas ya que, aunque se ha señalado que la polimerización es la fase en la que el histólogo puede realizar un menor control, es el nivel de deshidratación de la muestra el que permitirá una polimerización de mejor calidad debido al carácter marcadamente hidrófobo que presenta el Metil Metacrilato.

La deshidratación se lleva a cabo a 4° C y previamente debe conseguirse un ligero vacío en los viales; a excepción del aclarado con xileno, cuyo punto de inflamación es de 24 ° C, con el fin de evitar posibles riesgos. A su vez, se debe atemperar los recipientes antes de cambiar las muestras de solución.

### **Procedimiento**

- Alcohol etílico 70%, 2 baños de 1-2 días.
- Alcohol etílico 95%, 3 baños de 2 días.
- Alcohol etílico absoluto, 1 día.
- Alcohol etílico absoluto, 2 baños de 1 día.
- Xileno, 2 baños de 1 día.

Los tiempos de deshidratación pueden reducirse en gran medida mediante la utilización de procesadores automáticos de tejidos que combinan ciclos de vacío y de presión.

### **4.5.2.3. Infiltración**

La infiltración consiste en sumergir las muestras en soluciones de Metil Metacrilato (monómero), dibutil-ftalato (plastificador) y concentraciones crecientes de peróxido de benzoilo (iniciador) hasta una solución final idéntica a la solución de polimerización. Esta fase es la más laboriosa de todo el proceso y debe realizarse en campana de gases, habida cuenta de que todos los reactivos que intervienen son tóxicos por inhalación y contacto y, además, el peróxido de benzoilo es explosivo a temperaturas superiores a 70° C. Algunos autores aconsejan la sustitución del peróxido de benzoilo por el bis-(4-terbutilciclohexil)-peroxidicarbonato aunque los resultados no son comparables al realizar la fijación en una solución al 4% de formol tamponado 0.1M.

#### **Desestabilización del Metil Metacrilato**

El metil-metacrilato comercial (Aldrich química) se encuentra estabilizado con 10 ppm de hidroquinona-monometil-éter para evitar la polimerización espontánea durante el transporte. La literatura no refleja de manera clara la necesidad de desestabilizar el monómero, aunque ciertos autores eliminan la hidroquinona pero no aportan razones que lo justifiquen, y otros, la mantienen aumentando la concentración de iniciador.

El procedimiento de extracción de la hidroquinona es el siguiente: se lava el monómero estabilizado con hidróxido sódico 5% (p/v) (22) en un embudo de decantación, se agita fuertemente, se deja reposar y se elimina la fracción oscura. Este procedimiento se repite hasta que el efluente sale limpio. El siguiente paso consiste en eliminar los restos de hidróxido sódico, para ello se lava en 100 ml de H<sub>2</sub>O(d), se agita y se elimina el efluente; repitiendo la operación 4-5 veces hasta que el efluente muestre un pH neutro. Posteriormente se deseca el monómero filtrándolo a través de cloruro calcico.

Todas las soluciones que contengan metil-metacrilato deben almacenarse a 4°C. Para evitar que dichas soluciones absorban agua por condensación es necesario que los viales que las contengan se atemperen antes de entrar en contacto directo con el ambiente.

#### **Preparación de las soluciones de infiltración**

Se preparan tres soluciones diferentes de infiltración.

##### *Solución I*

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de  $\alpha$ -terpineno al 1% en Metil Metacrilato.

Agitar continuamente durante 2 horas. El  $\alpha$ -terpineno actúa como atemperador durante la polimerización.

#### *Solución II*

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 1 g de peróxido de benzoilo.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de  $\alpha$ -terpineno al 1% en MMA.

Disolver en primer lugar el metil-metacrilato junto con el peróxido de benzoilo durante una hora y posteriormente añadir el dibutil-ftalato y el  $\alpha$ -terpineno y agitar durante dos horas.

#### *Solución III*

- 75 ml de metil-metacrilato.
- 2,5 g de peróxido de benzoilo.
- 25 ml de dibutil-ftalato.
- 0,5 ml de  $\alpha$ -terpineno al 1% en MMA.

Disolver en primer lugar el metil-metacrilato junto con el peróxido de benzoilo durante una hora y posteriormente añadir el dibutil-ftalato y el  $\alpha$ -terpineno y agitar durante dos horas.

Las soluciones I y II pueden guardarse a 4° C durante una semana, pero la Solución III debe prepararse el mismo día de su utilización.

#### **Procedimiento**

- Solución I, 3 días.
- Solución II, 4 días.
- Solución III, 6 días.

La infiltración debe llevarse a cabo a 4° C y es conveniente mantener una presión de 22 mm Hg en el interior del vial mediante la utilización de una bomba de vacío.



#### 4.5.2.4. Polimerización

La polimerización, al igual que la deshidratación, presenta una serie de inconvenientes que se han intentado paliar introduciendo numerosas modificaciones en la técnica tales como la utilización de moldes pre-enfriados en agua, mezclas de Metil Metacrilato precalentado y baños de agua fría, y variando la concentración de iniciador. Pero numerosas experiencias demuestran que si se realiza una correcta deshidratación, la polimerización tiene lugar de manera controlada atendiendo al siguiente protocolo:

- Previamente se prepara una capa polimerizada en el fondo de un vial de boca ancha de 30 ml vertiendo 5 ml de Solución III recién preparada.
- Se tapa herméticamente para evitar que el O<sub>2</sub> inhiba la polimerización, y se mantiene a temperatura ambiente durante una noche.
- A continuación se coloca el vial en un baño termostataado de agua a 38° C, produciéndose la polimerización en 1-3 días.
- Posteriormente se coloca la muestra previamente infiltrada sobre la capa prepolimerizada del vial, se orienta de manera adecuada y se rellena el molde casi completamente con Solución III reciente.
- Se cierra y se mantiene a temperatura ambiente durante una noche.
- Transcurrido este tiempo se coloca el vial en un baño termostataado de agua a 38° C. La polimerización suele tener lugar a los 2-3 días.
- La muestra una vez incluida se puede almacenar a temperatura ambiente durante mucho tiempo, pero si el espécimen ha sido tratado con diversos fluorocromos (tetraciclinas, verde de calceína, naranja de xilenol, etc.) hay que evitar que sea iluminado de forma directa.

Se aconseja la utilización de envases de vidrio de boca ancha, ya que durante la polimerización se producen corrientes de convección en el medio de inclusión debido al calor generado y este mayor diámetro facilita que se disipe.

#### 4.5.2.5. Preparación de la muestra incluida

Los viales con la muestra incluida en la matriz de Metil Metacrilato polimerizada se mantienen a —20° C durante 1-2 horas para facilitar la separación del cristal. Los viales fríos se envuelven en papel y se golpean suavemente hasta romper el cristal.

### **Corte y montaje**

Los bloques de metil-metacrilato en los que se encontraba incluido el tejido fueron colocados en el porta-piezas de un microtomo de rotación motorizado (Leica Jung Supercut 2065). El corte se llevó a cabo a un grosor de 7  $\mu\text{m}$ , por medio de una cuchilla de perfil C con filo recubierto de carburo de tungsteno (Leica), posicionada con un ángulo de ataque de 4°, sobre la que desplazaba el bloque conteniendo la muestra, en sentido vertical, a una velocidad constante de 3-4 mm/seg. Tanto el filo de la cuchilla como la superficie del bloque de metil-metacrilato se mantuvieron constantemente humedecidos, con etanol 40%, durante el proceso de corte.

Las secciones se recogieron con unas pinzas y se colocaron sobre un baño termostataado de H<sub>2</sub>O a 60° C con objeto de estirar el corte. Posteriormente las secciones se recogen sobre portaobjetos gelatinizados, se coloca una lámina de teflón sobre ellas y se desliza un rodillo sobre la muestra para eliminar las gotas de agua que hayan quedado atrapadas. A continuación se colocan los porta-objetos en una prensa, separados por papel de filtro, para escurrirlos, y se introducen en una estufa a 45° C durante una noche. Posteriormente, se eliminan las láminas de teflón y de papel secante y se mantienen los porta-objetos a temperatura ambiente, al resguardo del polvo, hasta su posterior procesado.

#### **4.5.2.6. Tinción**

El protocolo de tinción (para todas las tinciones realizadas) comienza con la desplastificación de las secciones para eliminar el metilmetacrilato mediante su inmersión en una mezcla de Triclorometano (cloroformo)/Xileno en proporción 1/1.(3 baños de 25 minutos).

A continuación, se rehidratan los cortes en series de alcohol de gradación decreciente.

Las secciones ya desplastificadas se rehidratan pasándolas por una serie de etanol de graduación decreciente

- Etanol 100° (2 x 5 min)
- Etanol 96° (1 x 5 min)
- Etanol 90° (1 x 5 min)
- Etanol 80° (1 x 5 min)
- Etanol 70° (1 x 5 min)
- Etanol 50° (1 x 5 min)

- Agua destilada 15 minutos

Las técnicas de tinción empleadas se describen a continuación:

#### **4.5.2.6.1 Tinción de Von Kossa**

##### **Principio**

Los iones plata son desplazados de una solución por iones del tipo carbonato o fosfato debido a interacciones electroquímicas. La reacción argentafín es fotoquímica, de modo que la energía necesaria proviene de una fuente de luz (lámpara ultravioleta o incluso la luz solar). Como las formas de carbonato o fosfato van ligadas al calcio, este método permite demostrar los depósitos de calcio.

Posteriormente, realizando una contratinción usando el colorante (o colorantes) adecuado, en nuestro caso el Rojo Neutro Ácido, podemos observar otros elementos presentes en el tejido. En nuestro caso la matriz condral.

##### **Método**

1. Las secciones desplastificadas y rehidratadas se sumergen en una solución acuosa de nitrato de plata ( $\text{NO}_3\text{Ag}$ ) al 5%.
2. Exponer este baño a la luz de una lámpara de ultravioleta durante 20 minutos.
3. Lavar abundantemente en agua destilada
4. Sumergir las secciones (2 minutos) en una solución acuosa de Tiosulfato Sódico al 2%
5. Lavar abundantemente en agua corriente
6. Realizar un último lavado en agua destilada
7. Contrateñir con solución acuosa de Rojo Neutro Ácido al 1% durante 2 minutos.
8. Deshidratar rápidamente
  - Etanol 96° 1 minutos
  - Etanol absoluto (2x 2 minutos)
9. Aclarar en Xilol (2 x 5 minutos)
10. Montar el cubreobjetos.

## **Resultados**

Las zonas calcificadas se aprecian de pardo oscuro. El osteoide desde pardo claro hasta rosa (en función del grado de osificación) y la matriz cartilaginosa de color rosa

### **4.5.2.6.2 Tinción de azul de toluidina**

#### **Principio**

El azul de toluidina es una sustancia *colorante* derivada del *aminotoluol* de uso muy común en *histología*. Este colorante tiñe estructura basófilas y se puede comportar como colorante ortocromático (tiñe de color azul) o metacromático (tiñe de color violeta-rojizo), dependiendo del pH y de la naturaleza química de la sustancia teñida. En suspensión presenta un color azul y cuando se expone a estructuras ricas en enlaces amínicos (heparina, coindroitín sulfatos, etc.) las moléculas de esta sustancia se ordenan tomando un color rojo, por efecto de su propiedad metacromática. Como colorante ortocromático, se usa frecuentemente para teñir tejido nervioso, donde tiñe la heterocromatina y los gránulos de Nissl (acúmulos de cisternas de retículo endoplásmico rugoso de los somas neuronales. En nuestro caso, el azul de toluidina tiñe metacromáticamente las estructuras ricas en proteoglucanos sulfatados, como el heparán sulfato, presente en el cartílago de reciente síntesis (condroblastos y matriz inmadura).

#### **Método**

Para realizar esta tinción seguimos el siguiente protocolo:

1.- Las secciones de 7  $\mu\text{m}$  obtenidas en el microtomo y colocadas sobre los portaobjetos se cubren con la solución de azul de toluidina/bórax, manteniéndose sobre una placa calefactora a 60°C unos minutos (hasta que la solución colorante comienza a emitir vapores).

Solución de azul de toluidina/Bórax : Azul de toluidina 4 g; Bórax (tetraborato sódico) 5 g; Agua destilada 500 ml

El ácido acético se añade justo antes de realizar la tinción y se filtra la mezcla.

2.- Se diferencia el azul de toluidina lavando las secciones en agua corriente.

3.- Secado de las secciones en estufa a 37°C.

4.- Paso rápido por etanol absoluto (1x2 min), aclarado en xilol (2x5 min) y montaje en Entellán (Merck) y cubreobjetos.

## **Resultados**

En las laminillas óseas preexistentes la matriz ósea apenas toma coloración mientras que son visibles los cuerpos celulares de los osteocitos/osteoblastos, teñidos de azul intenso, inmersos entre ellas. Los bordes de las laminillas óseas, así como las células de la médula ósea, aparecen igualmente teñidas de azul intenso. Las matrices de las zonas de osteogénesis reciente aparecen en color violeta. La matriz condral muestra una clara metacromasia que va desde tonos rojizos y morados hasta violeta.

### **4.5.2.6.3 Tinción Azul alcian-pas-hematoxilina**

#### **Fundamento**

Diferenciar entre mucosustancias neutras y ácidas. Las mucosustancias ácidas se tiñen con la técnica del azul alcian mientras que las mucosustancias neutras se tiñen por la reacción del PAS.

#### **Soluciones**

##### Solución de ácido acético al 3%

- Ácido acético glacial      3 ml
- Agua destilada              100 ml

##### Azul alcian pH 2,5

- Azul alcian                      5 g
- Ácido acético 3%            500 ml

##### Ácido peryódico al 0.5%

- Acido peryódico                2.5 g
- Agua destilada                50 ml

##### Reactivo de Schiff (Según Coleman)

- Disolver en 200 ml de agua destilada tras hervir, 1 gr de fucsina básica (Clorhidrato de pararosanilina).
- Dejar enfriar hasta 50°C y añadir 2 gr de metabisulfito potásico, agitando.
- Dejar enfriar a temperatura ambiente y añadir 10 ml. de ácido clorhídrico 1N ó 2 ml. de ácido concentrado.
- Dejar 12-24 horas en oscuridad

- Añadir 0.5 gr de carbón activo y agitar vigorosamente durante 1-2 min.
- Dejar sedimentar y filtrar.

La solución ha de ser clara o amarillo pálido. Conservación refrigerado y protegido de la luz: 2 meses.

Solución Reductora de lavado (Stock)

- Metabisulfito sódico            10 g
- Agua destilada                    100 ml

Solución Reductora de lavado (Solución de trabajo)

- Solución Reductora de lavado (Stock)            2.5 ml
- Agua destilada                                        50 ml

**Procedimiento**

- 1 Introdurcir las secciones desplastificadas en ácido acético 3% durante 1 min.
- 2 Teñir las secciones con azul alcian durante 30 min.
- 3 Lavar, primero con agua corriente y después con agua destilada.
- 4 Colocar las secciones en ácido peryódico 0.5% durante 10 min.
- 5 Lavar con agua corriente durante 5 min y posteriormente aclarar con agua destilada.
- 6 Colocar las secciones en el reactivo de Schiff durante 10 min.
- 7 Colocar las secciones en el solución reductora de lavado durante 5 min.
- 8 Lavar con agua corriente durante 10 min.
- 9 Contrateñir las secciones con Hematoxilina de Harris acética (48 ml de hematoxilina + 2 ml de ácido acético) durante 1 min.
- 10 Lavar con agua corriente durante 10min.
- 11 Deshidratar en dos pasos por etanol de 96° y absoluto, aclarar en xileno, y montar.

**Resultados**

- Mucosustancias exclusivamente ácidas se aprecian en azul
- Polisacáridos neutros se aprecian en magenta
- Otros mucopolisacáridos serán coloreadas tanto por el PAS como por el azul alción apreciándose en púrpura

**4.5.2.6.4 Tinción de Movat****Fundamento**

Las mucosustancias ácidas se tiñen con azul alción que mediante el uso de la solución alcohólica alcalina convierte el azul alción en azul monastral fast que es insoluble. La hematoxilina férrica y la diferenciación con cloruro férrico pone de manifiesto las fibras elásticas. El escarlata de croceína y la fucsina ácida tiñen el colágeno y matriz extracelular. El ácido acético elimina el ácido fosfotúngstico y el colágeno es contrateñido con la safranina alcohólica.

**Soluciones****Azul Alción 1%**

- |                         |        |
|-------------------------|--------|
| • Azul Alción 8GS       | 1 g    |
| • Ácido acético glacial | 1 ml   |
| • Agua destilada        | 100 ml |

**Alcohol alcalino**

- |                     |       |
|---------------------|-------|
| • Hidróxido amónico | 10 ml |
| • Alcohol 96°       | 90 ml |

**Yodo-Yodo**

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| • Yodo            | 2 g    |
| • Yoduro potásico | 4 g    |
| • Agua destilada  | 100 ml |

**Hematoxilina alcohólica absoluta 10%**

- |                   |        |
|-------------------|--------|
| • Hematoxilina    | 10 g   |
| • Etanol absoluto | 100 ml |

Cloruro férrico 10%

- Cloruro férrico 10 g
- Agua destilada 100 ml

Solución de Hematoxilina de Movat

- Hematoxilina alcohólica absoluta 10% 25 ml
- Etanol absoluto 25 ml
- Cloruro férrico 10% 25 ml
- Yodo-Yodo 25 ml

Cloruro férrico 2%

- Cloruro férrico 10% 10 ml
- Agua destilada 40 ml

Tiosulfato sódico 5%

- Tiosulfato sódico 5 g
- Agua destilada 100 ml

Escarlata de Croceína-Fucsina ácida

*Solución stock A*

- Escarlata de croceína 1 g
- Agua destilada 99,5 ml
- Ácido acético glacial 0,5 ml

*Solución stock B*

- Fucsina ácida 1 g
- Agua destilada 99,5 ml
- Ácido acético glacial 0,5 ml

Solución de trabajo: Solución A (8 partes) + Solución B (2 partes)



### Ácido Fosfotúngstico 5%

- Ácido Fosfotúngstico 5 g
- Agua destilada 100 ml

### Safrán alcohólico

- Safran du Gatinais 6 g
- Etanol absoluto 100 ml

### **Procedimiento**

- 1 Teñir las secciones desplastificadas con azul alcián durante 20 min.
- 2 Lavar con agua corriente 5 min.
- 3 Colocar las secciones en alcohol alcalino durante 1 hora.
- 4 Lavar con agua corriente durante 10 min
- 5 Aclarar con agua destilada.
- 6 Teñir con la solución de Hematoxilina durante 15 min.
- 7 Lavar con agua destilada.
- 8 Diferenciar con cloruro férrico al 2%
- 9 Aclara con agua destilada
- 10 Pasar las secciones por tiosulfato sódico 5% durante 1 min
- 11 Lavar con agua corriente 5 min y aclarar con agua destilada
- 12 Teñir con escarlata de croceína-fucsina ácida durante 2 minutos
- 13 Aclarar en varios cambios de agua destilada
- 14 Aclarar en ácido acético al 0,5%
- 15 Pasar por ácido fosfotúngstico 5% (2x5min)
- 16 Aclarar en ácido acético al 0,5%
- 17 Aclarar en etanol absoluto
- 18 Teñir con safranina alcohólica 15 min
- 19 Aclarar en etanol absoluto

20 Aclarar en xileno y montar

### **Resultados**

Mucosustancias se aprecian en azul

Colágeno se aprecian desde amarillo hasta rojo intenso

#### **4.5.2.6.5 Tinción Orceína-azul alción**

### **Fundamento**

El azul alción tiñe los mucopolisacáridos ácidos y la orceína las fibras de colágeno y otros mucopolisacáridos.

### **Soluciones**

#### **Permanganato potásico 0,25% y Ácido Sulfúrico 1,25%**

- Permanganato potásico 0,25 g
- Ácido Sulfúrico 1,25 ml
- Agua destilada 100 ml

#### **Ácido Oxálico 2%**

- Ácido Oxálico 2 g
- Agua destilada 100 ml

#### **Solución de Orceína**

- Orceína 1 g
- Etanol 70% 100 ml
- Ácido Clorhídrico concentrado xx% 1 ml

#### **Alcohol ácido**

- Etanol 96° 100 ml
- Ácido acético puro 1 ml

#### **Azul alción pH 2,5**

- Azul alción 5 g
- Ácido acético 3% 500 ml

### **Procedimiento**

- 1 Introducir las secciones desplastificadas en la solución de permanganto potásico y ácido sulfúrico durante 1 min.
- 2 Sumergir en ácido oxálico al 2% hasta que los cortes pierdan la coloración de la solución anterior.
- 3 Lavar con agua destilada.
- 4 Introducir en solución de orceína durante 4 horas
- 5 Lavar con agua corriente
- 6 Diferenciar en alcohol ácido varios segundos
- 7 Lavar con agua destilada.
- 8 Azul Alcían pH 2,5 unos 2 minutos.
- 9 Deshidratar en dos pasos por etanol de 96° y absoluto, aclarar en xileno, y montar.

### **Resultados**

Mucosustancias ácidas se aprecian en azul

Polisacáridos neutros y colágeno se aprecian en rosa

#### **4.5.2.6.6 Técnica inmunohistoquímica**

##### **Principio**

Con objeto de identificar la presencia y participación de las células stem humanas en el tejido regenerado, se procedió a la detección inmunohistoquímica, en las secciones de tejido, de una proteína no glicosilada de 60 KDa que aparece específicamente en la membrana de mitocondrias de células humanas. La detección se realizó mediante el uso de un anticuerpo monoclonal específico frente a esta proteína generado en ratón (MAB1273, Millipore).

##### **Método**

El método inmunohistoquímico general se desarrolló del siguiente modo:

1. Los portaobjetos conteniendo las secciones se sumergieron durante 20 min, en agitación constante, en una solución de borohidruro sódico ( $\text{NaBH}_4$ ) al 1% en tampón fosfato 0,1M, pH 7,4 (TF). El borohidruro sódico es un agente reductor que actúa sobre los grupos aldehído presentes en el tejido por el uso del fijador y los reduce a grupos

- hidroxilo, eliminando así la autofluorescencia propia de los grupos aldehído.
2. 5 lavados de 10 min en TF a T<sup>a</sup> ambiente para eliminar completamente los restos de borohidruro sódico.
  3. Preincubación de las secciones durante 60 min a T<sup>a</sup> ambiente en una solución de preincubación constituida por Triton X-100 al 0,2% (p/v) , suero normal de cabra al 5%.
  4. El Triton X-100 (*p*-isooctilfenoxi-poli-etoxietanol) disuelve moderadamente las membranas lipídicas favoreciendo la penetración de los anticuerpos así como de los demás componentes involucrados en la reacción inmunohistoquímica. El suero normal hace que disminuyan las uniones inespecíficas.
  5. Incubación en el anticuerpo primario durante 48 horas a 4°C. La solución de incubación estaba formada por los mismos componentes que el medio de preincubación, en el que fue diluido el anticuerpo primario (anti-proteína mitocondrial humana) 1:100.
  6. 3 lavados de 10 min cada uno con TF a T<sup>a</sup> ambiente, destinados a eliminar los restos de anticuerpo primario no unido al tejido.
  7. Incubación, durante una hora y media a T<sup>a</sup> ambiente, en un medio de incubación que contenía un anticuerpo secundario diluido 1/500 en TF. El anticuerpo secundario es una IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugada con el fluorocromo cianina 3 (Cy3) (Jackson Immunoresearch) que reconoce específicamente el anticuerpo primario utilizado.
  8. 3 lavados de 10-15 min en TF a T<sup>a</sup> ambiente y en oscuridad
  9. Incubación durante 10 min a T<sup>a</sup> ambiente y en oscuridad en DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) diluido 1/10.000 en TF. El DAPI es un fluorocromo que tiene alta afinidad por las regiones del ADN ricas en pares Adenina-Timidina, de modo que permite visualizar los núcleos celulares de color azul.
  10. 3 lavados de 10-15 min en TF a T<sup>a</sup> ambiente y en oscuridad.
  11. Los portaobjetos conteniendo las secciones se cubrieron con un medio adecuado para preservar la fluorescencia (Gel Mount, G0918, SIGMA), se colocaron los cubreobjetos y los bordes fueron sellados para maximizar la conservación de las muestras. Las muestras fueron siempre almacenadas en oscuridad y a 4°C.

## **Resultados**

Las células stem humanas son identificadas por mostrar en el interior citoplasmático fluorescencia de color rojo que se corresponde con la presencia de la proteína mitocondrial humana.

### **4.5.2.7 Obtención de las imágenes microscópicas**

Las secciones fueron examinadas en un fotomicroscopio (Zeiss AxioScope A.1) equipado con campo claro y epifluorescencia, conectado a una cámara digital (Zeiss HRc), la cual, a su vez, estaba acoplada a un soporte informático con el software adecuado (Zeiss AxioVision 4.8) a través de la cual se capturaron las imágenes digitales. En todos los casos, estas imágenes digitales fueron procesadas con el software Adobe Photoshop CS2 (v. 9.0) con el que se realizaron únicamente ajustes de resolución y ligeras modificaciones de brillo y contraste para unificar las características de las imágenes.

### **4.5.2.8 Escala de valoración histológica.**

Para una valoración histológica lo más objetiva posible, hemos decidido emplear una escala de medida ampliamente contrastada, como es la escala modificada de Wakitani <sup>183-185</sup>.

La escala de Wakitani valora la morfología celular, la metacromasia de la matriz, la regularidad de la superficie articular, el grosor de cartílago y la integración con el cartílago nativo. Siendo su máxima puntuación de 15 y mínima de 0. Teniendo una regeneración completa con 15 puntos y ausencia de regeneración con 0. Hemos empleado esta escala de valoración, debido a que es ampliamente conocida por la comunidad científica y empleada en los estudios más relevantes sobre esta materia, que se reseñarán en la discusión. (Tabla 5)

La escala fue valorada por un histólogo independiente, del que practicó las tinciones de las muestras, tanto en el grupo control como en el de casos.

Los resultados de ambos grupos fueron valorados estadísticamente por el programa SPSS 15.0 mediante las pruebas estadísticas Kruskal-Wallis.

Tabla 5: Escala modificada de Wakitani <sup>183-185</sup>.

CATEGORY	POINTS
<b>CELL MORPHOLOGY</b>	
Hialine cartilage	4
Mostly Hialine cartilage	3
Mostly fibrocartilage	2
Mostly non-cartilage	1
Non-cartilage only	0
<b>MATRIX-STAINING (METACHROMASIA)</b>	
Normal (Compared with host adjacent cartilage)	3
Slightly reduces	2
Markedly reduces	1
Non metachromatic stain	0
<b>SURFACE REGULARITY<sup>a</sup></b>	
Smooth (>3/4)	3
Moderate (1/2 to 3/4)	2
Irregular (1/4 to 1/2)	1
Severely irregular (<1/4)	0
<b>THICKNESS OF CARTILAGE<sup>b</sup></b>	
2/3 to 4/3	3
5/3 to 4/3	2
1/3 to 2/3 OR >5/3	1
<1/3	0
<b>INTEGRATION OF CLONOR WITH HOST ADJACENT CARTILAGE</b>	
Both edges integrated	2
One edge integrated	1
Neither edge integrated	0
<b>TOTAL MAXIMUM</b>	<b>15</b>

<sup>a</sup>Total smooth area of the reparative cartilage compared with the entire area of the cartilage defect.

<sup>b</sup>Average thickness of the reparative cartilage compared with that of the surrounding cartilage.

## **RESULTADOS**

## 5 RESULTADOS.

### 5.1 *Análisis de la diferenciación y caracterización celular.*

#### 5.1.1. Aislamiento y expansión in vitro.

En todos los casos estudiados, se aislaron y expandieron adecuadamente las células mesenquimales *in vitro*, mostrando al microscopio invertido su característico aspecto fusiforme y su adherencia al plástico. Como se ha indicado en material y métodos, las MSC en tercer pase se utilizaron para los estudios inmunofenotípicos y de diferenciación multilineal, además de para los estudios experimentales del presente trabajo.

#### 5.1.2. Estudio inmunofenotípico.

El análisis inmunofenotípico de las MSC obtenidas de la médula ósea de la cresta iliaca demuestran que estas células cumplen los criterios mínimos de definición de MSCs propuestos por la International Society for Cellular Therapy (ISCT) <sup>131</sup>. Así, las MSC de la cresta iliaca fueron positivas para CD90, CD 73, CD 105 y CD 166, con positividad débil para el CD 106. En todos los casos fueron negativas para el marcador hematopoyético CD 45, el marcador de célula stem hematopoyética CD34, el antígeno monocítico CD14, el marcador de células B CD 19 y el antígeno del sistema HLA de clase II HLA-DR.

#### 5.1.3. Diferenciación celular.

Las MSCs obtenidas de la cresta iliaca fueron capaces en todos los casos de diferenciarse a osteocitos, adipocitos y condrocitos, lo cual es requisito imprescindible para cumplir los criterios mínimos de definición de MSC especificados por la ISCT.

### 5.2 *Análisis radiológico.*

#### 5.2.1 Análisis radiológico con RMN.

Los conejos tratados únicamente con gel presentan los siguientes hallazgos en la resonancia (Figura 6)

Imagen tridimensional Spoiled Gradient (3D SPGR) con saturación grasa, que permite identificar defectos cartilaginosos con alta precisión. Se observa lesión osteocondral con pérdida de cartílago articular (flecha) y foco de edema óseo subyacente de aproximadamente 3mm de eje mayor. (Figura 6.A)



Secuencia 3D FSPGR en plano axial, saturación grasa. La imagen muestra solución de continuidad en el cartílago articular del cóndilo femoral (flecha larga) con lesión ósea subyacente (flecha corta). (Figura 6. B)

Secuencia potenciada en densidad protónica (DP) con saturación grasa, plano sagital. Se observa defecto osteocondral (flecha) con área de hiperseñal circundante en relación con edema asociado. (Figura 6. C)

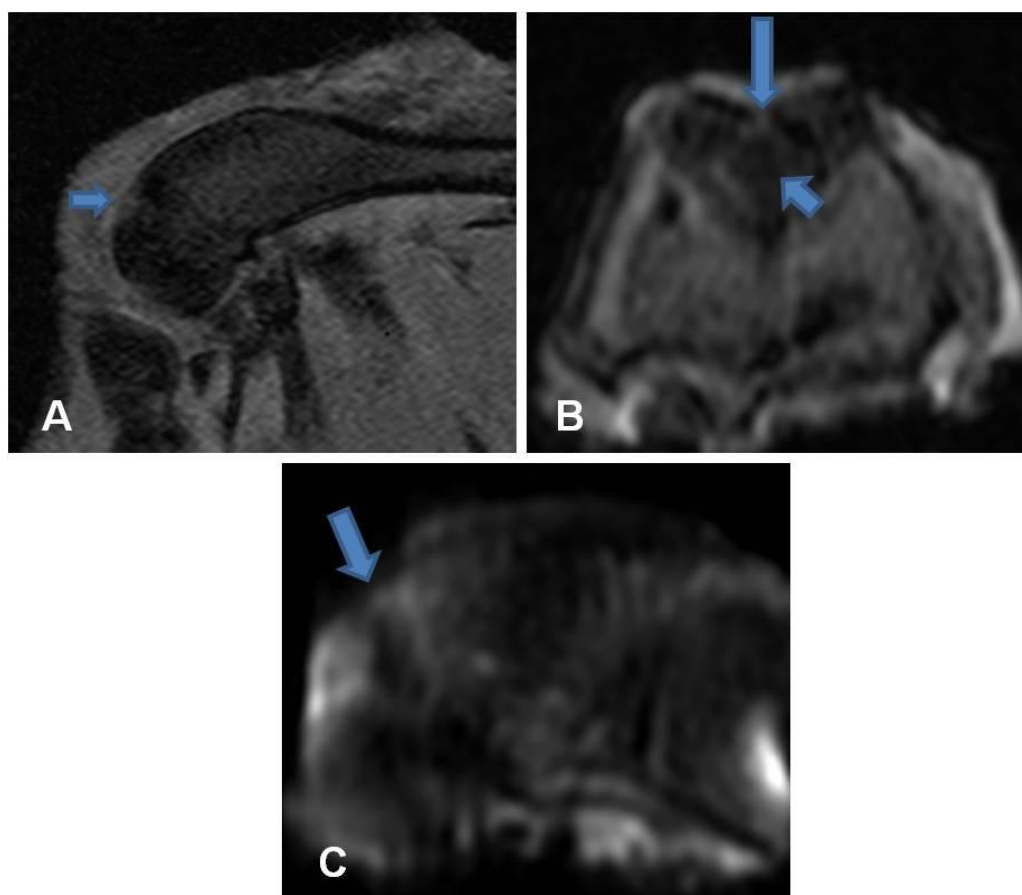


Figura 6: Análisis de RMN del grupo intervenido con hidrogel sin MSCs.

Los conejos tratados con gel y células madre presentan los siguientes hallazgos en la resonancia.(Figura 7)

Imagen 3D SPGR con saturación grasa donde se aprecia cartílago articular regenerado, con hueso subcondral de aspecto normal (flecha). (Figura. A)

Secuencia 3D FSPGR en plano axial, saturación grasa, plano axial. Imagen que corresponde a la extremidad contralateral, al mismo nivel, apreciando

aparente integridad de la superficie condílea, sin soluciones de continuidad ni áreas de edema óseo evidentes (flecha). (Figura 7. B)

Secuencia potenciada en DP, plano sagital. Comparativamente con la imagen anterior se observa en este espécimen aparente integridad osteocartilaginosa. No se objetivan áreas de edema. (Figura 7. C)

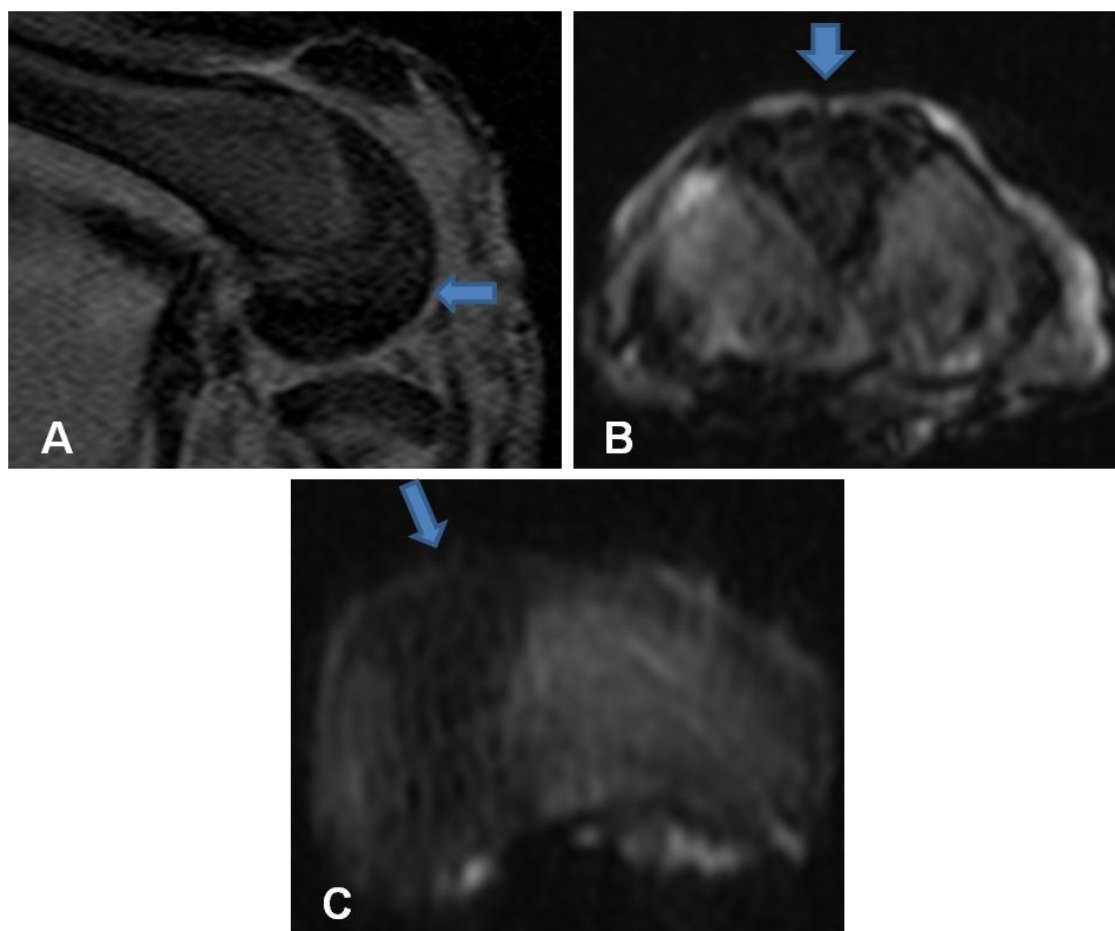


Figura 7: Análisis de RMN del grupo intervenido con hidrogel junto con MSCs.

### 5.2.2. Análisis radiológico con TAC multicorte.

Análisis de la Figura 8:

- Figuras 1A y 2A. Reconstrucciones tridimensionales de extremidad distal de fémur de conejo. Cóndilos femorales tratados únicamente con gel, visualizando pérdida de cartílago articular y defecto óseo de hasta 3x3mm en 1A, en sentido transversal y anteroposterior respectivamente, en relación con lesión osteocondral parcialmente reparada.
- Figuras 1B y 2B. Reconstrucción en plano sagital donde se manifiestan los defectos osteocondrales descritos.
- Figuras 1C y 2C. Adquisición helicoidal en plano axial mediante cortes finos. Se aprecia asimismo la resolución parcial de lesiones osteocondrales comentadas.
- Figuras 3A y 4A. Reconstrucciones tridimensionales de cóndilos femorales tratados con gel y células madre. En estos casos los defectos osteocondrales son mínimos, e incluso imperceptibles en el espécimen 1D, en relación con reparación prácticamente completa de los mismos.
- Figuras 3B y 4B. Reconstrucción en el plano sagital. El espécimen 2C presenta mínima lesión osteocondral de 1,6 x 2 mm en sentido transversal y anteroposterior respectivamente. El defecto resulta prácticamente imperceptible en el espécimen 2D, observando únicamente mínima indentación en la superficie articular.
- Figuras 3C y 4C. Adquisición helicoidal en plano axial mediante cortes finos, mostrando los hallazgos descritos en las figuras 2C y 2D.

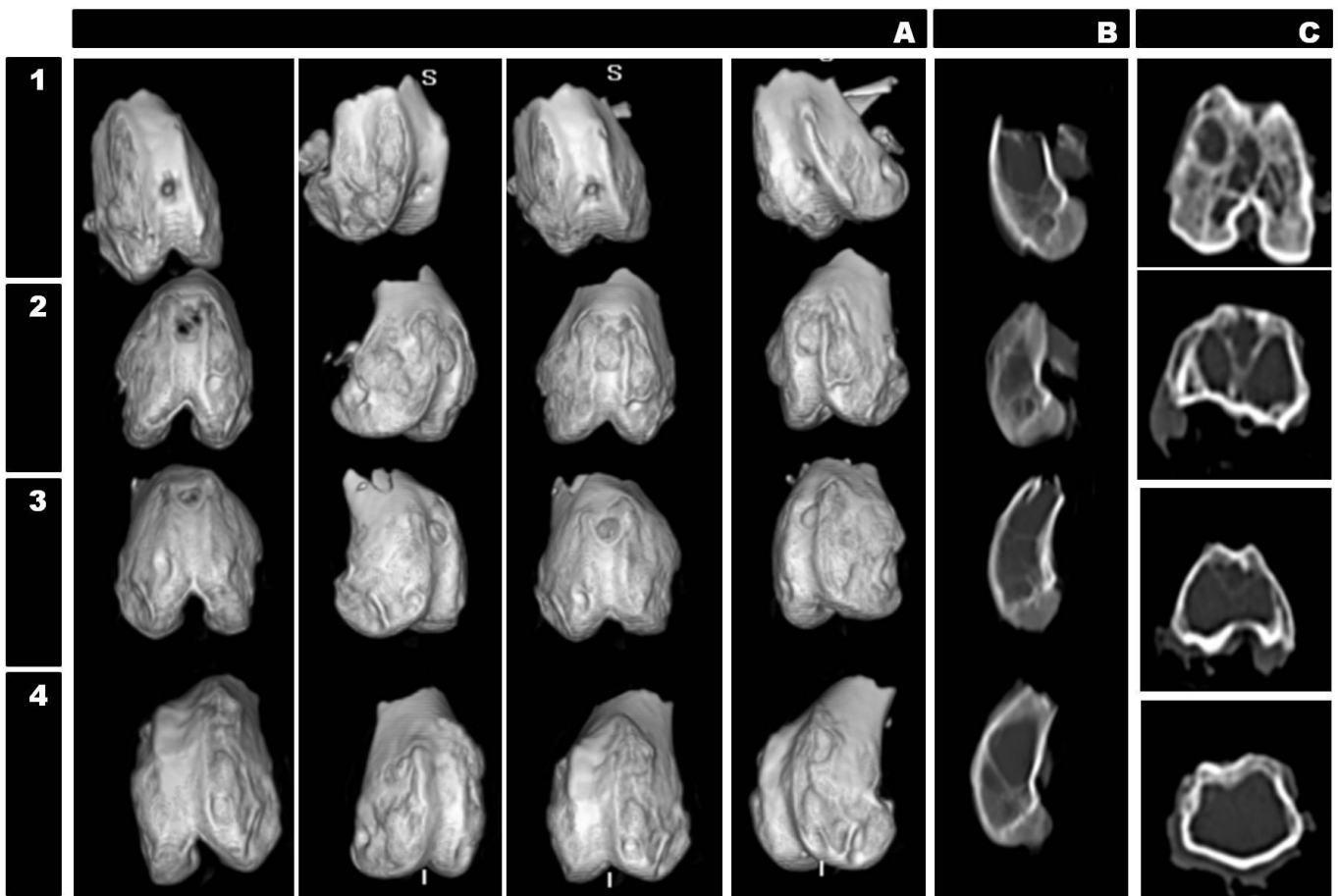


Figura 8: Análisis de TAC tanto del grupo control como el de casos.

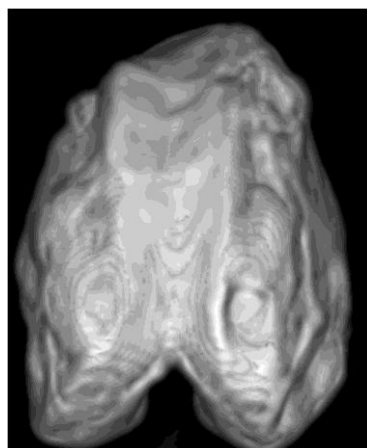


Figura 9: Reconstrucción tridimensional de cóndilo femoral totalmente regenerado (Figura 8. 4. A, B, C)

### **5.3. Análisis histológico.**

#### **5.3.1. Análisis histológico macroscópico.**

En la articulación fémoro-tibial, en el extremo inferior del fémur se diferencian las dos protuberancias o cóndilos femorales, separadas por una depresión, el surco intercondíleo. El cartílago articular normal suele mostrar una superficie lisa y brillante de color blanco-grisácea, algo traslúcida, característica del cartílago hialino.

El aspecto macroscópico del cartílago hialino del fémur en la articulación fémoro-tibial presenta unas claras diferencias entre las rodillas de animales tratados con las células stem (Figura 10. A1 y B1) y los no tratados (Figura 10. A2 y B2). Como puede observarse en las imágenes, la superficie articular de las rodillas tratadas con células stem tras la realización del defecto, presenta un aspecto liso y brillante. En ellas se aprecia aún la zona lesionada debido, exclusivamente, a una coloración ligeramente más grisácea del cartílago regenerado en la zona lesionada con respecto al que se sitúa en el resto de la superficie articular. De hecho, estudiando en detalle, se puede observar que el tejido regenerado se encuentra perfectamente integrado con el tejido condral circundante, sin poderse evidenciar ninguna discontinuidad entre ambas estructuras. Por otra parte, la superficie del tejido condral regenerado presenta un aspecto liso, similar al del resto del cartílago.

En las rodillas izquierdas, no tratadas con células stem, sin embargo, se puede diferenciar perfectamente la zona regenerada por presentar una coloración blanquecina, más pálida que el cartílago circundante. Pero, además de esto, el aspecto no es liso, sino que presenta una superficie fibrosa, y, por otra parte, protruye, sobresaliendo ligeramente del resto de la superficie articular.

Estos datos macroscópicos fueron observados de forma más o menos homogénea en todos y cada uno de los seis conejos que componen el estudio.

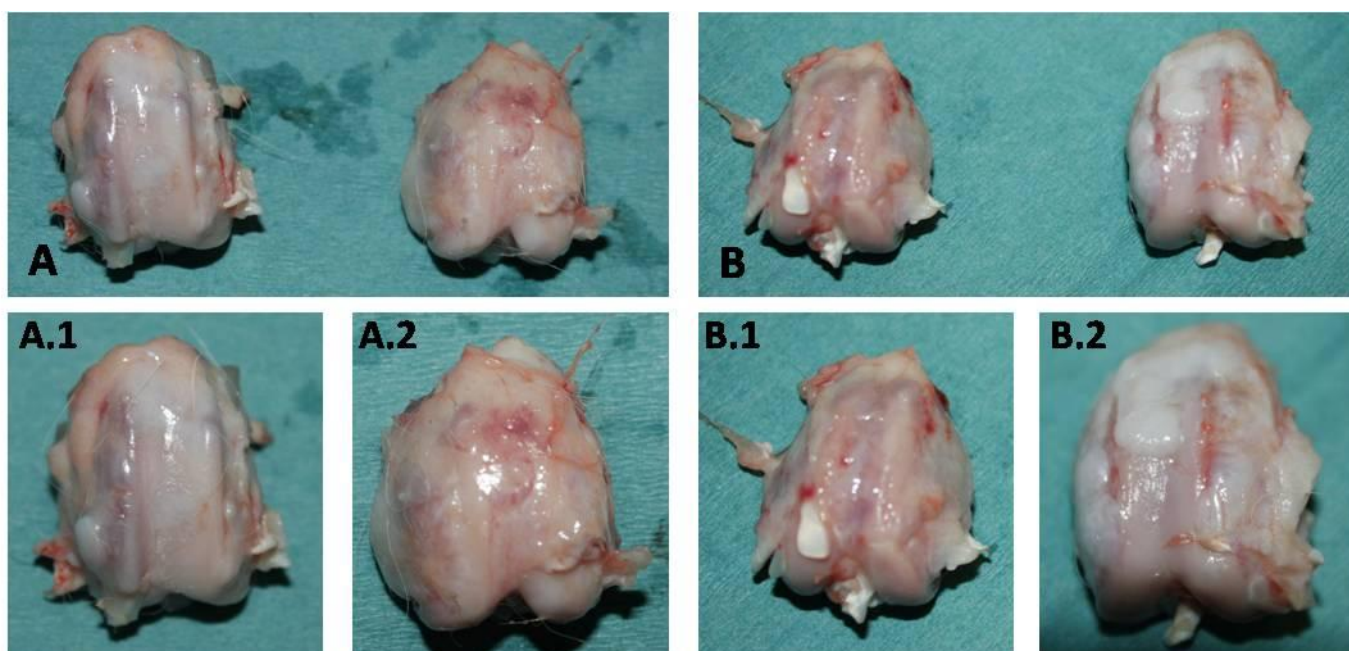


Figura 10: Muestra de dos conejos con su pata tratada con MSC y con la control.

### 5.3.2. Análisis histológico microscópico.

#### 5.3.2.1. Consideraciones técnicas

Para la realización del presente trabajo hemos utilizado diferentes técnicas de tinción histológicas destinadas, por una parte, a poner de manifiesto diferentes características del tejido osteocondral y, por otra, como es el caso de la inmunofluorescencia, para demostrar la presencia y participación de las células stem en la reparación, al menos en parte, del defecto.

Las técnicas de tinción utilizadas nos han permitido poner de manifiesto la estructura tisular, la distribución y morfología celular, así como la distribución de la matriz extracelular, en especial las fibras de colágeno, especialmente evidenciadas mediante las técnica de Orceína-Azul Alcían y Azul de Toluidina. Mediante la tinción de von Kossa diferenciamos las zonas calcificadas en color pardo, que manifiestan desde tonos muy claros hasta pardo oscuro, en función del grado de calcificación. La combinación de esta tinción con la contratinción de Rojo Neutro Ácido pone de manifiesto, en tonos desde rosa pálido hasta fucsia intenso, la matriz condral. La distribución general de los condrocitos y sus diferentes características de la matriz condral son apreciables con la Tinción de Movat y con la de Azul Alcían-PAS.

Finalmente, con la tinción del azul de toluidina observamos los cuerpos celulares de los osteocitos/osteoblastos teñidos de azul intenso entre las laminillas óseas que toman el colorante. Los bordes de las laminillas óseas, así como las células de la médula ósea, aparecen igualmente teñidos de azul intenso. Además, la propiedad metacromática de este colorante hace que aparezca en color violeta la matriz de las zonas de reciente osteogénesis, mientras que la matriz condral aparece en tonos que van desde rojizos y morados hasta violetas.

### **5.3.2.2. Cartílago articular normal**

El cartílago articular está formado por cartílago hialino. En él podemos diferenciar una capa superficial o tangencial formada por condrocitos de pequeño tamaño, de morfología fusiforme, que presentan su eje mayor orientado paralelamente a la superficie. Este aspecto es fácilmente observable en cualquiera de las tinciones utilizadas, aunque es especialmente evidente en las preparaciones teñidas con Azul-Alcián-PAS y con la Técnica de Movat. En este lugar, las fibras colágenas presentan la misma orientación que las células, es decir paralelas a la superficie articular. Este dato se evidencia con especial claridad en las imágenes obtenidas con la tinción Orceína-Azul Alcián y con la Azul-Alcián-PAS.

Bajo esta capa periférica, se observa una capa intermedia, constituida por condrocitos aislados, de morfología esférica y de mayor tamaño que los anteriores (se ve en cualquiera de las imágenes). En esta región, si bien las fibras colágenas no tienen una orientación definida, la predominante es una orientación tangencial a la superficie articular, especialmente evidente con la técnica Orceína-Azul Alcián.

La mayor parte del cartílago articular lo constituye una capa profunda en la que aparecen los condrocitos esféricos y de mayor tamaño. En la zona de contacto con la región intermedia, estos condrocitos se encuentran aislados, sin un orden definido. A medida que se profundiza en esta región encontramos los condrocitos formando agrupaciones de varias unidades, grupos isógenos, (usualmente entre 4 y 6 células), que pueden organizarse de modo columnar o en otros casos en agrupaciones circulares (se ve en cualquiera de las tinciones). En estas regiones es especialmente evidente la presencia de una pequeña porción perilacunar de matriz especializada, que limita la laguna en la que se asienta el condrocito (condroplasto), en la inmediata proximidad del condrocito y que tiene características diferentes a aquella que forma el resto de la matriz que se interpone entre las células. La presencia, en esta región, de alto contenido en condroitín sulfato, ácido hialurónico y proteoglicanos queda de manifiesto en las imágenes obtenidas con la técnica del Azul-Alcian-PAS, en las que puede observarse un ribete pericelular de color azul-grisáceo que

destaca de la coloración rosada adquirida por el resto de matriz condral. Igualmente en las secciones teñidas con Azul de Toluidina se puede observar esta región como un pequeño ribete que se tiñe intensamente de morado. Por su parte, las fibras colágenas en esta región constituyen grandes haces con orientación diversa pero con predominio de una orientación perpendicular o ligeramente oblicua respecto a la superficie articular (Orceína-Azul Alcían).

En la región basal de esta capa, en las cercanías del hueso subcondral, se sitúa una capa de transición. Se trata de una capa caracterizada por la presencia de matriz condral calcificada en la que se asientan grupos de condrocitos hipertróficos. Entre esta capa y el hueso subcondral se encuentra una clara línea limitante (evidente en la tinción de Movat) bajo la cual ya se observa tejido óseo organizado, sostenido por el tejido óseo trabecular.

Se puede apreciar en la siguiente figura el cartílago articular normal con las diferentes tinciones. (Figura 11)



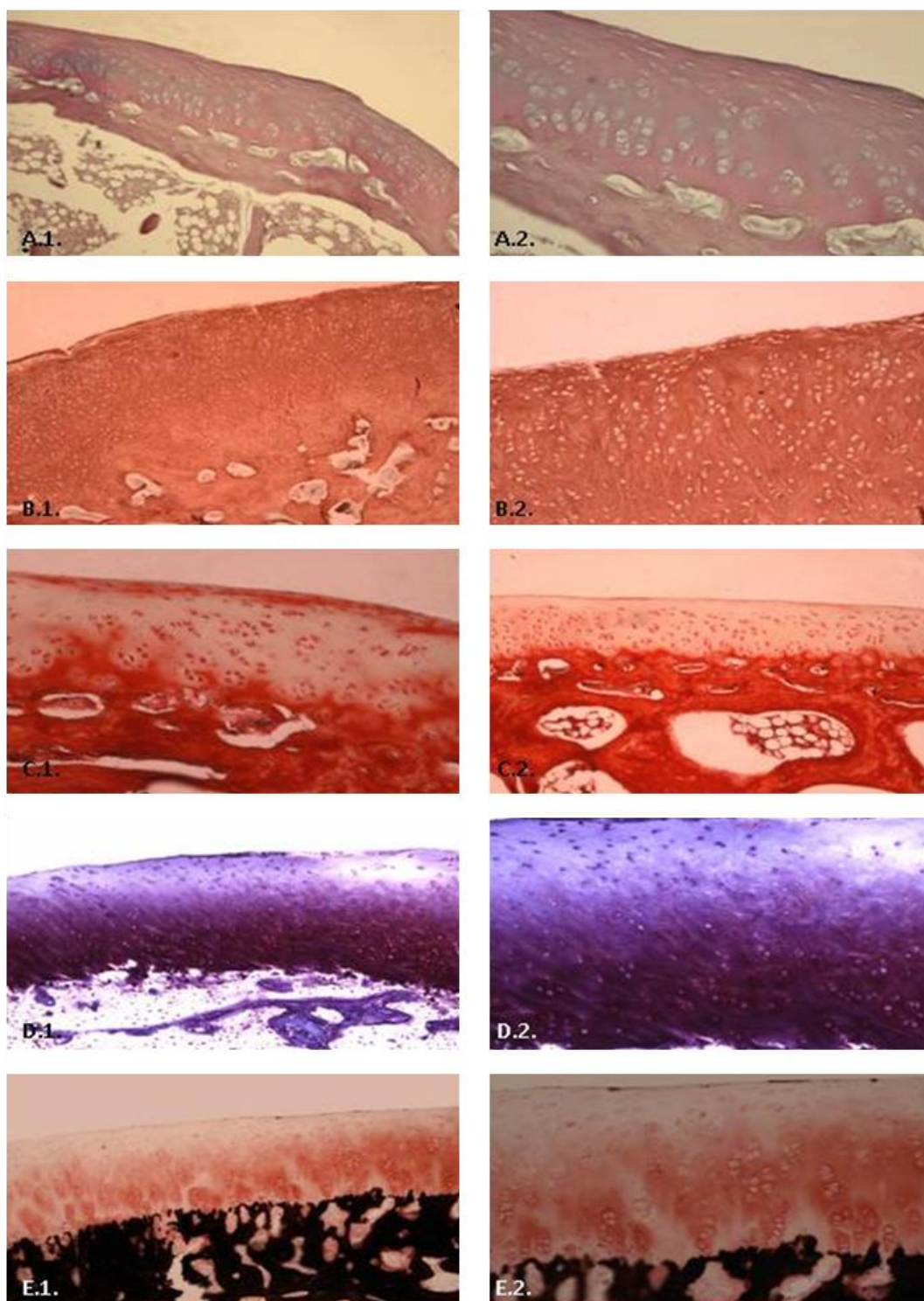


Figura 11: Cartílago articular normal: A.1. Tinción azul-alcian x100; A.2. Tinción azul-alcian x200; B.1. Tinción orceina azul-alcian x100; B.2. Tinción orceina azul-alcian x200; C.1. Tinción Movat x100; C.2. Tinción Movat x200; D.1. Tinción azul de toluidina x100; D.2. Tinción azul de toluidina x200; E.1. Tinción Von Kossa x100; E.2. Tinción Von Kossa x200.

### **5.3.2.3. Aspecto microscópico de las rodillas tratadas con células stem**

En las secciones coronales de las rodillas tratadas con células stem puede apreciarse claramente la región e la que se produjo el defecto osteocondral. Este defecto que afectó al cartílago articular, así como al hueso subcondral, presenta una morfología cónica que se extiende desde la superficie articular hasta algunos milímetros de profundidad en el hueso subcondral.

A bajos aumentos observamos que el espacio ocupado por la lesión está relleno por un tejido que es claramente cartílago y que ocupa toda la zona de lesión, desde la superficie articular hasta las partes profundas en contacto con el hueso subcondral.

#### **Cartílago articular**

En la superficie articular observamos una completa recuperación del cartílago hialino lesionado. El cartílago regenerado muestra una superficie lisa y regular y en las partes laterales a la zona de lesión, éste se encuentra completamente integrado con el cartílago adyacente no lesionado, no presentándose ninguna discontinuidad con el mismo. Por otra parte, la superficie es completamente uniforme y lisa, de manera que el cartílago regenerado iguala exactamente la altura del resto del cartílago articular. Dicho de otro modo, en la zona de cartílago regenerado no observamos depresiones o protrusiones respecto al resto de superficie articular.

Observando en más detalle, la zona de cartílago regenerada presenta las mismas características tintoriales que el resto del cartílago adyacente. Además se pueden observar, bien definidas, las diferentes capas que lo componen y que no muestran diferencias respecto al cartílago no lesionado. La capa superficial o tangencial muestra las características células pequeñas y de morfología ovoide y en la capa intermedia observamos los condrocitos mayores y de morfología esférica distribuidos de forma aislada entre la matriz.

La diferencia más notable respecto al cartílago no lesionado la encontramos en la parte basal. En este sentido, en las zonas laterales de esta región observamos los condrocitos formando grupos isógenos en disposición columnar o circular, en número marcadamente superior al que se encuentra en condiciones normales. Es fácilmente asumible el hecho de que ésta, representa una zona de proliferación celular que contribuye a la generación del nuevo cartílago.

### **Hueso subcondral**

En el tiempo de recuperación de los animales tras la lesión, comprobamos que, si bien la regeneración del hueso subcondral no es completa, las imágenes histológicas evidencian la existencia de procesos de reposición de este hueso que, aparentemente acabarían por completarse definitivamente a tiempos de recuperación más largos.

La zona lesionada de hueso subcondral se encuentra totalmente ocupada por tejido que presenta las características típicas de tejido cartilaginoso. En las imágenes de secciones teñidas con la técnica de von Kossa y contrateñidas con Rojo Neutro Ácido, se observa la región central de la zona lesionada ocupada completamente por cartílago en el que pueden observarse grupos isógenos de condrocitos, mayoritariamente en disposición columnar. La orientación de las células en estas columnas es siempre paralelo al eje de la lesión. Este cartílago descrito aparece ocupando la parte central de la región en regeneración.

Hacia los bordes de este cartílago que ocupa la parte central de la zona lesionada, nos encontramos con regiones de cartílago en las que los condrocitos se encuentran hipertrofiados y la matriz que los rodea se encuentra moderadamente calcificada, lo que supone un proceso de osificación endocondral. Estas zonas de cartílago con matriz calcificada se continúan hacia bordes de la zona lesionada hasta contactar con las trabéculas de tejido óseo intacto. Estas observaciones son especialmente evidentes en las secciones teñidas con la técnica de Von Kossa /Rojo Neutro Ácido ya que en ellas, mientras la matriz cartilaginosa ofrece una tonalidad roja, la parte calcificada aparece de color pardo. Así, observamos regiones de cartílago calcificado entre las que quedan “islas” aun por calcificar. Además puede comprobarse cómo las zonas de calcificación del cartílago contactan, sin solución de continuidad con el hueso adyacente.

Es de destacar el hecho de que en la parte profunda de la lesión, en el hueso subcondral, el proceso de osificación es centrípeto, se dirige claramente desde los bordes hacia el centro. De hecho puede verse claramente cómo la parte central del área lesionada está compuesta de cartílago sin calcificar. Sin embargo, en la parte superior de la lesión del hueso subcondral, en el lugar en el que tendría lugar la inserción del cartílago articular sobre el hueso, las zonas de tejido cartilaginoso en proceso de calcificación no se encuentran sólo en los bordes, si no que aparecen zonas aisladas de calcificación que demarcan, en conjunto, el borde superior del hueso subcondral.

Todo esto puede apreciarse en las imágenes de las distintas tinciones, pudiéndose comparar con el cartílago normal. (Figura 12, 13, 14, 15)

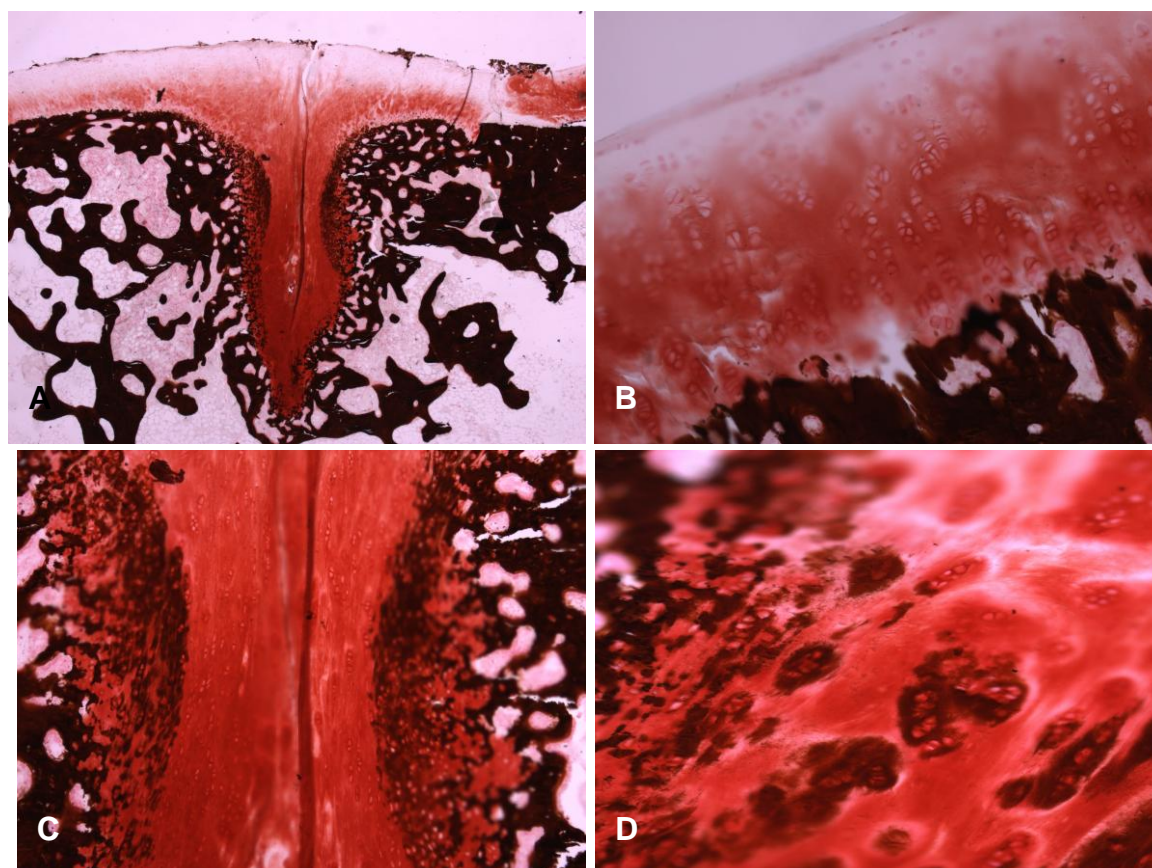


Figura 12: Tinción de Von Kossa. A. Visión global del defecto osteocondral x20, 50 ; B. Cartílago articular normalizado x200; C. Zona de lesión osteocondral (Zona 3) x100; D. Grupos isógenos osificándose, parte profunda x200.



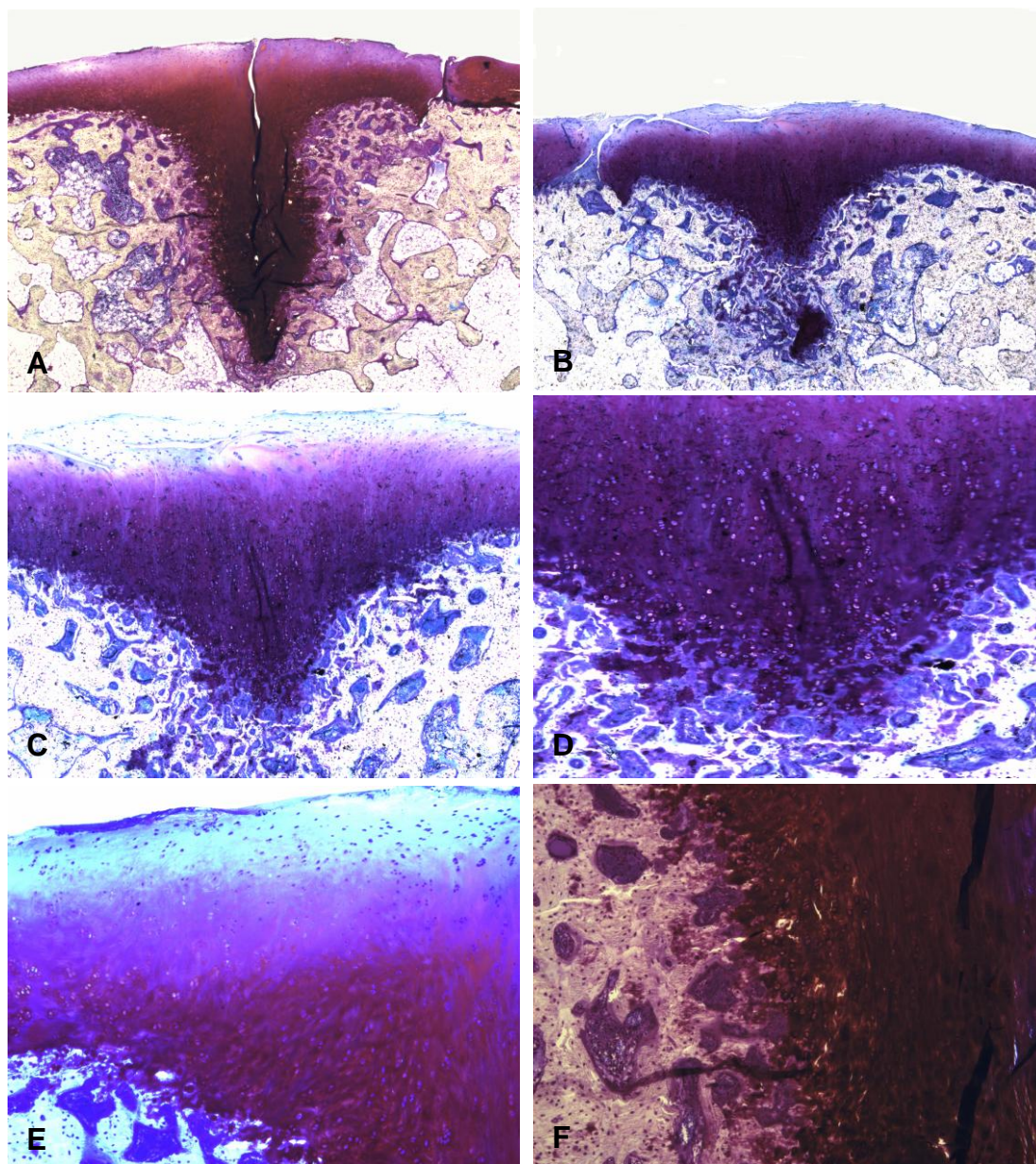


Figura 13: Tinción de Azul de toluidina; A. Zona lesión global x20, 50; B. Zona lesión global con mayor recuperación subcondral x20, 50; C. Zona lesión global x50; D. Zona profunda subcondral x100; E. Zona más superficial del cartílago x100; F. Zona lesión profunda x100.



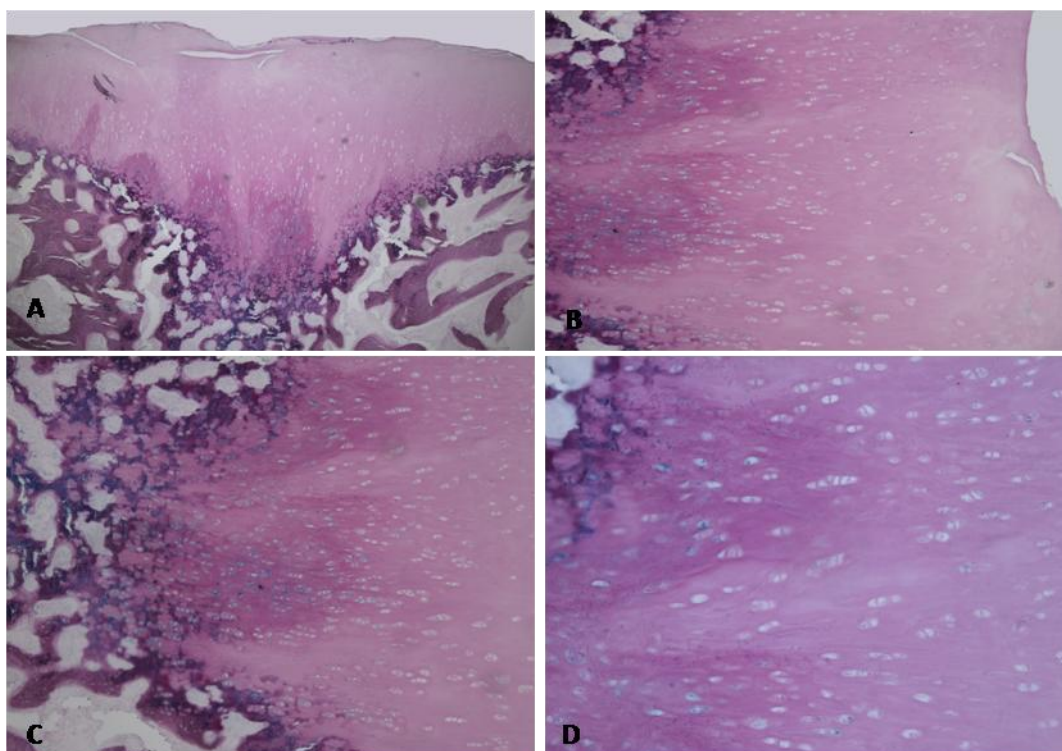


Figura 14: Tinción de Azul- Alcían + PAS+ Hematoxilina; A. Zona de lesión global x50; B. Zona de cartílago articular x100; C. Zona de lesión junto a hueso subcondral x100; D. Zona de lesión del cartílago articular a x200.

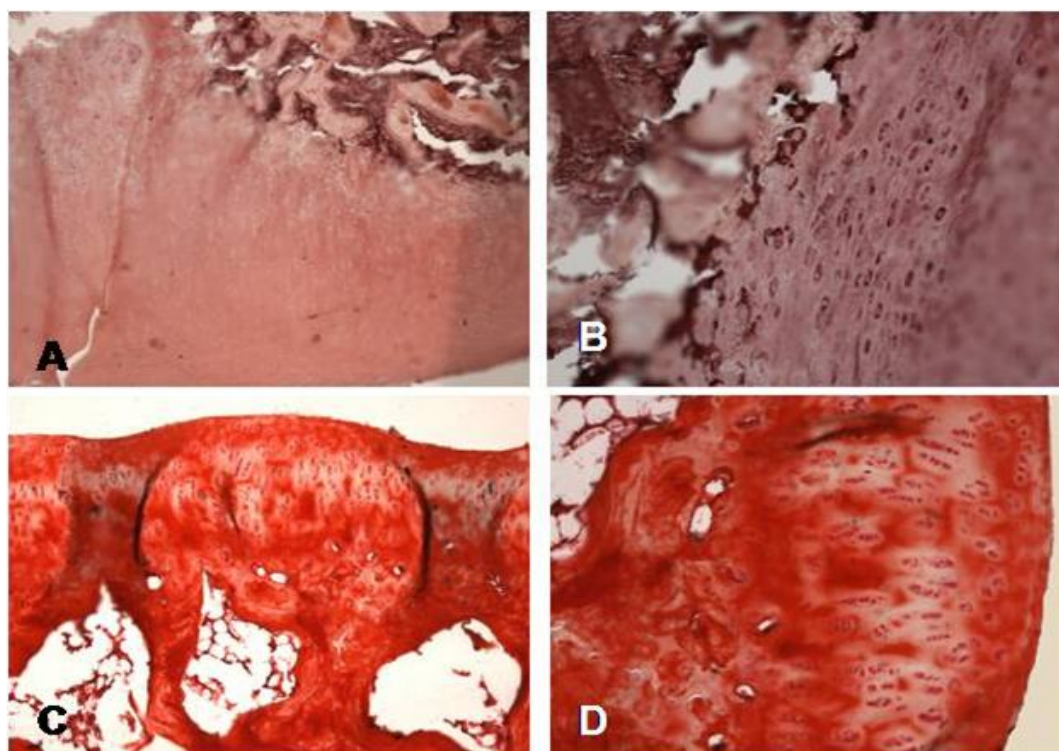


Figura 15: A. Tinción Orceína Azul Alcían x100; B. Tinción Orceína Azul Alcían x200; C. Tinción de Movat x100; D: Tinción de Movat x200.

#### **5.3.2.4. Aspecto microscópico de las rodillas control.**

En las secciones transversales de las rodillas no tratadas con células stem puede apreciarse claramente la región en la que se produjo el defecto osteocondral. El defecto, que afectó tanto al cartílago articular como al hueso subcondral, presenta una apariencia histológica característica en todos los animales estudiados. A baja magnificación observamos que el espacio ocupado por la lesión, en la zona superficial, está relleno por una delgada capa de tejido, de grosor notablemente inferior al cartílago articular circundante no lesionado. Este tejido se asienta sobre trabéculas de tejido óseo subcondral regenerado.

##### **Región articular**

En la superficie articular detectamos, en la zona de lesión, un tejido de grosor notablemente inferior al del cartílago articular, no lesionado, que se sitúa dispuesto sobre una base de trabéculas de hueso subcondral que aparece prácticamente regenerado. Este tejido superficial tiene, en la mayor parte de los animales, y en gran parte de su extensión, una apariencia fibrosa, compatible con las características del fibrocartílago. Se encuentra formado por células de pequeño tamaño y morfología ovoide, con su eje mayor orientado en sentido paralelo a la superficie articular. Las células se encuentran inmersas en una matriz con alta densidad de fibras, que presentan la misma orientación que las células, es decir, paralelas a la superficie articular. El grosor de este fibrocartílago muestra ligeras variaciones entre los diferentes animales. En aquellos en los que este fibrocartílago ha adquirido un mayor grosor, en la parte más profunda del mismo, se observan células de morfología más redondeada que las superficiales, pero nunca presentan el aspecto característico de los condrocitos del cartílago hialino. Más aún, la matriz que rodea tanto a estas células como a las más superficiales, en las secciones teñidas con azul de toluidina, no suele demostrar metacromasia, tiñéndose específicamente del típico color azulado ortocromático de este colorante.

Por otra parte, este tejido rara vez se ve integrado con el cartílago hialino circundante. Por el contrario, es relativamente frecuente observarlo extendiéndose por la superficie del cartílago no lesionado, sin integrarse con el mismo.

##### **Hueso subcondral**

En el tiempo de recuperación de los animales tras la lesión, comprobamos que el fibrocartílago anteriormente descrito se asienta sobre trabéculas óseas de nueva formación. En contra de lo que ocurre en las rodillas tratadas con células stem, no se aprecia un relleno de tejido cartilaginoso en la región ósea lesionada. En la zona de lesión encontramos trabéculas óseas que delimitan

lateralmente la región lesionada y otra serie de laminillas situadas en posición superficial sobre la que se asienta el fibrocartílago antes referido. El resto de la zona de lesión se encuentra ocupada por un notable número de adipocitos, así como por grupos de células pertenecientes a la médula ósea.

Las trabéculas óseas identificadas en la zona de lesión, especialmente las localizadas en la región inmediatamente subyacente al fibrocartílago, consideramos que son de nueva generación en función de determinados aspectos que las diferencian del resto de hueso circundante. Por una parte, la matriz ósea de estas trabéculas adquiere, con azul de toluidina, una coloración azulada, mientras que las trabéculas óseas no afectadas por la lesión apenas toman coloración. Pero, además, inmersas en estas trabéculas de la zona lesionada, se pueden apreciar grupos de células de aspecto condrocítico, rodeadas de una matriz claramente metacromática, alrededor de la cual se encuentran depósitos de matriz ósea.

Como resumen podemos apuntar que en los animales a los que no les fueron añadidas células stem, tras el tiempo de recuperación establecido, observamos una cierta recuperación del hueso subcondral en forma de trabéculas, no muy numerosas, ya que la densidad de éstas, respecto al resto de hueso circundante es notablemente menor. De hecho, la zona de lesión sigue siendo claramente identificable. No obstante, especialmente en la región limitante con el cartílago articular, aparecen trabéculas que cierran completamente el orificio provocado por la lesión. Estas trabéculas óseas parecen derivadas de tejido cartilaginoso sujeto a osificación endocondral. Aunque no podemos determinar con exactitud el origen de este tejido cartilaginoso, es muy probable que derive de los bordes de cartílago hialino que rodean la zona de lesión.

Sobre las trabéculas óseas regeneradas en la zona de lesión se produce una proliferación de fibrocartílago de mayor o menor grosor, pero que, aunque en las regiones profundas presenten células de morfología esférica, que en cierta medida recuerdan el aspecto del cartílago hialino, hasta el momento de recuperación analizado, nunca regeneran el cartílago articular normal.

Todas estas características descritas, se pueden apreciar en las diferentes tinciones siguientes. (Figura 16)



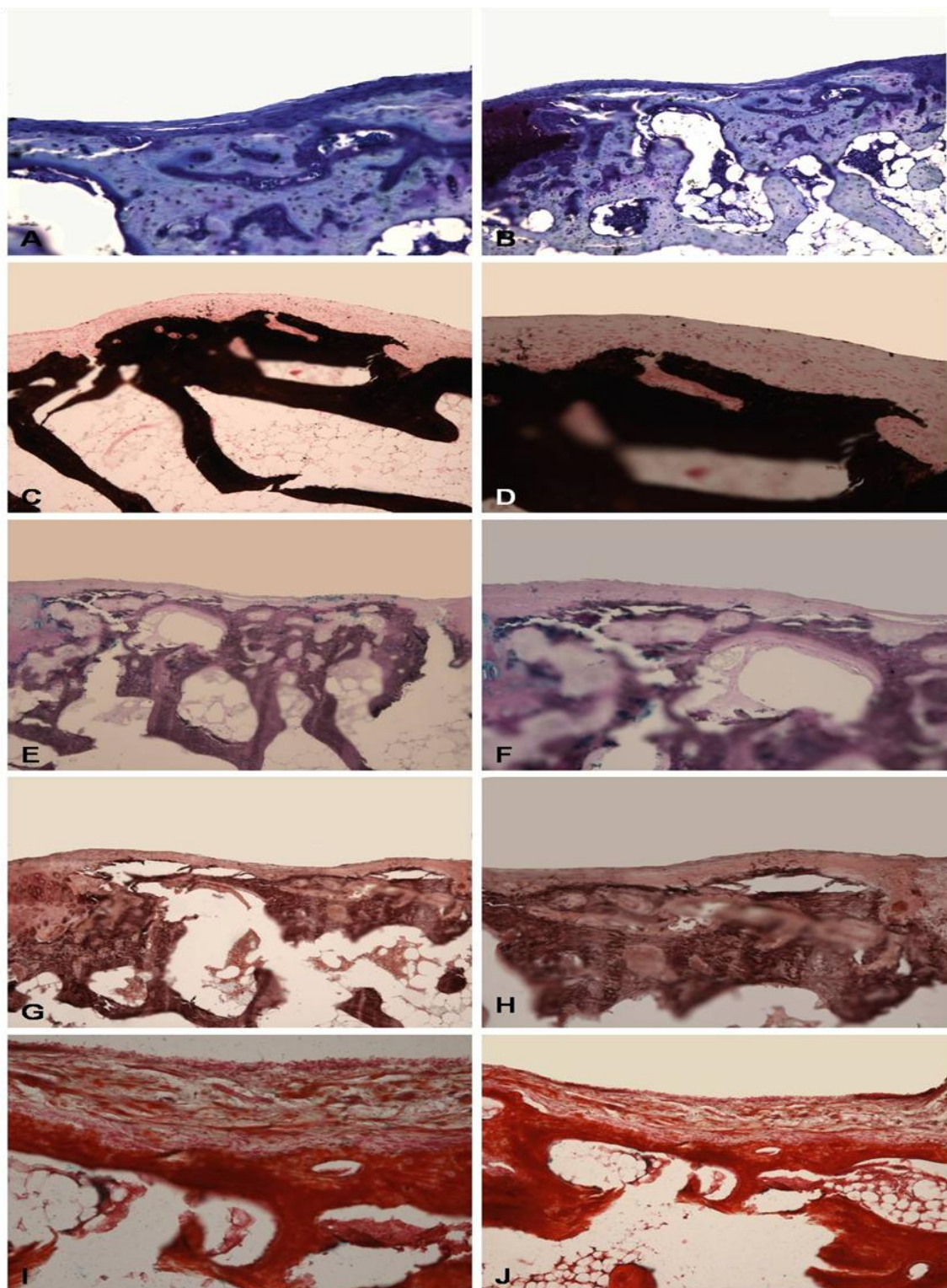


Figura 16: Tinción Azul de toluidina. A. Zona lesionada sin regenerar x100; B. Zona lesionada sin regenerar x200; Tinción de Von Kossa. C. Zona lesionada sin regenerar x100. D. Zona lesionada sin regenerar x200; Tinción azul alcian PAS hematoxilina. E. Zona lesionada sin regenerar x100. F. Zona lesionada sin regenerar x200; Tinción Orceína azul alcian. G. Zona lesionada sin regenerar x100. H. Zona lesionada sin regenerar x200; Tinción de Movat. I. Zona lesionada sin regenerar x100. J. Zona lesionada sin regenerar x200.

### 5.3.2.5. Análisis de la escala de valoración histológica.

Categoría	RODILLA DERECHA					
	conejo 1	conejo 2	conejo 3	conejo 4	conejo 5	conejo 6
MORFOLOGÍA CELULAR	4	4	4	4	4	4
METACROMASIA MATRIZ	3	3	2	3	3	2
REGULARIDAD SUPERFICIE	3	3	2	2	3	2
GROSOR DEL CARTÍLAGO	3	3	3	3	3	2
INTEGRACIÓN CON TEJIDO ADYACENTE	2	2	1	2	2	1
<b>TOTAL</b>	<b>15</b>	<b>15</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>15</b>	<b>11</b>
<b>MEDIA</b>	<b>13,5</b>					

Categoría	RODILLA IZQUIERDA					
	conejo 1	conejo 2	conejo 3	conejo 4	conejo 5	conejo 6
MORFOLOGÍA CELULAR	2	2	1	1	2	2
METACROMASIA MATRIZ	1	2	1	1	2	2
REGULARIDAD SUPERFICIE	2	2	2	1	2	2
GROSOR DEL CARTÍLAGO	1	1	1	0	1	1
INTEGRACIÓN CON TEJIDO ADYACENTE	2	2	1	0	1	1
<b>TOTAL</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>8</b>	<b>8</b>
<b>MEDIA</b>	<b>5,6</b>					

Tabla 6: Resumen de los datos de la escala de valoración histológica.

	Grupo	N	Rango promedio
TOTAL	0	6	3,50
	1	6	9,50
	Total	12	
MORFOLOGÍA CELULAR	0	6	3,50
	1	6	9,50
	Total	12	
METACROMASIA MATRIZ	0	6	4,00
	1	6	9,00
	Total	12	
REGULARIDAD SUPERFICIE	0	6	4,75
	1	6	8,25
	Total	12	
GROSOR DEL CARTÍLAGO	0	6	3,50
	1	6	9,50
	Total	12	
INTEGRACIÓN CON TEJIDO ADYACENTE	0	6	5,33
	1	6	7,67
	Total	12	

Tabla 7: Resultados del análisis mediante Kruskal-Wallis.

	TOTAL	MORFOLOGÍA CELULAR	METACROMASIA MATRIZ	REGULARIDAD SUPERFICIE	GROSOR DEL CARTÍLAGO	INTEGRACIÓN CON TEJIDO ADYACENTE
Chi-cuadrado	8,547	9,900	6,548	4,083	9,659	1,556
gl	1	1	1	1	1	1
Sig. asintót.	,003	,002	,011	,043	,002	,212

El estudio estadístico nos muestra una media total en los conejos tratados con stem cells de 13,5, muy cercana a la que correspondería con un cartílago perfecto (15 puntos) y en los conejos control de 5,6. El análisis de la media por subclase de categorías valoradas, también refleja una mayor puntuación en los especímenes tratados con respecto a los controles (Tabla 6).

La comparación de estas medias, mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis refleja diferencias estadísticamente significativas en todas las subclases menos en la referente a la integración con el tejido adyacente (Tabla 7)

### 5.3.2.6. Análisis de la inmunohistoquímica.

Con objeto de identificar la persistencia de células stem humanas en la zona de lesión y determinar su participación en el proceso regenerativo realizamos la detección, mediante técnicas de inmunofluorescencia, de la proteína de 60 KDa específica de mitocondrias humanas. La detección, por tanto, de los elementos celulares positivas a dicha técnica nos permite identificar células humanas procedentes de la población que se introdujo en la zona de lesión en las rodillas derechas de los animales experimentales. La contratinción con el fluorocromo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), nos permite identificar los núcleos celulares de todas las estirpes celulares tanto humanas como de conejo.

En las imágenes de inmunofluorescencia obtenidas podemos detectar la presencia de células inmunomarcadas para el marcador mitocondrial humano exclusivamente en las secciones procedentes de rodillas derechas mientras que en las rodillas izquierdas el resultado era nulo.

En las rodillas derechas, en la parte correspondiente al cartílago articular regenerado se observan células positivas para el marcador con morfología inequívoca de condrocitos. Éstos se encuentran agrupados en grupos isógenos en las que las células adoptan una disposición columnar. Junto a ellas podemos observar núcleos celulares de morfología esférica, que presumiblemente pertenecerán a condrocitos, en este caso pertenecientes al tejido del conejo. De este modo demostramos que, tanto las células stem humanas como las del propio animal, contribuyen a la reparación del defecto. Es llamativo, sin embargo, que en las zonas de formación de hueso subcondral en las que está teniendo lugar un proceso de osificación endocondral, la mayor parte de los elementos que participan en este proceso ofrecen inmunomarcaje positivo para el marcador mitocondrial humano.

En las rodillas izquierdas, como era de esperar, no encontramos ninguna célula inmunopositiva para el marcador mitocondrial humano. Mediante el marcaje con DAPI, que pone de manifiesto los núcleos celulares, observamos la presencia de éstos en la región de fibrocartílago resultado de la reparación de la zona articular. La morfología nuclear, que se corresponde con la celular en su conjunto, es ovoide, con su eje mayor orientado a la superficie. En las regiones pertenecientes a las trabéculas óseas de hueso subcondral observamos el marcaje nuclear con la morfología característica de osteoblastos/osteocitos. Entre las trabéculas óseas se observa una densa presencia de núcleos celulares pertenecientes a las diferentes estirpes de células de la médula ósea. (Figura 17)

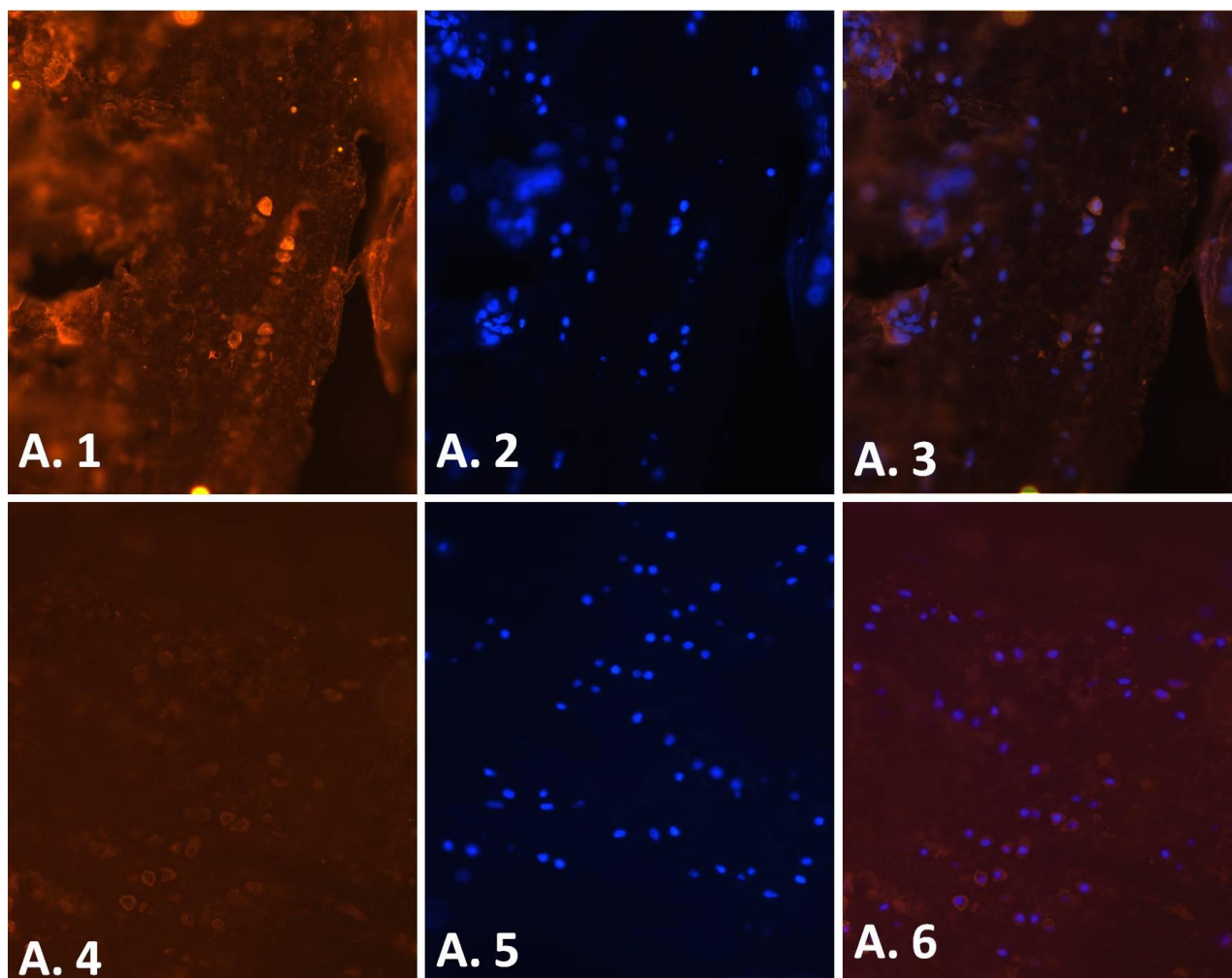


Figura 17. A: Inmunofluorescencia. Rodilla derecha: A.1. Condrocitos positivos al marcador mitocondrial humano X200; A.2. Contratinción con DAPI para demostración de los núcleos de todas las estirpes celulares X200; A.3. Imágenes acopladas x200; A.4. Condrocitos positivos al marcador mitocondrial humano X400; A.5. Contratinción con DAPI para demostración de los núcleos de todas las estirpes celulares A.6. Imágenes acopladas x400.



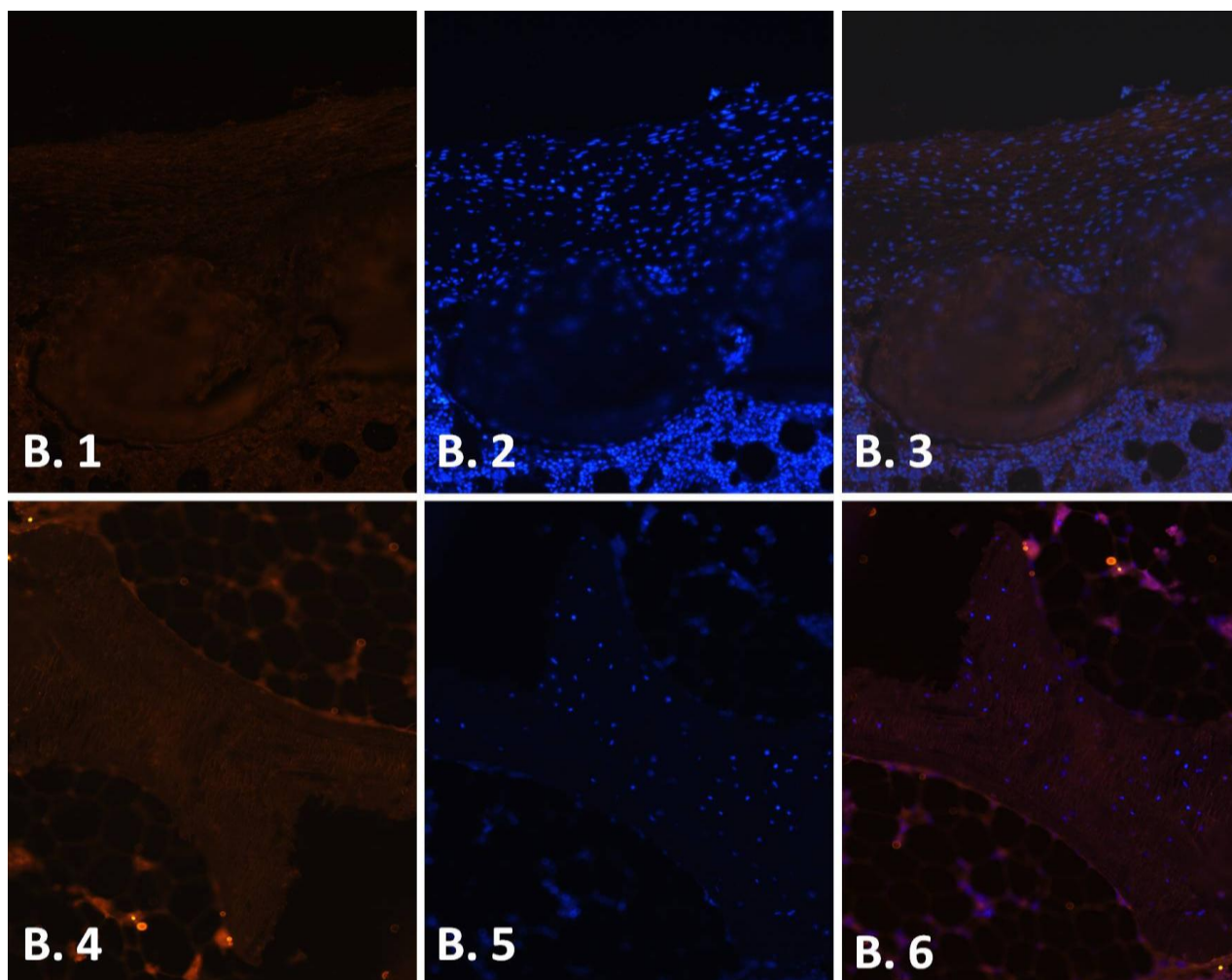


Figura 17.B: Inmunofluorescencia. Rodillas izquierdas: B.1. Ausencia de marcaje inmunofluorescente para marcador mitocondrial humano x200; B.2. Contratinción con DAPI para demostración de los núcleos de todas las estirpes celulares X200; B.3. Imágenes acopladas x200; B.4. Ausencia de marcaje inmunofluorescente para marcador mitocondrial humano x400; B.5. Contratinción con DAPI para demostración de los núcleos de todas las estirpes celulares X400; B.6. Imágenes acopladas x400.

## **DISCUSIÓN**

## 6. DISCUSIÓN

Los defectos osteocondrales son lesiones por discontinuidad del cartílago articular y del hueso subcondral de las articulaciones diartrodias. Las articulaciones más afectadas son la rodilla y el tobillo, siendo alta su incidencia.

Las lesiones se ocasionan más comúnmente en la cuarta década de la vida tras traumatismos agudos de intensidad alta a moderada, siendo menos frecuentes estos defectos, en traumas de menor intensidad, pudiendo ocasionar osteoartritis.

En estudios basados en 993 artroscopias, valoradas según la Sociedad Internacional de Reparación del Cartílago (ICRS), las lesiones osteocondrales aparecen en el 66% de los pacientes, de las cuales el 11% presentaban lesiones susceptibles de tratamiento reparador<sup>186</sup>. Curl et al.<sup>187</sup> encontraron en 31000 artroscopias un 63% de estas lesiones. Estudios como estos muestran la infraestimación de la incidencia de esta patología y la necesidad de un debate sobre su diagnóstico y tratamiento.

La historia natural de las lesiones cartilaginosa aunque ha sido ampliamente estudiada presenta todavía aspectos no bien del todo conocidos. Muchas de ellas son referidas a las alteraciones moleculares implicadas en el proceso de deterioro tisular. Existen diversos estudios sobre la estructura del cartílago y modelos de envejecimiento y reparación. La estructura avascular y la complejidad de la matriz extracelular del cartílago condicionan una deficiente capacidad de reparación, lo que supone que este tipo de lesiones condrales conduzcan al desarrollo de un proceso degenerativo articular, la artrosis, que suele requerir tratamiento mediante el reemplazamiento articular<sup>188,189</sup>.

La artroplastia total, continúa siendo el tratamiento más eficaz en la fase final de la osteoartrosis, pero plantea muchas incertidumbres en su implantación en pacientes jóvenes, debido a la limitada supervivencia de estas en el tiempo.

La mejor forma de darse cuenta de la importancia de esta lesión es hablar en términos económicos, así consultoras especializadas en el sector sanitario como la Techvest Firm estima que unas 427.800 artroscopias son realizadas a pacientes con lesiones condrales. Teniendo un mercado potencial en el tratamiento de estas lesiones entre 300 millones a 1 billón de dólares en EEUU. En el 2001 la osteoartrosis supuso en EEUU 60 billones de dólares<sup>190</sup> y en el mundo se implantan 1,3 millones de artroplastias totales de cadera y rodilla cada año, lo que supone un coste anual de 40 billones de dólares. Con todos estos datos se puede entender los esfuerzos de los cirujanos ortopédicos en investigar en este campo<sup>191</sup>.



Es bien conocido el gran interés de los cirujanos ortopédicos, en lograr una reparación lo más similar al cartílago nativo de sus pacientes, intentando evitar la sustitución de éste, por artroplastias. Este objetivo trata de restaurar íntegramente la estructura y función del cartílago dañado. Actualmente, esta opción no ha sido totalmente alcanzada a pesar del desarrollo de nuevas técnicas de reparación, sustitución y regeneración, con muy diferentes resultados entre ellos, lo que ha suscitado un gran número de estudios para valorar la eficacia entre cada técnica.

Se conoce la gran importancia de factores como, la profundidad del defecto, el diámetro del mismo, la edad del paciente, el tipo de traumatismo y la alineación de la articulación en el éxito final de estos tratamientos <sup>188</sup>

Los primeros intentos de reparación fueron realizados por Burman<sup>192</sup> en 1934 mediante un desbridamiento artroscópico, posteriormente Pridie<sup>193</sup> en 1959 publicó su técnica de estimulación medular mediante las microfracturas. El tratamiento por microfracturas es una técnica muy difundida en nuestros días que ha suscitado múltiples estudios sobre su eficacia.

Así, autores como Knutsen et al <sup>194</sup> no encontraron diferencia en lesiones del cóndilo femoral entre la microfractura y el ACI, pero los pacientes tratados con microfractura para lesiones pequeñas mostraron mejores resultados que para grandes defectos. Por el contrario, Gudas et al <sup>195</sup> observaron que entre las lesiones mayores de 2 cm<sup>2</sup>, en la parte central del cóndilo femoral, las tratadas con microfractura mostraron peores resultados que las tratadas con autoinjerto osteocondral en pacientes menores de 40 años. Estudios como los de Gobbi et al.<sup>196</sup>, Cerynik et al.<sup>197</sup> y Kreuz et al.<sup>198</sup> que valoran aisladamente el uso de microfracturas en defectos condrales, reportaron mejoría clínica a corto plazo, más destacadas, en pacientes menores de 40 años, en lesiones menores de 2 cm<sup>2</sup> y sin intervenciones previas. Por tanto el empleo de esta técnica de reparación nos exige una correcta selección del paciente según su edad, tipo de lesión y acontecimientos previos en su tratamiento. Nuevas tendencias en el campo de las microfracturas, buscan estabilizar el coagulo, mediante el uso de membranas o la adicción de factores de crecimiento que se están investigando <sup>197</sup>. Las limitaciones de esta técnica a pesar de estos buenos resultados clínicos, son las dudas acerca de la calidad y duración del fibrocartílago obtenido, ya que, el tejido nuevo difiere mucho del cartílago articular normal, con aumento de la cantidad de colágeno tipo I, alteración de la arquitectura tisular y orientación aleatoria de las fibras de colágeno. Este tipo de cartílago puede degenerar con el paso del tiempo, con la aparición de fibrilación y pérdida de la integridad estructural <sup>197</sup>.

En la década de los noventa Garret <sup>199</sup> (1994) y posteriormente Hangody y Fules <sup>200</sup> (2003) trataron los defectos osteocondrales mediante técnicas de sustitución, tanto por injertos alogénicos como autólogos.

De los estudios sobre los injertos autólogos (mosaicoplastia) destaca el de Hangody et al.<sup>200</sup>. que mostraron macroscópicamente e histológicamente que sobrevivía el cartílago hialino y que el tejido compuesto estaba formado por un 80% de cartílago hialino trasplantado y un 20% por fibrocartílago, con buenos resultados clínicos. También Oztürk et al.<sup>201</sup> y Nho et al.<sup>202</sup> presentaron excelentes resultados con el empleo de la mosaicoplastia en el tratamiento de las lesiones osteocondrales. Estudios comparativos entre mosaicoplastia y ACI, realizados por Dozin et al.<sup>203</sup> concluyeron con resultados equivalentes entre las dos técnicas, teniendo más rápida recuperación con la mosaicoplastia. Las limitaciones de esta técnica son la morbilidad de la zona donante y el relleno de los espacios que quedan entre los defectos implantados por fibrocartílago, llegando a provocarse un sobrecrecimiento de tejido fibroso sobre el tejido adyacente. Se ha comprobado, que no se llegaba a producir unión periférica entre el tejido trasplantado y el local. Por estas razones, algunos autores buscaron soluciones tales como el hecho de asociar técnicas de ingeniería de tejidos a la mosaicoplastia, para logran una mejor integración entre tejidos. <sup>204, 205</sup>.

Las técnicas de aloinjertos permiten tratar lesiones más amplias que los autoinjertos y evitar la morbilidad de las zonas donantes. Gross, et al <sup>206</sup> han publicado resultados de aloinjertos frescos, conservados a 4° C e implantados a las 24 horas desde su obtención. Este grupo realizó implantes en 126 rodillas de 123 pacientes entre 1972 y 1992, con buenos resultados clínicos en el 95% de los casos a los cinco años, 85 % a los 10 años y un 66% a los 20 años. Otros como Chu et al.<sup>207</sup>, Ghazavi et al. <sup>208</sup>, Bugbee et al.<sup>209</sup>, o Davidson et al.<sup>210</sup> describen buenos resultados en la implantación de aloinjertos, mejorando las escalas clínicas de evaluación con un tiempo de seguimiento a largo plazo, presentando limitaciones de estos, en pacientes con lesiones tanto en fémur como en tibia y en pacientes laborales. No se informa de resultados concluyentes en lesiones femoropatelares, siendo estos dispares como los presentados por Chu et al.<sup>207</sup> o Jamali et al.<sup>211</sup>. Los problemas que muestran los aloinjertos son los riesgos de transmisión de enfermedades e infecciones, inmunocompatibilidad o el alto coste, así como la disminución de la viabilidad de los condrocitos durante la preservación de los injertos. <sup>212, 213</sup>

Las técnicas de regeneración tisular surgieron en 1987 en Suecia de la mano de Peterson <sup>214</sup> que describió la técnica ACI, estos obtuvieron 37 biopsias de pacientes tratados con ACI. En el 80% de los especímenes se halló un tejido similar al cartílago. El tejido de reparación después de ACI, puede alcanzar hasta el 90% de consistencia del cartílago hialino genuino y es muy diferente

del fibrocartílago<sup>214, 215</sup>. También Brittberg et al.<sup>216</sup> presentó buenos resultados clínicos en pacientes con 44 meses de seguimiento en lesiones femorales. Los estudios comparativos con otras técnicas presentan resultados dispares. Así Zaslav et al.<sup>217</sup> comparan ACI con microfracturas, no presentando diferencias entre ellas, pero sí mejorando la calidad de vida y el dolor con ACI. En cambio Anderson et al. sí encuentra diferencias a favor de ACI con respecto a microfracturas y Knutsen et al.<sup>194</sup> presenta mejores resultados clínicos a favor de microfracturas, no habiéndolas en la observación por artroscopia ni en la histología. En la comparación entre ACI y mosaicoplastia, Bentley et al.<sup>218</sup> encontraron diferencias a favor del primero. El estudio entre ACI y aloinjertos Bentley et al.<sup>218</sup> encontraron mejor apariencia artroscópica en ACI y Horas et al.<sup>69</sup> mejores resultados clínicos en injertos. Las complicaciones de esta técnica ACI fueron estudiadas por Wood et al.<sup>219</sup> y Peterson et al.<sup>220</sup> presentándose en el 46 % de los tratados, destacando entre ellas el fallo del implante, la delaminación y la hipertrofia del injerto. De los que presentaron complicaciones el 96 % fueron reintervenidos.

La técnica de ACI se ha intentado mejorar con la adhesión de biomateriales para darle a las células una estructura primaria donde poder desarrollar el tejido. Ésta se denomina técnica MACI, las membranas más usadas son de colágeno o de ácido hialurónico. Múltiples estudios se han desarrollado para valorar la eficacia de estos implantes con biomateriales, destacan los de Zheng et al.<sup>221</sup>, Behrens et al.<sup>222</sup> y Trattnig et al.<sup>223</sup> para membranas de colágeno y los de Bartlett et al.<sup>224</sup>, Marcacci et al.<sup>225</sup> y Gobbi et al.<sup>226</sup> para membranas de ácido hialurónico, presentando todas mejorías clínicas en lesiones osteocondrales y mejoría de señal en la RMN. La comparación entre el MACI y las microfracturas o abrasiones de Kon et al.<sup>227</sup> y Visna et al.<sup>228</sup> se aprecia mejoría de la lesión en las dos técnicas, pero mejores resultados con el MACI. Entre ACI y MACI, Bartlett et al.<sup>224</sup> no encontraron diferencias clínicas, ni artroscópicas ni histológicas entre las dos técnicas.

Se ha visto que todas las técnicas usadas en el tratamiento de los defectos osteocondrales mejoran con respecto al estado previo, pero no se puede concluir a favor de ninguna de ellas, siendo necesario estudios a largo plazo y bien diseñados. Magnussen et al.<sup>229</sup> y Jakobsen et al.<sup>230</sup> destacan la falta de criterios unificados en la valoración de estas técnicas, debiendo usar escalas de valoración estandarizadas como el SF 36, WOMAC y el International Knee Documentation Committee score, con seguimientos a los 5 y 10 años y análisis tanto artroscópico como histológico, que darían una visión clara de qué técnica usar.

Actualmente la indicación de cada técnica depende de la interpretación del cirujano, las características del paciente y la localización de la lesión y de su tamaño. También se debe tener en cuenta la cantidad de limitaciones de cada

técnica, como la lesión de la zona donante y la escasez de tejido en los injertos osteocondrales, la lesión de múltiples áreas en la mosaicoplastia, las reacciones inmunes en implantes de condrocitos alogénicos y la transmisión de enfermedades en implantes xenogénicos de condrocitos<sup>231</sup>.

El conocimiento y aplicación cada vez más extendido de las células progenitoras, con capacidad para diferenciarse en diversas líneas celulares, ha permitido su utilización como tratamiento de diversa entidades. En este sentido la terapia celular parece reunir las cualidades ideales para la regeneración en patología osteoarticular.

Las técnicas ACI y MACI fueron los primeros pasos en esta dirección, siendo hoy en día el concepto de MACI el fundamento de la terapia celular en el abordaje de las lesiones osteocondrales.

Los elementos básicos de esta técnica son un soporte o matriz tridimensional adecuada, células con una capacidad de diferenciación y características adecuadas para poder sintetizar la matriz a largo plazo y por último, sustancias estimuladoras de las células o un microambiente adecuado para acogerlas. Todos estos elementos combinados son el fundamento para el tratamiento de defectos condrales y osteocondrales que deben ser valorados en apropiados modelos animales antes de valorarse en humanos<sup>232</sup>.

La elección del modelo animal ya resulta un paso complejo, así cada tipo presenta ventajas y desventajas que se deben barajar. Los modelos en roedores son un paso intermedio entre estudios in vitro y modelos de animales más grandes y son buenos para conocer comportamientos moleculares básicos y nuevos carriers y matrices. El modelo en conejos nos sirve para crear defectos de 4 mm, posee cóndilos grandes, el cartílago no se regenera intrínsecamente, el coste es bajo y su mantenimiento y obtención es sencillo. Las desventajas son que el 80% del defecto es en hueso subcondral y de una profundidad de 4 mm, también en este modelo la biomecánica es muy diferente en comparación con la de los humanos. Los modelos caninos serían muy adecuados ya que sufren artrosis, se les puede practicar artroscopias y se les puede educar para una correcta fisioterapia, el problema de usarlos son las connotaciones éticas que presentan. Los modelos caprinos presentan defectos parecidos a los humanos, se les puede realizar artroscopia pero presentan dificultad en la rehabilitación y control de la carga y su articulación es pequeña comparada con los humanos. Los modelos porcinos presentan una articulación muy similar a los humanos, se les puede realizar artroscopias pero presentan dificultad en obtenerlos, mantenerlos y conseguir un adecuado protocolo de rehabilitación. Los modelos equinos presentan una articulación muy parecida a la de los humanos, sufren osteoartrosis, el espesor del cartílago es de 1,75 mm

y se les puede realizar artroscopia pero presentan las desventajas de su coste, obtención y mantenimiento <sup>190</sup>.

En nuestro trabajo hemos optado por un modelo en conejo, ya que tenemos larga experiencia, su obtención y mantenimiento es poco costoso, pudiendo comprobar la seguridad, eficacia y validez de nuestras hipótesis en cuanto al uso de nuestro hidrogel proteico. Después de presentar estos prometedores resultados deberíamos continuar nuestra línea de investigación, con modelos de animales grandes, como el equino o caprino, antes de la práctica de un ensayo con humanos. Ya que el volumen medio de un defecto osteocondral es de 550 mm<sup>3</sup>, 10 mm de profundidad y un espesor condral máximo de 2,35mm en humanos, y en conejos sólo podemos estudiar lesiones osteocondrales de 3-4 mm de profundidad y con un máximo espesor condral de 0,52 mm.

En la técnica ACI y MACI se ha visto que los condrocitos cultivados no reparan el hueso subcondral, pero si lográndolo las stem cells, esto resulta importante ya que la regeneración de defectos osteocondrales resulta más difícil que la de los condrales puros. Las stem cells deben presentar diferenciación hacia línea condral, ósea y adiposa, para mejorar la regeneración <sup>233</sup>, esto fue descrito por Ashton y Johnstone <sup>234</sup>. Este tipo de células pueden obtenerse de fuentes embriológicas o de donantes adultos, siendo más fácil estas últimas, por los problemas éticos y legales de las embriológicas. De los donantes adultos podemos conseguir stem cells de tejido mesenquimales, como del tejido adiposo, médula ósea, sinovial, periostio...poseyendo mejor capacidad de diferenciación condrogénicas las procedentes de sinovial y médula ósea <sup>235</sup>. La capacidad de diferenciación y proliferación de los condrocitos se ve mermada con la edad, por disminución de las telomerasas, esto explica porque el ACI en edades adultas genera resultados muy pobres, que puede evitarse con el uso de las MSC <sup>236</sup>. El número de células madre empleadas en la regeneración debe tener más densidad que las usadas en técnicas ACI <sup>234</sup>, así trasplantar  $5 \times 10^7$  células presenta mejores resultados que  $5 \times 10^6$  <sup>80</sup>. Muchas técnicas para la obtención de estas células han sido descritas, siendo la más sencilla y económica la punción aspiración de la médula ósea a través de la cresta iliaca, también se ha visto que las stem cells procedentes de esta vía no pierden capacidad de diferenciación, se obtienen fácilmente, pueden diferenciarse en múltiples linajes y expandirse rápidamente <sup>237, 238</sup>. Cada fuente tisular para las MSC tienen propiedades diferentes, por tanto para cada tipo de medicina regenerativa se debe usar la fuente de obtención más apropiada, como la empleada en la regeneración osteocondral procedente de la médula ósea que pueden diferenciarse tanto en condrocitos como osteocitos <sup>239, 240</sup>.

El nuestro estudio hemos empleado células mesenquimales humanas, procedentes de la médula ósea de la cresta iliaca de pacientes intervenidos en

cirugía raquídea bajo anestesia general, esta fuente de obtención nos parece fácil y resulta abundante, ya que al año en España se practican 21.320 cirugías de estas características. Las MSC fueron aisladas, cultivadas y expandidas de forma sencilla, comprobándose también el alto grado de diferenciación en estirpe condral y ósea. Su mezcla con el hidrogel, se realizó sin diferenciación alguna, ya que se ha visto que en modelos de xenotransplante, puede haber reacciones inmunológicas con células prediferenciadas, que se evitan con el uso de MSCs sin diferenciación, al inhibir la proliferación de células T<sup>191, 231</sup>.

El segundo elemento fundamental en la ingeniería tisular son las sustancias estimulantes, diferenciadoras y microambientales que logran que las células prediferenciadas, se diferencien completamente, proliferen y generen las propiedades necesarias para lograr una matriz, lo más parecida a la nativa y duradera<sup>239</sup>. Los primeros factores usados fueron el TGF- $\beta$  y la desametaxona, usadas por Johnstone (1998) para inducir la condrogénesis y así lograr mejorar el microambiente tisular y mantener el fenotipo celular<sup>241</sup>. Se ha visto que las MSC por sí mismas pueden regenerar el tejido pero con la asociación de factores los resultados mejoran<sup>234</sup>. Otras moléculas investigadas son las BMP que incrementan la condrogénesis, aumentando los proteoglicanos, acentuándose más con el subtipo 2 que con el 4 y el 6<sup>241</sup>. Otras moléculas estudiadas son el IGF-1, que es un mediador anabólico y mitótico del cartílago, que estimula la formación de cartílago y hueso, el EGF, que estimula las células mesodérmicas especialmente los fibroblastos y el bFGF, que potencia la mitosis de los condrocitos<sup>242</sup>. Por el contrario, en algunos estudios se puede apreciar que se puede lograr una satisfactoria regeneración sin incorporar este tipo de factores, siendo suficiente para la reparación la estimulación que ejerce el microambiente local de la lesión sobre el biomaterial<sup>243</sup>.

En nuestro modelo no hemos incorporado factores de crecimiento ni moléculas estimuladoras, ya que consideramos que el empleo de una densidad de MSC correcta y con un soporte adecuado como nuestro hidrogel, las propias stem cells pueden lograr una síntesis adecuada de una matriz lo más parecida a la nativa.

El último elemento fundamental en la ingeniería tisular es el empleo de un armazón, que aporte soporte a las células y logre reproducir una matriz lo más parecido a la nativa. Los materiales ideales serían los que logren una correcta integración y forma de los defectos, logrando una diferenciación celular y un reemplazamiento adecuado de los tejidos, siendo a la vez biocompatible y no citotóxico. Además deberían ser bioreabsorbible y biodegradable, con una porosidad adecuada para permitir la penetración y diferenciación celular y la nutrición de éstas<sup>244</sup>. El cartílago hialino es un material fluido, saturado, multifásico, homogéneo, anisótropo, no lineal y viscoelástico, por lo que con los clásicos biomateriales no se logra reproducir estas propiedades, no

comportándose de igual forma que el cartílago nativo a largo plazo, siendo necesario la investigación de nuevos biomateriales. Estos nuevos biomateriales desarrollados con multicapas y mezcla de ellos pueden lograr reproducir estas importantísimas cualidades <sup>245</sup>. Los diferentes tipos de materiales más empleados actualmente pueden ser biológicos como el colágeno, que permite una buena adhesión celular y de factores de crecimiento, el ácido hialurónico <sup>246</sup>, que permite una correcta proliferación celular, el chitosan, con gran biocompatibilidad y biodegradabilidad, entre otros. Por otro lado los sintéticos, cuya producción es ilimitada, pueden ser biocompatibles, osteoconductibles y pueden ser manipulados con facilidad, como el PGA (ácido de poliglactina), PLA (ácido poli-L-láctico), PCL (ácido policaprolactone), PLGA (fibras de poliglactina)... <sup>242, 247</sup>. Todos estos biomateriales han sido estudiados en múltiples modelos animales, no consiguiendo una recuperación total de las cualidades del cartílago nativo, ya que no consiguen producir una cantidad adecuada de colágeno I, II y X, que determinan una regeneración adecuada <sup>80, 231</sup>. Por todo esto, se han mezclando estos biomateriales buscando formar matrices multicapas, intentando recrear la profundidad de los defectos osteocondrales, las diferentes capas del cartílago e intentar mejorar la integración de la interfase entre el hueso y el cartílago <sup>80, 245, 247</sup>.

Debido a que el fin de todos estos estudios sobre regeneración condral, es el abordaje de estas lesiones en los seres humanos, debemos emplear bioelementos compatibles con la artroscopia. Por todo esto se han desarrollado en los últimos años múltiples hidrogeles que permiten esto. Se buscan hidrogeles hidrofóbicos, termorreversibles, siendo líquidos por debajo de 25°C, para adaptarse perfectamente a la forma de los defectos y sólidos por encima de 35°C, para mantenerse tras la implantación. También, con la capacidad de mantener la adhesión celular y los factores de crecimiento. Geles con estas propiedades son un copolímero de polipropileno fumarato de etilen glicol (PEG) y geles polipeptídicos como la elastina recombinante (ELR) <sup>246</sup>. Estos tipos de geles se logran gracias a la terapia génica que logran nanomateriales con dimensiones entre 1-100 nm, permitiendo formar matrices tridimensionales que logran propiedades fisicoquímicas muy similares al cartílago hialino <sup>242, 248</sup>.

Cabe destacar, que para la obtención de estos nuevos biomateriales, el empleo de la terapia génica recombinante resulta esencial, produciendo estos nanomateriales, modificando los genes de ciertas bacterias como el E. Coli, con vectores virales, que permite controlar mejor la síntesis de polímeros <sup>249, 250</sup>. También está siendo empleada para la producción de sustancias bioactivas como las BMP, TGF, IGF, entre otras, por las células incorporadas en los biomateriales, favoreciendo la diferenciación celular y el mantenimiento de la matriz creada <sup>232, 239, 246</sup>.

En nuestro estudio hemos utilizado un hidrogel proteico de última generación, termosensible, pudiendo usarse por vía artroscópica. Para su fabricación se ha empleado terapia génica recombinante, para generar un gel proteico de elastina recombinante, capaz de adherirse fácilmente a las MSCs y usarse con sencillez en un modelo animal. Esta elastina está formada por un pentapéptido (ValProGlyXaGly-VPGXG) que deriva de un dominio hidrofóbico de tropoelastina, que se puede emplear como membrana tipo films o como hidrogel que puede ser inyectado. Este gel ha sido empleado en ingeniería tisular de vasos arteriales. Nuestro hidrogel al solidificarse disminuye el diámetro del poro, permitiendo un mejor cultivo y distribución celular. La elastina disminuye la rigidez y la compresión de las fuerzas, aumentando la flexibilidad. Destacar, que al tener la matriz condral nativa gran cantidad de elastina y colágeno, al usar elastina en nuestro estudio como carrier nos aporta una injerto muy parecido al cartílago hialino<sup>249, 250</sup>.

Nos parece importante destacar el papel xenogénico de nuestro modelo. Se plantea el uso de este tipo, ya que los estudios autólogos y alogénicos presentan limitaciones, como la escasez de recursos. Existen pocas investigaciones y referencias en la literatura sobre este tema, destacando los trabajos de Osiecka-Iwan et al. que implantan células de rata en defectos osteocondrales de conejos, apreciándose rechazo y destrucción del injerto. En otros estudios en el que se implanto condrocitos de conejo en defectos de cabras hubo regeneración a las 52 semanas pero con reacción inflamatoria y regeneración de cartílago fibroso. Por el contrario existen estudios de implantes de condrocitos de cerdo en cartílago humano de cadáver in vitro, habiendo regeneración a las 12 semanas. También Ramallal et al. implantaron células de cerdo en conejos, teniendo regeneración a las 12 semanas sin reacción inmune. Existe mucha discusión sobre este tema, sin resultados aparentes, lo que si se aprecia es que el tipo de matriz, juega un importante papel en la inmunogenicidad, así como el grado de diferenciación celular, siendo las reacciones inmunes controladas con implantación de MSCs puras sin diferenciación, cosa que no ocurre con el uso de células prediferenciadas<sup>191, 231</sup>.

En nuestro caso hemos realizado un estudio de xenotransplante, de células MSCs puras de humanos sobre defectos osteocondrales en conejos. Nuestro objetivo era valorar el uso de células humanas con el gel de elastina recombinante, pensando en una futura aplicación artroscópica, estudiando así el buen comportamiento de estas células en el nanomaterial. También comprobamos la ausencia de reacción inmune ni la destrucción del injerto, valorando así, que el empleo de MSCs puras reducen estos rechazos y que el uso de matrices tan especializadas también.



La valoración de las técnicas empleadas en el tratamiento de los defectos osteocondrales requieren de una gran precisión, ya que deben evaluar la hipertrofia del periostio, la delaminación, la presencia de adherencias, la incongruencia de la superficie condral, la sinovitis y la reacción inflamatorias, siendo la RMN la técnica más usada<sup>251</sup>. La RMN es la prueba de imagen más comúnmente empleada para valorar lesiones condrales, siendo los resultados de técnica ACI y MACI valorados así<sup>251-253</sup>. Esta tendencia, está siendo empleada en la valoración de resultados en trabajos de ingeniería tisular. Así Uhl et al.<sup>254</sup> en 11 ovejas, practica RMN de 1,5 teslas en la valoración de un injerto osteocondral, encontrando isointensidad y buena congruencia con la superficie articular. Streitparth et al.<sup>255</sup> en ovejas, valora a los 6 meses la implantación de PLG con RMN, apreciando en la zona no regenerada fibrocartílago y esclerosis subcondral. Kangarlu et al.<sup>256</sup> en cabras valora el uso de una RMN de 8 teslas frente a otra de 1,5 apreciándose que a mayor teslas, mejor diferenciación de los tejidos. Kim et al.<sup>257</sup> valora en un modelo de conejos, la implantación de biomateriales, en un defecto osteocondral, concluyendo que la secuencia T2 se relaciona con la cantidad de colágeno de la regeneración. También destacar los últimos estudios del empleo de gadolinio, como contraste en la realización de la RMN, por la mejora de la valoración del cartílago articular<sup>184, 258</sup>. Por el contrario, el empleo del TAC en la valoración de este tipo de procedimiento es escaso, ya que el cartílago no es bien valorado con esta técnica, siendo más usado en el estudio del hueso subcondral<sup>259</sup>.

En la valoración de nuestros resultados, aparte del “gold” estándar, que es el estudio histológico hemos empleado la RMN y el TAC multicorte con reconstrucción 3D. Con el empleo de la RMN hemos podido valorar el cartílago lesionado y el grado de regeneración, con la limitación de ser una RMN de 1,5 teslas y no haber podido emplear contrastes. Con la realización del TAC, hemos podido apreciar, el comportamiento del modelo a nivel del hueso subcondral, con mayor precisión que con la RMN, viendo que esta técnica puede tener importancia en un futuro, para valorar de forma completa el comportamiento de la regeneración en todas sus estructuras. Queda claro, que el uso de las técnicas de imagen será esencial a la hora evaluar ensayos clínicos, ya que realizar una artroscopia o biopsia de una lesión que se pretende regenerar, no resulta a nuestro juicio, ético.

Múltiples estudios sobre ingeniería tisular en el tratamiento de los defectos osteocondrales pueden ser encontrados en la literatura, usando diferentes tipos de biomateriales y células, con distintos grados de diferenciación. Destacamos los siguientes estudios. Zhou et al.<sup>260</sup> tras lesionar la tróclea femoral de 18 cerdos, introdujo PGA/PLA junto con células estromales autólogas, mostraron a los 3 y 6 meses una puntuación de 5,2 y 2,6 en la

escala modificada de Wakitani y Pineda, siendo estadísticamente significativa con respecto a los controles en la regeneración. Se ve mayor recuperación cuanto más tiempo para el análisis. Murphy et al.<sup>261</sup> en un modelo animal de 24 cabras, con lesiones artrósicas, inyectaron MSCs, previamente aspiradas de la médula ósea de la cresta iliaca junto con ácido hialurónico. Se analizaron a las 12 y 26 semanas, habiendo mejoría de la osteoartrosis en un primer momento, pero con el tiempo no hubo diferencias ya que no se apreció recuperación, planteándose la necesidad de carriers. Lee et al.<sup>236</sup> tras crear defectos osteocondrales en el cóndilo femoral en 27 cerdos, inyectaron intrarticularmente MSCs, extraídas de la cresta iliaca, con ácido hialurónico. Se analizaron a los 6 y 12 semanas, con una puntuación de 6 y 3,25 respectivamente en la escala de Wakitani, siendo estadísticamente significativas las diferencias con respecto al grupo control. Se apreció mala integración con el cartílago hialino, con pobre relleno en las primeras 6 semanas, cambiando a las 12 semanas a una buena integración y regeneración. Koga et al.<sup>243</sup> intervinieron 60 conejos, generándoles una lesión osteocondral y tratándola con MSCs, procedentes de la sinovial, y un gel de colágeno. Estos fueron analizados al día y a las 4<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup>, 12<sup>o</sup> y 24<sup>o</sup> semanas, valorándose por la escala de Wakitani, viéndose mejoría en el grupo de casos a lo largo del tiempo y siempre con diferencias estadísticamente significativas con el grupo control. Koga et al.<sup>183</sup> al año siguiente, en otro modelo animal de 36 conejos, introdujo MSCs de sinovial directamente en el defecto y como grupo control se inyectó intrarticularmente las MSCs. Se valoró al día, a las 4, 12 y 24 semanas con la escala de Wakitani, se obtuvo una puntuación media de 3, con mejoría del cartílago con el paso del tiempo y siendo las diferencias, con el grupo control, estadísticamente significativas. Nakamura et al.<sup>184</sup> emplearon 12 cerdos, en el que se les introdujo MSCs procedentes de sinovial junto con un gel fluorescente mediante artrotomía. Se analizaron, al día de la implantación un espécimen, 2 a los 7 días y 3 al mes y 5 a los tres meses. A estos 8 últimos se les practicó además del análisis histológico, una artroscopia y una RMN con gadolinio de 1,5 tesla. Se vieron diferencias estadísticamente significativas, mejorando en el grupo de casos. Se valora muy positivamente el uso de la RMN para valorar la regeneración.

Como se puede apreciar en la literatura, se han practicado muchos estudios en animales, siendo pocos los realizados en humanos. Destacamos los siguientes estudios. Koga et al. realizan una revisión de estudios clínicos realizados en pacientes, destacando los de Wakitani del 2004 y los del 2007 donde se insertaron en 1 y 3 casos MSCs habiendo mejoría clínica. También Kuroda en 2007 insertó MSCs en 1 caso con mejoría clínica<sup>234</sup>. Wakitani en el 2002, estudió 24 pacientes, en 12 implantaron MSCs con una membrana de colágeno y 12 fueron grupo control. La inserción se realizó mediante cirugía abierta y fueron valorados a las 10 y a las 28 semanas mediante artroscopia.

Se apreció mejoría en la escala de Wakitani sobre artroscopia e histología en el grupo control, no habiendo diferencias en cuanto a dolor, clínica y función en la escala de HSS con respecto al grupo control <sup>238</sup>. Haleem et al <sup>247</sup>. en el 2010, intervino 5 pacientes, introduciendo MSCs junto con periostio y factores de crecimiento en defectos osteocondrales, mediante artrotomía. Se practicó una artroscopia para valorar los resultados a los 12 meses, una RMN de 1,5 teslas y la escala HSS. En la escala hubo mejoría con respecto a la situación inicial, pero no hubo diferencias entre el 6 y el 12 meses postcirugía. De los 2 pacientes que consintieron la artroscopia mostraron una puntuación cercana a la normalidad. De los 3 pacientes a los que se les practicó la RMN, mostraron relleno completo de los defectos. En este estudio el autor se plantea los problemas éticos de practicar una biopsia en un tejido regenerado. Wakitani <sup>262</sup> en el 2011, valoró de forma retrospectiva a 41 pacientes, a los que se le implantaron MSCs de la cresta iliaca con un gel de colágeno. Tuvieron un seguimiento de 11 años en el que se pudo comprobar, la seguridad del uso de MSCs, por la ausencia de infecciones y de tumores.

En nuestro estudio, los resultados parecen favorables, observando una recuperación radiológica apreciable en la RMN, con respecto al grupo control, en cuanto al espesor del cartílago articular. Se practicó a 2 conejos con las patas completas, viéndose diferencia de señal en el grupo tratado con MSCs, con una recuperación condral completa. También se realizó una RMN solamente del cóndilo femoral a otros dos conejos, viéndose también diferencia de señal entre los dos grupos, con una recuperación condral en el grupo con MSCs. Con el empleo del TAC, hemos podido valorar el hueso subcondral, de los 2 conejos a los que se les practicó, se pudo apreciar recuperación completa en uno y parcial en otro del grupo tratado con MSCs. En el grupo control no se apreció ninguna recuperación, viendo el huso subcondral completamente dañado en la zona troclear. El análisis macroscópico del grupo tratado con MSCs, reveló 4 cóndilos con recuperación completa, con una superficie articular lisa y brillante y con una buena integración con el cartílago nativo, en otros dos se vio recuperación parcial con cierta reacción esclerosa pero con recuperación condral con ciertas irregularidades. Dentro del grupo control no hubo recuperación alguna, rellenándose el defecto con un tejido fibroso, irregular y en ningún caso, integrándose con el cartílago nativo. En el análisis microscópico se puede apreciar, en cada tinción, la regeneración del cartílago articular con un espesor completo y una perfecta integración con el cartílago nativo. En cuanto al hueso subcondral se puede apreciar la ausencia de regeneración completa, pero si, como los osteoblastos van digiriendo la formación cartilaginosa que rellena en un primer momento el defecto óseo, sustituyéndola por tejido óseo subcondral en el borde del defecto a expensas de osteocitos, con una integración al hueso nativo excelente y una recuperación parcial. Quizás si nuestro modelo hubiese sido valorado en una

fase más tardía, se podría haber apreciado como esta sustitución tisular se hubiese completado, con una mejor recuperación. También con el examen de los marcadores mitocondriales se comprueba, que esta regeneración se lleva a cabo por las células humanas implantadas y no por la propia capacidad tisular del conejo. La valoración de la escala modificada de Wakitani nos revela mejoría de la regeneración condral en el grupo tratado con MSCs, siendo las diferencias con el grupo control estadísticamente significativa.

Las ventajas de nuestro estudio, pasan en un primer momento, por usar un modelo animal fácilmente realizable, por su coste y viabilidad de mantenimiento. La obtención celular resulta sencilla, por el gran número de cirugías vertebrales practicadas en nuestro hospital y la gran aceptación de los pacientes, para la autorización de la extracción de células para investigación.

Las limitaciones de nuestro trabajo, resultan en un primer momento, de la escasa disposición de recursos a la hora de practicar los estudios radiológicos, siendo realizados no en todos los conejos por igual y de forma protocolizada. Otra limitación apreciada, al realizar el análisis histológica, es no haber valorado algún espécimen más allá de los 3 meses, ya que como se ha detallado antes, no hemos dado el tiempo suficiente a los osteoclastos a sustituir la formación condral por la ósea, que nosotros sólo hemos valorado en una fase inicial.

Comparando nuestro estudio con lo descrito en la literatura, presentamos un modelo de xenotransplante de células humanas no realizado anteriormente, habiéndose realizado solamente modelos de transplante entre modelos animales<sup>191, 231</sup>. La obtención de las células desde la médula ósea de la cresta iliaca resulta un método usado en otras ocasiones como en el estudio de Wakitani<sup>262</sup>, presentando similares resultados en cuanto a la obtención, caracterización y diferenciación celular. En la valoración radiológica mediante RMN, autores como Kangarlu<sup>256</sup> y Kim<sup>257</sup> en modelos similares, encontraron en la RMN, un método para la valoración de resultados, con resultados muy similares a los nuestros. Si destacamos el uso del TAC 3D como innovación en la valoración del hueso subcondral, no habiendo encontrado en estudios similares, su empleo con anterioridad. Nuestros resultados histológicos muestran una puntuación de 13,5 puntos en las rodillas tratadas y de 5,6 en las no tratadas según la escala de Wakitani, siendo muy superior a las de estudios similares como el de Zhou<sup>260</sup> con una puntuación de 5,2 y 2,6 respectivamente, así como el de Lee<sup>236</sup> con una puntuación de 6 y 3,25, así como el de Koga<sup>183, 243</sup> y Nakamura<sup>184</sup>. Las puntuaciones de nuestro estudio presentan unos rangos muy superiores a lo descrito en la literatura, pudiendo ser debido al empleo de células con un alto poder de regeneración al ser humanas y vehiculadas por un gel tan específico como el nuestro. También el alto número de tinciones realizadas en nuestro estudio, que permiten caracterizar las

distintas capas y estructuras del cartílago hialino a diferencia de los estudios anteriormente descritos, que realizan escasas tinciones. El uso de estas tinciones nos ayuda a apreciar una gran regeneración de la capa cartilaginosa, con una gran especificidad en la distribución de las fibras de colágeno. En la capa ósea, se ve una gran formación ósea, junto con una gran integración del mismo y una capa de transición, apreciada en algunas zonas, de muy alto nivel de regeneración. Un hallazgo a nuestro juicio relevante en nuestro modelo es la demostración de la supervivencia de las células humanas en el momento del sacrificio de los animales. Esto supone en primer lugar la demostración de que el carrier utilizado reúne las características necesarias para ser usado como soporte en la terapia celular. Por lo tanto y aunque ya era conocido, que las MSC pueden superar la barrera interespecie, nuestro modelo, lo demuestra claramente tras el uso del marcador mitocondrial humano. En cuanto a la regeneración tisular, muchos autores apuntan a que el papel de las células progenitoras en el proceso regenerativo estaría basada fundamentalmente en una actividad paracrina, nuestros hallazgos sin contradecir ese efecto regenerador mediante factores de crecimiento...muestra como las células progenitoras humanas administradas presentan una morfología y disposición similar al cartílago nativo, es decir parece haber existido un proceso de diferenciación celular de las MSCs administradas hacia línea celular condral.

Por lo tanto, presentamos un modelo animal de xenotransplante, para el tratamiento de un defecto osteocondral mediante, la implantación de MSCs sin diferenciar, junto con un hidrogel proteico de elástica recombinante. La obtención celular de la cresta iliaca resulta un procedimiento sencillo, comprobándose la capacidad de diferenciación y su uso con biomateriales termov variables. El hidrogel valorado, reúne las propiedades adecuadas para una correcta regeneración osteocondral, integrándose perfectamente con el cartílago nativo, siendo también importante sus cualidades para su utilización vía artroscópica. Por último reseñar el uso de la resonancia como prueba para valorar los tratamientos de lesiones condrales y el empleo de la tomografía con reconstrucciones tridimensionales de las lesiones del hueso subcondral.

Todos nuestros hallazgos, nos dan pie a seguir nuestras investigaciones en este campo, con modelos más parecidos al humano, como en minipig o en cabras, antes de dar el salto a un ensayo clínico. Nuestro último fin, sería realizar dicho ensayo, tratando lesiones osteocondrales mediante vía artroscópica, con nuestro gel termov variable y con células obtenidas bien del propio paciente o de los pacientes intervenidos en la unidad de raquis. La valoración postquirúrgica sería realizada mediante RMN y TAC 3D para evitar artroscopias y biopsias de valoración, que podrían cuestionar nuestra ética.

## **CONCLUSIONES**

## 7. CONCLUSIONES

### 7.1. *General:*

- **Con respecto a evaluar de forma comparativa la eficacia de la ingeniería tisular con un hidrogel proteico y células madre mesenquimales humanas en el tratamiento de un defecto osteocondral en un modelo de xenotransplante:**

Podemos afirmar que existen datos objetivos, que muestran que la ingeniería tisular con la aplicación de una suspensión de células progenitoras en un hidrogel, podría ser de utilidad en el tratamiento de las lesiones osteocondrales.

### 7.2. *Específicas:*

- **Con respecto a la viabilidad del hidrogel como soporte para la terapia celular:**

El hidrogel utilizado en el estudio con sus propiedades fisicoquímicas, permite un manejo sencillo, siendo fácilmente aplicable mediante inyección en forma líquida, solidificándose al entrar en contacto con el tejido vivo. Así mismo las células aplicadas mediante suspensión en el hidrogel, sobreviven y son transportadas y mantenidas por dicho gel en el lugar de la lesión.

- **Con respecto a los resultados radiológicos, comparando las rodillas tratadas con células madre mesenquimales humanas y sin ellas:**

Radiológicamente se objetiva, que las piezas tratadas con la mezcla de hidrogel y células presentan una imagen más parecida a un espécimen no lesionado, que la pieza tratada sin células.

- **Con respecto a los resultados histológicos, comparando las rodillas tratadas con células madre mesenquimales humanas y sin ellas:**

Histológicamente, hay una diferencia objetiva entre las lesiones tratadas con la mezcla de células e hidrogel, mostrando evidentes signos de regeneración tisular, tanto ósea como cartilaginosa, frente a las lesiones no tratadas con células, que no muestran ningún signo de regeneración tisular. Además se objetiva la persistencia de las células humanas que se han adaptado tanto en la morfología como en la disposición típica del cartílago.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Chevalier X. Physiopathology of arthrosis. The normal cartilage. *Presse Med* 1998;27(2):75-80.
2. Corvol MT. The chondrocyte: from cell aging to osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2000;67:557-60.
3. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature* 2003;423:332-6.
4. Lee YJ, Lee EB, Kwon YE, Lee JJ, Cho WS, Kim HA. Effect of estrogen on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-3, and MMP-13 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in osteoarthritis chondrocytes. *Rheumatol Int* 2003;23:282-8.
5. Nuttall ME, Nadeau DP, FP, Wang F, Keller PM, DWJrW. Inhibition of caspase-3-like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in vitro. *J Orthop Res* 2000;18:356-63.
6. Olsen BR RAW. Bone development. *AnnuRev Cell Dev Biol* 2000;16:191-220.
7. Thonar MA, Masuda K, Manicourt DH, Kuettner KE. Structure and function of normal adult articular cartilage. In: Reginster JY, Pelletier JP, Martel-pelletier J, Henrotin Y, editors. *Osteoarthritis: clinical and experimental aspects*. Berlin: Springer Verlag. 1999 ed. 1999:1-9.
8. DowthwaiteGP, Bishop JC, Redman SN et al. The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 2004;29:889-97.
9. Hayes AJ, Dowthwaite GP, Webster SV, Archer CW. The distribution of Notch receptors and their ligands during articular cartilage development. *J Anat* 2003;202:495-502.
10. Mitrovic D, Quintero M., Starkovic A, Ryckewart A. Cell density of adult human femoral condylar articular surface in joints with normal and fibrillated surfaces. *Lab Invest* 1983;49:309-16.
11. Vignon E, Arlot M, Paricot L, Vignon G. The cell density of human femoral head cartilage. *Clin Orthop* 1986;121:303-8.
12. Levick JR. Microvascular architecture and exchange in synovial joints. *Microcirculation* 1995;2:217-33.

13. Mobasher A, Vannucci SJ, Bondy CA, Carter SD, Innes JF, Arteaga MF. Glucose transport and metabolism in chondrocytes: a key to understanding chondrogenesis, skeletal development and cartilage degradation in osteoarthritis. *Histol Histopathol* 2002;17:1239-67.
14. Urban JP. Present perspectives on cartilage and chondrocyte mechanobiology. *Biorheology* 2000;37:185-90.
15. Salter DM, Hughes DE, Simpson R, Gardner DL. Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol* 1992;31:231-4.
16. Allen JM, Bateman JI, Hansen U et al. WARP is a novel multimeric component of the chondrocyte pericellular matrix that interacts with perlecan. *J Biol Chem* 2006; 281: 7341-7349.
17. Ottani V, Raspanti M, Ruggeri A. Collagen structure and functional implications. *Micron* 2001;32:251-60.
18. Bruckner P, Van der Rest M. Structure and function of cartilage collagens. *Microsc Res Tech* 1994;28:378-84.
19. Thomas JT, Ayad S, Grant ME. Cartilage collagens: strategies for the study of their organisation and expression in the extracellular matrix. *Ann Rheum Dis* 1994;53:488-96.
20. Kirsch T, Harrison G, Golub EE, Nah HD. The roles of annexins and types II and X collagen in matrix vesicle-mediated mineralization of growth plate cartilage. *J Biol Chem* 2000;275:35577-83.
21. Suttmuller M, Bruijn JA, De Heer E. Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. *Histol Histopathol* 1997;12:557-66.
22. Eyre DR, Wu JJ, Wu JJ, Fernandes RJ, Pietka TA, WM. Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans* 2002;30:893-9.
23. Eyre DR. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res* 2002;4:30-5.
24. Olsen BR. Collagen IX. *Int J Biochem Cell Biol* 1997;29:555-8.
25. Kuivaniemi H, Tromp G, Prockop DJ. Mutations in fibrillar collagens (types I, II, III, and XI), fibril-associated collagen (type IX), and network-forming collagen (type X) cause a spectrum of diseases of bone, cartilage, and blood vessels. *Hum Mutat* 1997;9:300-15.
26. Reginato AM, Olsen BR. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res* 2002;4:337-45.
27. Williams CJ, Jimenez SA. Heritable diseases of cartilage caused by mutations in collagen genes. *J Rheumatol* 1995;43(suppl):28-33.

28. Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991;60:443-75.
29. Knudson CB, Knudson W. Cartilage proteoglycans. *Semin Cell Dev Biol* 2001;12:69-78.
30. Doege KJ, Sasaki M, Kimura T, Yamada Y. Complete coding sequence and deduced primary structure of the human cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan. Humanspecific repeats, and additional alternatively spliced forms. *J Biol Chem* 1991;266:894-902.
31. Luo W, Guo C, Zheng J, Chen TL, Wang PY, Vertel BM. Aggrecan from start to finish. *J Bone Miner Metab* 2000;18:51-6.
32. Gendelman R, Burton-Wurster NI, MacLeod JN, Lust G. The cartilage-specific fibronectin isoform has a high affinity binding site for the small proteoglycan decorin. *J Biol Chem* 2003;278:11175-81.
33. Santra M, Reed CC, Iozzo RV. Decorin binds to a narrow region of the epidermal growth factor (EGF) receptor, partially overlapping but distinct from the EGF-binding epitope. *J Biol Chem* 2002;277:35671-81.
34. Vynios DH, Papageorgakopoulou N, Sazakli H, Tsiganos CP. The interactions of cartilage proteoglycans with collagens are determined by their structures. *Biochimie* 2001;83:899-906.
35. Redini F. Structure and regulation of articular cartilage proteoglycan expression. *Pathol Biol* 2001;49:364-75.
36. Mansson B, Wenglen C, Morgelin M, Saxne T, Heinegard D. Association of chondroadherin with collagen type II. *J Biol Chem* 2001;276:32883-8.
37. Heathfield TF, Onnerfjord P, Dahlberg L, Heinegard D. Cleavage of fibromodulin in cartilage explants involves removal of the N-terminal tyrosine sulfate-rich region by proteolysis at a site that is sensitive to matrix metalloproteinase-13. *J Biol Chem* 2004;279:6286-95.
38. Loeser RF, Forsyth CB, Samarel AM, Im HJ. Fibronectin fragment activation of proline-rich tyrosine kinase PYK2 mediates integrin signals regulating collagenase-3 expression by human chondrocytes through a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 2003;278:24577-85.
39. Stanton H, Ung L, Fosang AJ. The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes and aggrecan degradation by aggrecanases. *Biochem J* 2002;364:181-90.
40. Yasuda T, Poole AR, Shimizu M, Nakagawa T, Julovi SM, Tamamura H. Involvement of CD44 in induction of matrix metalloproteinases by a COOH-terminal heparinbinding fragment of fibronectin in human articular cartilage in culture. *Arthritis Rheum* 2003;48:1271-80 2003.

41. Dickinson SC, Vankemmelbeke MN, Buttle DJ, Rosenberg K, Heinegard D, Hollander AP. Cleavage of cartilage oligomeric matrix protein (thrombospondin-5) by matrix metalloproteinases and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs. *Matrix Biol* 2003;22:267-78.
42. Millward-Sadler SJ, Salter DM. Integrin-dependent signal cascades in chondrocyte mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 2004;32:435-46.
43. Kurtis M, Schmidt TA, Bugbee WD, Loeser RF, Sah RL. Integrin-mediated adhesion of human articular chondrocytes to cartilage. *Arthritis Rheum* 2003;48:110-8.
44. Michihisa Z, Meharra EJ, Kühn K, Creighton-Achermann L, Lotz M. Accelerated aging dependent development of osteoarthritis in alpha 1 deficient mice. *Arthritis Rheum* 2003;48:2873-80.
45. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell Jr. CW, Lotz MK. Human chondrocytes apoptosis in response to mechanical injury. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9:712-9.
46. Holzenberger M, Dupont J, Ducos B et al. IGF-I receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 2003;421:125-6.
47. Min BH, Kim HJ, Lim H, Park CS, Park SR. Effects of ageing and arthritis disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Exp Mol Med* 2001;33:299-302.
48. Mobasheri A. Role of chondrocyte death and hypocellularity in ageing human articular cartilage and the pathogenesis of osteoarthritis. *Med Hypoth* 2002;58:193-7.
49. Ishii H, Tanaka H, Katoh K, Nakamura H, Nagashima M, Yoshino S. Characterization of infiltrating T cells and Th 1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10:277-281.
50. Naito S, Shiomi T, Okada A et al. Expression of AOAMTS4 in human osteoarthritic cartilage. *Pathology International* 2007;57:703-711.
51. Ulrich m, Mahoney MD, Schwarz EM. Biología del cartilago articular. *J Am Acad Orthop Surg (Ed Esp)* 2004;3:49-58.
52. D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Jr., Lotz MK. Impact of mechanical trauma on matrix and cells. *Clin Orthop Relat Res* 2001;(391 Suppl):S90-S99.
53. Nehrer S, Spector M, Minas T. Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures. *Clin Orthop Relat Res* 1999;(365):149-162.

54. Buckwalter JA, Brown TD. Joint injury, repair, and remodeling: roles in post-traumatic osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res* 2004;(423):7-16.
55. Mitchell N, Shepard N. Healing of articular cartilage in intra-articular fractures in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62(4):628-634.
56. Llinas A, McKellop HA, Marshall GJ, Sharpe F, Kirchen M, Sarmiento A. Healing and remodeling of articular incongruities in a rabbit fracture model. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75(10):1508-1523.
57. Buckwalter JA. Articular cartilage injuries. *Clin Ortho* 2002;402:21-37.
58. Brown TD, Anderson DD, Nepola JV, Singerman RJ, Pedersen DR, Brand RA. Contact stress aberrations following imprecise reduction of simple tibial plateau fractures. *J Orthop Res* 1988;6(6):851-862.
59. Hohl M. Tibial condylar fractures. *J Bone Joint Surg Am* 1967;49(7):1455-1467.
60. Lovasz G, Park SH, Ebramzadeh E et al. Characteristics of degeneration in an unstable knee with a coronal surface step-off. *J Bone Joint Surg Br* 2001;83(3):428-436.
61. McDevitt C, Gilbertson E, Muir H. An experimental model of osteoarthritis; early morphological and biochemical changes. *J Bone Joint Surg Br* 1977;59(1):24-35.
62. Cole BJ, Pascual-Garrido C, Grumet RC. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *J Bone Joint Surg [Am]* 2009;91-A:1778-90.
63. Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ et al. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the knee. *N Engl J Med* 2002;347(2):81-88.
64. Mithoefer K, McAdams T, Williams RJ, Kreuz PC, Mandelbaum BR. Clinical efficacy of the microfracture technique for articular cartilage repair in the knee: an evidence-based systematic analysis. *Am J Sports Med* 2009;37(10):2053-2063.
65. Hoemann CD, Hurtig M, Rossomacha E et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(12):2671-2686.
66. Gobbi A, Francisco RA, Lubowitz JH, Allegra F, Canata G. Osteochondral lesions of the talus: randomized controlled trial comparing chondroplasty, microfracture, and osteochondral autograft transplantation. *Arthroscopy* 2006;22(10):1085-1092.

67. Jakob RP, Franz T, Gautier E, Mainil-Varlet P. Autologous osteochondral grafting in the knee: indication, results, and reflections. *Clin Orthop Relat Res* 2002;(401):170-184.
68. Tibesku CO, Szuwart T, Kleffner TO et al. Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J Orthop Res* 2004;22(6):1210-1214.
69. Horas U, Pelinkovic D, Herr G, Aigner T, Schnettler R. Autologous chondrocyte implantation and osteochondral cylinder transplantation in cartilage repair of the knee joint. A prospective, comparative trial. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(2):185-192.
70. Aubin PP, Cheah HK, Davis AM, Gross AE. Long-term followup of fresh femoral osteochondral allografts for posttraumatic knee defects. *Clin Orthop Relat Res* 2001;(391 Suppl):S318-S327.
71. Williams SK, Amiel D, Ball ST et al. Prolonged storage effects on the articular cartilage of fresh human osteochondral allografts. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A(11):2111-2120.
72. Ball ST, Amiel D, Williams SK et al. The effects of storage on fresh human osteochondral allografts. *Clin Orthop Relat Res* 2004;(418):246-252.
73. Lee DK. Ankle arthroplasty alternatives with allograft and external fixation: preliminary clinical outcome. *J Foot Ankle Surg* 2008;47(5):447-452.
74. Coutts RD, Healey RM, Ostrander R, Sah RL, Goomer R, Amiel D. Matrices for cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res* 2001;(391 Suppl):S271-S279.
75. Kurtis MS, Tu BP, Gaya OA et al. Mechanisms of chondrocyte adhesion to cartilage: role of beta1-integrins, CD44, and annexin V. *J Orthop Res* 2001;19(6):1122-1130.
76. Lee MC, Sung KL, Kurtis MS, Akeson WH, Sah RL. Adhesive force of chondrocytes to cartilage. Effects of chondroitinase ABC. *Clin Orthop Relat Res* 2000;(370):286-294.
77. Wang H, Kandel RA. Chondrocytes attach to hyaline or calcified cartilage and bone. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12(1):56-64.
78. Steinwachs M, Kreuz PC. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: a prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy* 2007;23(4):381-387.

79. Frenkel SR, Kubiak EN, Truncale KG. The repair response to osteochondral implant types in a rabbit model. *Cell Tissue Bank* 2006;7(1):29-37.
80. Koga H, Muneta T, Nagase T et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 2008;333(2):207-215.
81. Nehrer S, Domayer S, Dorotka R, Schatz K, Bindreiter U, Kotz R. Three-year clinical outcome after chondrocyte transplantation using a hyaluronan matrix for cartilage repair. *Eur J Radiol* 2006;57(1):3-8.
82. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17(6):561-577.
83. Nehrer S, Chiari C, Domayer S, Barkay H, Yaron A. Results of chondrocyte implantation with a fibrin-hyaluronan matrix: a preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466(8):1849-1855.
84. Diduch DR, Jordan LC, Mierisch CM, Balian G. Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* 2000;16(6):571-577.
85. Hoemann CD, Sun J, McKee MD et al. Chitosan-glycerol phosphate/blood implants elicit hyaline cartilage repair integrated with porous subchondral bone in microdrilled rabbit defects. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15(1):78-89.
86. Lind M, Larsen A, Clausen C, Osther K, Everland H. Cartilage repair with chondrocytes in fibrin hydrogel and MPEG polylactide scaffold: an in vivo study in goats. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2008;16(7):690-698.
87. Uematsu K, Habata T, Hasegawa Y et al. Osteochondritis dissecans of the knee: long-term results of excision of the osteochondral fragment. *Knee* 2005;12(3):205-208.
88. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. *Science* 2002;295(5557):1014-1017.
89. Verfaillie CM. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 2002;12(11):502-508.
90. TILL JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-222.

91. Serafini M, Verfaillie CM. Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med* 2006;24(5):379-388.
92. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98(9):2615-2625.
93. Reyes M, Verfaillie CM. Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2001;938:231-233.
94. Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003;996:231-234.
95. Verfaillie CM. Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found Symp* 2005;265:55-61.
96. Cogle CR, Wainman DA, Jorgensen ML, Guthrie SM, Mames RN, Scott EW. Adult human hematopoietic cells provide functional hemangioblast activity. *Blood* 2004;103(1):133-135.
97. Forrai A, Robb L. The hemangioblast--between blood and vessels. *Cell Cycle* 2003;2(2):86-90.
98. Jaffredo T, Bollerot K, Sugiyama D, Gautier R, Drevon C. Tracing the hemangioblast during embryogenesis: developmental relationships between endothelial and hematopoietic cells. *Int J Dev Biol* 2005;49(2-3):269-277.
99. Loges S, Fehse B, Brockmann MA et al. Identification of the adult human hemangioblast. *Stem Cells Dev* 2004;13(3):229-242.
100. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25(11):2739-2749.
101. Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006;20(3):161-171.
102. Conneally E, Cashman J, Petzer A, Eaves C. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(18):9836-9841.



103. Holyoake TL, Alcorn MJ. CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev* 1994;8(2):113-124.
104. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996;87(1):1-13.
105. Lanza F, Healy L, Sutherland DR. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15(1):1-13.
106. Friedenstein A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation* 1971;12(2):99-108.
107. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16(3):381-390.
108. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6(2):230-247.
109. Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995;56 Suppl 1:S17.
110. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 1997;97(3):561-570.
111. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16(3):381-390.
112. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968;6(2):230-247.
113. Friedenstein A, Kuralesova AI. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. *Transplantation* 1971;12(2):99-108.
114. Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *Br J Haematol* 1997;97(3):561-570.
115. Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995;56 Suppl 1:S17.
116. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2003;11(1):55-64.

117. Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 1990;11(3):181-188.
118. Noth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res* 2002;20(5):1060-1069.
119. O'Driscoll SW, Saris DB, Ito Y, Fitzimmons JS. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res* 2001;19(1):95-103.
120. Zarnett R, Salter RB. Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. *Can J Surg* 1989;32(3):171-174.
121. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 1997;21(3):225-235.
122. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res* 1998;13(4):655-663.
123. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28(8):875-884.
124. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13(1):69-80.
125. Kobune M, Kawano Y, Ito Y et al. Telomerized human multipotent mesenchymal cells can differentiate into hematopoietic and cobblestone area-supporting cells. *Exp Hematol* 2003;31(8):715-722.
126. Martin DR, Cox NR, Hathcock TL, Niemeyer GP, Baker HJ. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol* 2002;30(8):879-886.
127. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL. Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status and future prospects. *Tissue Eng* 2005;11(5-6):787-802.
128. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-147.
129. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997;276(5309):71-74.

130. Sun S, Guo Z, Xiao X et al. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells* 2003;21(5):527-535.
131. Dominici M, Le BK, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-317.
132. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999;181(1):67-73.
133. Herzog EL, Chai L, Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 2003;102(10):3483-3493.
134. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418(6893):41-49.
135. Krampera M, Cosmi L, Angeli R et al. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006;24(2):386-398.
136. Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ et al. Inhibition of *Osf2/Cbfa1* expression and terminal osteoblast differentiation by *PPARgamma2*. *J Cell Biochem* 1999;74(3):357-371.
137. Nuttall ME, Gimble JM. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(3):290-294.
138. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998;238(1):265-272.
139. Mastrogiacomo M, Cancedda R, Quarto R. Effect of different growth factors on the chondrogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 2001;9 Suppl A:S36-S40.
140. Ringe J, Kaps C, Schmitt B et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 2002;307(3):321-327.
141. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G et al. Chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells in pellet cultural system. *Exp Hematol* 2004;32(5):502-509.

142. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21(3):429-435.
143. Arai F, Hirao A, Suda T. Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. *Trends Cardiovasc Med* 2005;15(2):75-79.
144. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425(6960):841-846.
145. Zhang J, Niu C, Ye L et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 2003;425(6960):836-841.
146. Allen TD, Dexter TM. The essential cells of the hemopoietic microenvironment. *Exp Hematol* 1984;12(7):517-521.
147. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl* 1982;1:87-94.
148. Sorrell JM, Weiss L. Cell interactions between hematopoietic and stromal cells in the embryonic chick bone marrow. *Anat Rec* 1980;197(1):1-19.
149. Weiss L. The haemopoietic microenvironment of bone marrow: an ultrastructural study of the interactions of blood cells, stroma and blood vessels. *Ciba Found Symp* 1980;71:3-19.
150. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974;17(4):331-340.
151. Baddoo M, Hill K, Wilkinson R et al. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J Cell Biochem* 2003;89(6):1235-1249.
152. Bosnakovski D, Mizuno M, Kim G, Takagi S, Okumura M, Fujinaga T. Isolation and multilineage differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Res* 2005;319(2):243-253.
153. Devine SM, Bartholomew AM, Mahmud N et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion. *Exp Hematol* 2001;29(2):244-255.
154. Moscoso I, Centeno A, Lopez E et al. Differentiation "in vitro" of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation. *Transplant Proc* 2005;37(1):481-482.

155. Villaron EM, Almeida J, Lopez-Holgado N et al. Mesenchymal stem cells are present in peripheral blood and can engraft after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica* 2004;89(12):1421-1427.
156. Urbano-Ispizua A. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: stem cell source. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20(2):265-280.
157. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98(8):2396-2402.
158. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 2004;6(6):543-553.
159. in 't Anker PS, Noort WA, Scherjon SA et al. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica* 2003;88(8):845-852.
160. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod* 2004;19(6):1450-1456.
161. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109(1):235-242.
162. O'Donoghue K, Choolani M, Chan J et al. Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis. *Mol Hum Reprod* 2003;9(8):497-502.
163. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G et al. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000;2(6):477-488.
164. in 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 2004;22(7):1338-1345.
165. Lee RH, Kim B, Choi I et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004;14(4-6):311-324.
166. Shih DT, Lee DC, Chen SC et al. Isolation and characterization of neurogenic mesenchymal stem cells in human scalp tissue. *Stem Cells* 2005;23(7):1012-1020.

167. Atala A. Recent developments in tissue engineering and regenerative medicine. *Curr Opin Pediatr* 2006;18(2):167-171.
168. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 2005;23(1):47-55.
169. Kim BS, Mooney DJ. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 1998;16(5):224-230.
170. Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng* 2001;7(6):679-689.
171. Gunatillake PA, Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2003;5:1-16.
172. Lee SJ, Lim GJ, Lee JW, Atala A, Yoo JJ. In vitro evaluation of a poly(lactide-co-glycolide)-collagen composite scaffold for bone regeneration. *Biomaterials* 2006;27(18):3466-3472.
173. Atala A, Bauer SB, Soker S, Yoo JJ, Retik AB. Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet* 2006;367(9518):1241-1246.
174. Murray MM, Forsythe B, Chen F et al. The effect of thrombin on ACL fibroblast interactions with collagen hydrogels. *J Orthop Res* 2006;24(3):508-515.
175. Yang C, Hillas PJ, Baez JA et al. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *BioDrugs* 2004;18(2):103-119.
176. Tachibana A, Furuta Y, Takeshima H, Tanabe T, Yamauchi K. Fabrication of wool keratin sponge scaffolds for long-term cell cultivation. *J Biotechnol* 2002;93(2):165-170.
177. Zhang JY, Beckman EJ, Piesco NP, Agarwal S. A new peptide-based urethane polymer: synthesis, biodegradation, and potential to support cell growth in vitro. *Biomaterials* 2000;21(12):1247-1258.
178. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54(1):3-12.
179. Stitzel J, Liu J, Lee SJ et al. Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials* 2006;27(7):1088-1094.

180. Sakiyama Elbert SE, Hubbell JA. Functional biomaterials: Design of novel biomaterials. *Annu Rev Mater Res* 2001;31:183-201.
181. Bent AE, Tutrone RT, McLennan MT, Lloyd LK, Kennelly MJ, Badlani G. Treatment of intrinsic sphincter deficiency using autologous ear chondrocytes as a bulking agent. *Neurourol Urodyn* 2001;20(2):157-165.
182. Wang Y, Blasioli DJ, Kim HJ, Kim HS, Kaplan DL. Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes. *Biomaterials* 2006;27(25):4434-4442.
183. Koga H, Shimaya M, Muneta T et al. Local adherent technique for transplanting mesenchymal stem cells as a potential treatment of cartilage defect. *Arthritis Res Ther* 2008;10(4):R84.
184. Nakamura T, Sekiya I, Muneta T et al. Arthroscopic, histological, and MRI analyses of cartilage repair after a minimally invasive method of transplantation of allogenic synovial mesenchymal stem cells into cartilage defects in pigs. *Cytherapy CYTH-2011-0050* 2011.
185. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ et al. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76(4):579-592.
186. Aroen A, Loken S, Heir S et al. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med* 2004;32(1):211-215.
187. Curl WW, Krome J, Gordon ES, Rushing J, Smith BP, Poehling GG. Cartilage injuries: a review of 31,516 knee arthroscopies. *Arthroscopy* 1997;13(4):456-460.
188. Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 2008;87:77-95.
189. Kuettner KE, Cole AA. Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(2):93-103.
190. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue Eng Part B Rev* 2010;16(1):105-115.
191. Pei M, Yan Z, Shoukry M, Boyce BM. Failure of xenotransplantation using porcine synovium-derived stem cell-based cartilage tissue constructs for the repair of rabbit osteochondral defects. *J Orthop Res* 2010;28(8):1064-1070.
192. Burman Ms, Finkelstein H, Mayer L. Arthroscopy of the knee. *J Bone Joint Surg* 1934;16:255.

193. Pridie KH. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg* 1959;41B:618-619.
194. Knutsen G, Drogset JO, Engebretsen L et al. A randomized trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture. Findings at five years. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89(10):2105-2112.
195. Gudas R, Kalesinskas RJ, Kimtys V et al. A prospective randomized clinical study of mosaic osteochondral autologous transplantation versus microfracture for the treatment of osteochondral defects in the knee joint in young athletes. *Arthroscopy* 2005;21(9):1066-1075.
196. Gobbi A, Nunag P, Malinowski K. Treatment of full thickness chondral lesions of the knee with microfracture in a group of athletes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13(3):213-221.
197. Cerynik DL, Lewullis GE, Joves BC, Palmer MP, Tom JA. Outcomes of microfracture in professional basketball players. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17(9):1135-1139.
198. Kreuz PC, Erggelet C, Steinwachs MR et al. Is microfracture of chondral defects in the knee associated with different results in patients aged 40 years or younger?. *Arthroscopy* 2006;22(11):1180-1186.
199. Garret JC. Fresh osteochondral allografts for treatment of articular defects in osteochondritis dissecans of lateral femoral condyle in adults. *Clin Orthop* 1994;303: 33-37.
200. Hangody L, Fules P. Autologous osteochondral mosaicplasty for the treatment of full-thickness defects of weight-bearing joints: ten years of experimental and clinical experience. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl 2:25-32.
201. Ozturk A, Ozdemir MR, Ozkan Y. Osteochondral autografting (mosaicplasty) in grade IV cartilage defects in the knee joint: 2- to 7-year results. *Int Orthop* 2006;30(3):200-204.
202. Nho SJ, Foo LF, Green DM et al. Magnetic resonance imaging and clinical evaluation of patellar resurfacing with press-fit osteochondral autograft plugs. *Am J Sports Med* 2008;36(6):1101-1109.
203. Dozin B, Malpeli M, Cancedda R et al. Comparative evaluation of autologous chondrocyte implantation and mosaicplasty: a multicentered randomized clinical trial. *Clin J Sport Med* 2005;15(4):220-226.
204. Guettler JH, Demetropoulos CK, Yang KH, Jurist KA. Osteochondral defects in the human knee: influence of defect size on cartilage rim stress and load redistribution to surrounding cartilage. *Am J Sports Med* 2004;32(6):1451-1458.



205. Sun J, Hou XK, Li X et al. Mosaicplasty associated with gene enhanced tissue engineering for the treatment of acute osteochondral defects in a goat model. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009;129(6):757-771.
206. Gross AE, Aubin P, Cheah HK, Davis AM, Ghazavi MT. A fresh osteochondral allograft alternative. *J Arthroplasty* 2002;17(4 Suppl 1):50-53.
207. Chu CR, Convery FR, Akeson WH, Meyers M, Amiel D. Articular cartilage transplantation. Clinical results in the knee. *Clin Orthop Relat Res* 1999;(360):159-168.
208. Ghazavi MT, Pritzker KP, Davis AM, Gross AE. Fresh osteochondral allografts for post-traumatic osteochondral defects of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 1997;79(6):1008-1013.
209. Bugbee WD, Convery FR. Osteochondral allograft transplantation. *Clin Sports Med* 1999;18(1):67-75.
210. Davidson PA, Rivenburgh DW, Dawson PE, Rozin R. Clinical, histologic, and radiographic outcomes of distal femoral resurfacing with hypothermically stored osteoarticular allografts. *Am J Sports Med* 2007;35(7):1082-1090.
211. Jamali AA, Emmerson BC, Chung C, Convery FR, Bugbee WD. Fresh osteochondral allografts: results in the patellofemoral joint. *Clin Orthop Relat Res* 2005;(437):176-185.
212. Allen RT, Robertson CM, Pennock AT et al. Analysis of stored osteochondral allografts at the time of surgical implantation. *Am J Sports Med* 2005;33(10):1479-1484.
213. Pearsall AW, Tucker JA, Hester RB, Heitman RJ. Chondrocyte viability in refrigerated osteochondral allografts used for transplantation within the knee. *Am J Sports Med* 2004;32(1):125-131.
214. Peterson L, Brittberg M, Kiviranta I, Akerlund EL, Lindahl A. Autologous chondrocyte transplantation. Biomechanics and long-term durability. *Am J Sports Med* 2002;30(1):2-12.
215. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Lindahl A. Treatment of osteochondritis dissecans of the knee with autologous chondrocyte transplantation: results at two to ten years. *J Bone Joint Surg Am* 2003;85-A Suppl 2:17-24.
216. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331(14):889-895.

217. Zaslav K, Cole B, Brewster R et al. A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med* 2009;37(1):42-55.
218. Bentley G, Biant LC, Carrington RW et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br* 2003;85(2):223-230.
219. Wood JJ, Malek MA, Frassica FJ et al. Autologous cultured chondrocytes: adverse events reported to the United States Food and Drug Administration. *J Bone Joint Surg Am* 2006;88(3):503-507.
220. Peterson L, Minas T, Brittberg M, Nilsson A, Sjogren-Jansson E, Lindahl A. Two- to 9-year outcome after autologous chondrocyte transplantation of the knee. *Clin Orthop Relat Res* 2000;(374):212-234.
221. Zheng MH, Willers C, Kirilak L et al. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue Eng* 2007;13(4):737-746.
222. Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *Knee* 2006;13(3):194-202.
223. Trattnig S, Ba-Ssalamah A, Pinker K, Plank C, Vecsei V, Marlovits S. Matrix-based autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: noninvasive monitoring by high-resolution magnetic resonance imaging *Magn Reson Imaging* 2005;23(7):779-787.
224. Bartlett W, Gooding CR, Carrington RW, Skinner JA, Briggs TW, Bentley G. Autologous chondrocyte implantation at the knee using a bilayer collagen membrane with bone graft. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Br* 2005;87(3):330-332.
225. Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D et al. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005;(435):96-105.
226. Gobbi A, Kon E, Berruto M, Francisco R, Filardo G, Marcacci M. Patellofemoral full-thickness chondral defects treated with Hyalograft-C: a clinical, arthroscopic, and histologic review. *Am J Sports Med* 2006;34(11):1763-1773.

227. Kon E, Gobbi A, Filardo G, Delcogliano M, Zaffagnini S, Marcacci M. Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years. *Am J Sports Med* 2009;37(1):33-41.
228. Visna P, Pasa L, Cizmar I, Hart R, Hoch J. Treatment of deep cartilage defects of the knee using autologous chondrograft transplantation and by abrasive techniques--a randomized controlled study. *Acta Chir Belg* 2004;104(6):709-714.
229. Magnussen RA, Dunn WR, Carey JL, Spindler KP. Treatment of focal articular cartilage defects in the knee: a systematic review. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466(4):952-962.
230. Jakobsen RB, Engebretsen L, Slauterbeck JR. An analysis of the quality of cartilage repair studies. *J Bone Joint Surg Am* 2005;87(10):2232-2239.
231. Revell CM, Athanasiou KA. Success rates and immunologic responses of autogenic, allogenic, and xenogenic treatments to repair articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev* 2009;15(1):1-15.
232. Punwar S, Khan WS. Mesenchymal stem cells and articular cartilage repair: clinical studies and future direction. *Open Orthop J* 2011;5 Suppl 2:296-301.
233. Guangdong W, Wei L, Lei C, Xiaoyun W, Tianyi L, Yilin C. Repair of porcine articular osteochondral defects in non weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Ti Eng* :Vol 12, N 11 2006.
234. Koga H, Engebretsen L, Brinchmann JE, Muneta T, Sekiya I. Mesenchymal stem cell-based therapy for cartilage repair: a review. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17(11):1289-1297.
235. Shirasawa S, Sekiya I, Sakaguchi Y, Yagishita K, Ichinose S, Muneta T. In vitro chondrogenesis of human synovium-derived mesenchymal stem cells: optimal condition and comparison with bone marrow-derived cells. *J Cell Biochem* 2006;97(1):84-97.
236. Lee KB, Hui JH, Song IC, Ardany L, Lee EH. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects--a porcine model. *Stem Cells* 2007;25(11):2964-2971.
237. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *Stem Cells* 2002;20(6):530-541.

238. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10(3):199-206.
239. Vaquero J, Forriol F. Knee chondral injuries: Clinical treatment strategies and experimental models. *Injury* 2011.
240. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005;52(8):2521-2529.
241. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res* 2005;320(2):269-276.
242. Kerker JT, Leo AJ, Sgaglione NA. Cartilage repair: synthetics and scaffolds: basic science, surgical techniques, and clinical outcomes. *Sports Med Arthrosc* 2008;16(4):208-216.
243. Koga H, Muneta T, Ju YJ et al. Synovial stem cells are regionally specified according to local microenvironments after implantation for cartilage regeneration. *Stem Cells* 2007;25(3):689-696.
244. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS. Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006;2(7):373-382.
245. Moutos FT, Guilak F. Composite scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 2008;45(3-4):501-512.
246. Kessler MW, Ackerman G, Dines JS, Grande D. Emerging technologies and fourth generation issues in cartilage repair. *Sports Med Arthrosc* 2008;16(4):246-254.
247. Haleem AM, Singergy AA, Sabry D et al. The Clinical Use of Human Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects: A Pilot Study and Preliminary Results. *Cartilage* 2010;1(4):253-261.
248. Reddi AH, Becerra J, Andrades JA. Nanomaterials and hydrogel scaffolds for articular cartilage regeneration. *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17(5):301-305.

249. Kinikoglu B, Rodriguez-Cabello JC, Damour O, Hasirci V. The influence of elastin-like recombinant polymer on the self-renewing potential of a 3D tissue equivalent derived from human lamina propria fibroblasts and oral epithelial cells. *Biomaterials* 2011;32(25):5756-5764.
250. Kinikoglu B, Rodriguez-Cabello JC, Damour O, Hasirci V. A smart bilayer scaffold of elastin-like recombinamer and collagen for soft tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2011;22(6):1541-1554.
251. Trattinig S, Millington SA, Szomolanyi P, Marlovits S. MR imaging of osteochondral grafts and autologous chondrocyte implantation. *Eur Radiol* 2007;17(1):103-118.
252. Caumo F, Russo A, Faccioli N et al. Autologous chondrocyte implantation: prospective MRI evaluation with clinical correlation. *Radiol Med* 2007;112(5):722-731.
253. Marlovits S, Striessnig G, Resinger CT et al. Definition of pertinent parameters for the evaluation of articular cartilage repair tissue with high-resolution magnetic resonance imaging. *Eur J Radiol* 2004;52(3):310-319.
254. Uhl M, Lahm A, Bley TA et al. Experimental autologous osteochondral plug transfer in the treatment of focal chondral defects: magnetic resonance imaging signs of technical success in sheep. *Acta Radiol* 2005;46(8):875-880.
255. Streitparth F, Schottle P, Schlichting K et al. Osteochondral defect repair after implantation of biodegradable scaffolds: indirect magnetic resonance arthrography and histopathologic correlation. *Acta Radiol* 2009;50(7):765-774.
256. Kangarlu A, Gahunia HK. Magnetic resonance imaging characterization of osteochondral defect repair in a goat model at 8 T. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14(1):52-62.
257. Kim M, Foo LF, Uggen C et al. Evaluation of early osteochondral defect repair in a rabbit model utilizing fourier transform-infrared imaging spectroscopy, magnetic resonance imaging, and quantitative T2 mapping. *Tissue Eng Part C Methods* 2010;16(3):355-364.
258. Watanabe A, Boesch C, Anderson SE, Brehm W, Mainil VP. Ability of dGEMRIC and T2 mapping to evaluate cartilage repair after microfracture: a goat study. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(10):1341-1349.
259. Barber FA, Dockery WD. A computed tomography scan assessment of synthetic multiphase polymer scaffolds used for osteochondral defect repair. *Arthroscopy* 2011;27(1):60-64.

260. Zhou G, Liu W, Cui L, Wang X, Liu T, Cao Y. Repair of porcine articular osteochondral defects in non-weightbearing areas with autologous bone marrow stromal cells. *Tissue Eng* 2006;12(11):3209-3221.
261. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(12):3464-3474.
262. Wakitani S, Okabe T, Horibe S et al. Safety of autologous bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *J Tissue Eng Regen Med* 2011;5: 146-150 2011.