

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



*ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS
CONDROCITOS ARTICULARES Y LOS DERIVADOS DE CÉLULAS
MADRE DEL TEJIDO ADIPOSEO INFRAPATELAR EMBEBIDOS EN
MATRICES TRIDIMENSIONALES DE FIBRINA Y ÁCIDO
HIALURÓNICO.*

RICARDO MENCÍA BARRIO

Prof. Dr. D. CLEMENTE MURIEL VILLORIA, Director del Departamento de Cirugía de la Universidad de Salamanca.

CERTIFICA:

Que la presente tesis doctoral, titulada “Estudio comparativo de la funcionalidad de los condrocitos articulares y los derivados de células madre del tejido adiposo infrapatelar embebidos en matrices tridimensionales de fibrina y ácido hialurónico”, realizada por D. Ricardo Mencía Barrio para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universidad de Salamanca, cumple todos los requisitos necesarios para su presentación y defensa ante el tribunal calificador.

Y para que conste a los efectos oportunos, expido el presente certificado en Salamanca, en el mes de Octubre del año 2011.

Fdo.

D. LUIS RAFAEL RAMOS PASCUA, DOCTOR Y JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA DEL COMPLEJO ASISTENCIAL UNIVERSITARIO DE LEÓN; D. FRANCISCO JAVIER IGLESIAS MUÑOZ, DOCTOR Y DIRECTOR DEL BANCO DE TEJIDOS DE LA FUNDACIÓN CLÍNICA SAN FRANCISCO DE LEÓN; D. RAFAEL GONZÁLEZ CELADOR, DOCTOR Y PROFESOR TITULAR DE MEDICINA PREVENTIVA Y SALUD PÚBLICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA; Y D. JUAN MANUEL CURTO GAMALLO, DOCTOR Y PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y ADJUNTO DEL SERVICIO DE CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

Que el trabajo realizado como proyecto de Tesis Doctoral por **D. RICARDO MENCÍA BARRIO**, titulado: “ **ESTUDIO COMPARATIVO DE LA FUNCIONALIDAD DE LOS CONDROCITOS ARTICULARES Y LOS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE DEL TEJIDO ADIPOSO INFRAPATELAR EMBEBIDOS EN MATRICES TRIDIMENSIONALES DE FIBRINA Y ÁCIDO HIALURÓNICO**”, ha sido desarrollado bajo nuestra dirección, cumpliendo todos los requisitos de originalidad y calidad científica, según marca el R.D. que regula los estudios de tercer ciclo, para alcanzar el Grado de Doctor.

Dr. LUIS R. RAMOS PASCUA

Dr. F. JAVIER IGLESIAS MUÑOZ

Dr. RAFAEL GONZÁLEZ CELADOR

Dr. JUAN M. CURTO GAMALLO

Salamanca, a 30 de Septiembre del año 2011

A Carmen, Juan Pedro y Sergio.

A mis padres, Angelines y Juan (†).

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Luis Rafael Ramos Pascua, Jefe de Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial Universitario de León. Para mí es y siempre ha sido un ejemplo por su capacidad de trabajo, rigor científico y, sobre todo, actitud optimista ante la vida. Le considero un maestro y un amigo. Simplemente, sin su estímulo, esta tesis no se habría realizado.

Al doctor Francisco Javier Iglesias Muñoz, Director del Establecimiento de Tejidos Humanos de la Fundación Clínica San Francisco de León, por abrirme las puertas de su Laboratorio de Ingeniería Tisular, por facilitarme todos los medios y asesorarme continuamente en un campo que para mí era una novedad.

Al Prof. Dr. Rafael González Celador, por la revisión metodológica y estadística de esta tesis, y al Prof. Dr. Juan Manuel Curto Gamallo, por su estímulo y docencia desde los tiempos en que fui residente en el Hospital Clínico Universitario de Salamanca.

A Ana Fernández González y a Marta López Laguna, así como a todos los componentes del Establecimiento de Tejidos Humanos de la Fundación Clínica San Francisco de León, por su inestimable ayuda. Sus conocimientos científicos y su paciencia conmigo han sido infinitos.

Al doctor Andrés Saldaña Díaz, porque él abrió el camino de la colaboración entre el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial Universitario de León y el Establecimiento de Tejidos Humanos de la Fundación Clínica San Francisco.

A M^a Asunción Díez Fernández y a M^a Dolores Olazábal Flórez, enfermeras del quirófano 2 del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial Universitario de León, por su colaboración en la obtención de muestras, siempre con una espléndida disposición a ayudarme sin pedir nada a cambio.

Finalmente, a mis compañeros y al personal no facultativo del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial Universitario de León, a los que tanto debo.

CONFLICTO DE INTERESES

Este trabajo ha sido realizado con la ayuda financiera de las III Becas de Investigación en Condroprotección Farmacológica Hyalgan 2009, concedida por BIOIBÉRICA FARMA durante el desarrollo del 46 Congreso SECOT celebrado en Barcelona.

ÍNDICE

I INTRODUCCIÓN.....	1
1. CARTÍLAGO ARTICULAR. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA.....	2
1.1. Embriología.....	2
1.2. Macroscopía e histología.....	2
1.3. Fisiología y nutrición.....	8
1.4. Metabolismo.....	11
1.5. Biomecánica.....	13
1.6. Dinámica.....	13
2. DEFECTOS CONDRALES.....	16
2.1. Lesiones microscópicas.....	16
2.2. Lesiones condrales.....	16
2.3. Lesiones de espesor completo.....	17
3. TRATAMIENTO DE LOS DEFECTOS CONDRALES.....	19
3.1. Reducción anatómica y síntesis estable.....	21
3.2. Tratamiento sintomático.....	21
3.3. Estimulación o provocación de la reparación por parte del organismo.....	23
3.4. Implantes o trasplantes de cartílago.....	27
4. INGENIERÍA TISULAR.....	32
4.1. Introducción.....	32
4.2. Cultivos celulares.....	32
4.3. Cultivo de condrocitos.....	33
4.4. Células mesenquimales.....	35
4.5. Células mesenquimales procedentes del tejido adiposo.....	36
4.6. Estrategias para la ingeniería tisular del cartílago.....	38
5. ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	40
II HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	41
III MATERIAL Y MÉTODOS.....	46
1. MATERIALES, CONCEPTOS Y CLASIFICACIONES.....	47
2. CRONOGRAMA Y FASES DE ESTUDIO.....	51
3. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	52
4. ÁMBITO DEL ESTUDIO.....	52
5. OBTENCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS DE ESTUDIO.....	53
6. MÉTODOS INSTRUMENTALES.....	56
6.1. Puesta a punto de las técnicas.....	56
6.2. Fabricación de los sustitutivos de cartílago articular.....	63
6.3. Estudios de proliferación celular.....	66
6.4. Estudios de histología.....	66
7. MANEJO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	69
IV RESULTADOS.....	70
1. RESULTADOS DE LA PUESTA A PUNTO DE LAS TÉCNICAS.....	71
1.1. Procesado de muestras.....	71
1.2. Determinación de los parámetros óptimos para el aislamiento de ADMSCs.....	72
1.3. Cuantificación celular.....	76
1.4. Establecimiento del cultivo primario P0.....	76

1.5. Individualización y expansión celular.....	78
1.6. Multipotencialidad de ADMSCs.....	79
2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL SUSTITUTIVO DE CARTÍLAGO.....	81
3. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS HISTOLÓGICOS.....	84
V DISCUSIÓN.....	87
1. LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS ACTUALES.....	87
2. TÉCNICA MACI: LA BÚSQUEDA DEL ANDAMIAJE PERFECTO.....	95
3. ORIGEN DE LAS CÉLULAS: BMMSCs versus ADMSCs.....	102
4. DISCUSIÓN SOBRE EL MÉTODO Y RESULTADOS.....	107
VI CONCLUSIONES.....	110
VII ANEXOS.....	113
VIII BIBLIOGRAFÍA.....	117

INTRODUCCIÓN

1. EL CARTÍLAGO ARTICULAR. ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA

El cartílago articular es un tejido avascular, aneural y alinfático que se interpone entre dos superficies óseas de una articulación diartrosisica ¹⁵. Está compuesto por condrocitos y una matriz extracelular que ellos secretan. Se caracteriza por sus propiedades mecánicas de resistencia a las fuerzas de compresión y elasticidad, permitiendo el deslizamiento de dichas superficies gracias a un coeficiente de fricción extremadamente bajo ^{6, 13}.

1.1. EMBRIOLOGÍA

El sistema esquelético se desarrolla a partir de la capa germinativa mesodérmica, que aparece durante la tercera semana del desarrollo embrionario ⁷. A cada lado del tubo neural se forman una serie de bloques de tejido mesodérmico llamados somitas. Poco después de su formación, cada somita se diferencia en una porción ventromedial, el esclerotomo, y una parte dorsolateral, el dermatotomo. Al finalizar la cuarta semana, las células del esclerotomo se vuelven polimorfas y constituyen un tejido laxo que se denomina mesénquima o tejido conectivo embrionario, cuyas células emigran y se diferencian, entre otras líneas celulares, a condroblastos. En su transformación condroblástica, las células mesenquimatosas se redondean, retraen sus prolongaciones y se multiplican rápidamente formando conglomerados condensados. Las células de estos conglomerados tienen citoplasma muy basófilo y de inmediato comienzan a sintetizar una matriz que separa unas de otras. Mientras que el mesénquima superficial forma el pericondrio, el cartílago central es reemplazado por tejido óseo, progresando desde la diáfisis hacia la epífisis, salvo en los extremos, donde aparecerán los núcleos de osificación secundarios. El mecanismo por el cual el cartílago de los extremos óseos no es reemplazado por hueso continúa sin esclarecer, aunque se ha implicado al gen Wnt-14 ¹⁴.

1.2. MACROSCOPIA E HISTOLOGÍA

El aspecto macroscópico del cartílago articular normal del adulto es el de una superficie blanca, algo translúcida (de ahí el nombre de hialino), lisa y brillante, ligeramente flexible y deformable a la presión moderada. Su grosor es variable, siendo mayor en la rótula (6-7 mm).

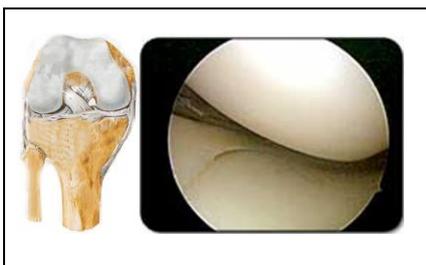
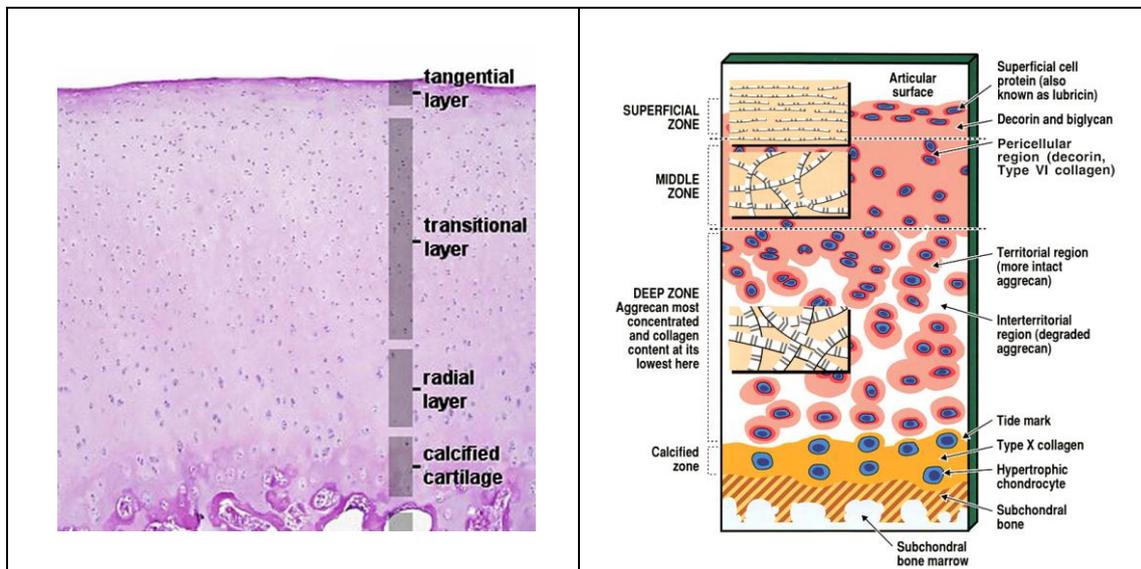


Figura 1. *Aspecto macroscópico del cartílago articular normal.*

Histológicamente el cartílago articular contiene un solo tipo celular, los condrocitos, y una matriz que los rodea. Se organiza en capas que difieren entre sí según criterios bioquímicos (cantidad de proteoglicanos) y anatómicos (por la disposición de las fibras de colágeno, cuya red muestra birrefringencia que varía desde la superficie hasta la profundidad). En su superficie se dispone una zona acelular, denominada *lámina splenda*, a modo de revestimiento, a la que se adhieren algunas macromoléculas del líquido sinovial, sirviendo de protección, sobre todo, frente a los radicales libres ⁵. El ácido hialurónico, algunos fosfolípidos y la lubricina revisten dicha superficie.

CAPA	DESCRIPCIÓN
Superficial	De condrocitos pequeños y planos con el eje mayor paralelo a la superficie (aspecto fibroblástico). En la superficie articular de estos condrocitos se sintetiza la lubricina (proteína que participa en la disminución del coeficiente de fricción del cartílago articular ¹³). Las fibras colágenas se disponen en sentido paralelo a la superficie y la zona contiene fibronectina en abundancia. Los proteoglicanos son relativamente escasos. Por la disposición de las fibras es un área que resiste a las fuerzas de tensión.
Intermedia (40-50% de la altura total)	De condrocitos gruesos y esféricos. La densidad celular es la más baja de todo el cartílago. La red de fibras colágenas no sigue una dirección concreta.
Profunda o radial (40-45% de la altura total)	De condrocitos ordenados en pequeñas columnas a lo largo de las gruesas trabéculas de colágeno, dispuestas a su vez en sentido perpendicular a la superficie. La concentración de proteoglicano es elevada.
Calcificada (5-10% de la altura total)	Adosada 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 concentración de calcio es elevada. 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 ingreso de los vasos del hueso subcondral, pero no de algunas sustancias. Los condrocitos son hipertrofos.

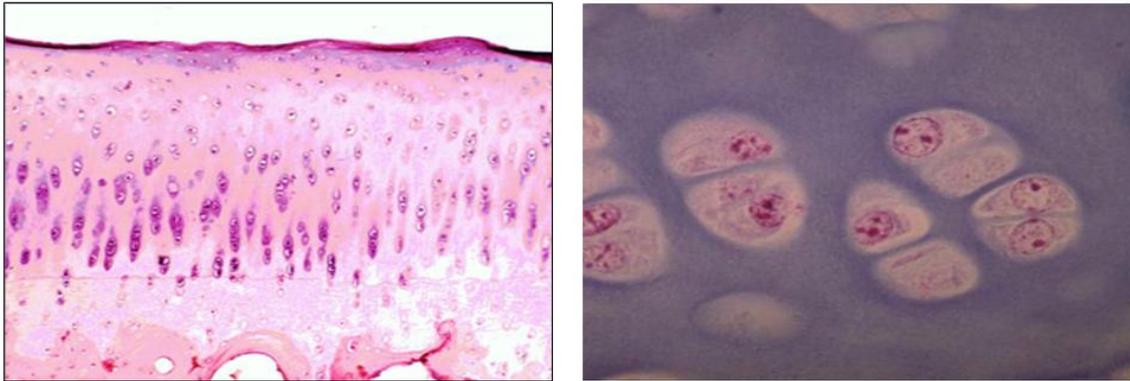
Tabla 1. Capas del cartílago articular .



Figs. 2 y 3. Representación esquemática de la estructura del cartílago articular de un adulto. Los recuadros de la figura de la derecha representan los diámetros y la organización de las macrofibrillas de colágeno en las diferentes zonas. Tomado de Poole y cols ¹³.

1.2.1. Condrocitos

Los condrocitos ocupan el 10% del volumen total del cartílago, si bien la densidad celular varía según el tipo de articulación, la zona en la que se encuentran y la edad. El contenido celular es mayor en la capa superficial y el número de células disminuye con la edad del paciente^{6, 13}. Su morfología es esférica u ovoide, y mide 30-40 micras de diámetro. Tienen un núcleo central, redondo u ovalado, con uno o varios nucleolos (según las especies), y presentan un centro celular yuxtannuclear con un par de centriolos y un aparato de Golgi bien desarrollado. El citoplasma contiene mitocondrias alargadas, ocasionalmente gotitas de lípidos y cantidades variables de glucógeno.



Figs. 4 y 5. *A la izquierda, aspecto histológico del cartílago articular hialino normal. A la derecha, detalle de sus células: los condrocitos.*

Los condrocitos 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. Cuando se está formando matriz en el cartílago en crecimiento o regeneración, el citoplasma se hace más basófilo, el aparato de Golgi aumenta con sáculos dilatados y numerosas vacuolas de tamaño variable asociadas, a veces, con filamentos o gránulos. El retículo endoplásmico rugoso aparece bien desarrollado, con cisternas moderadamente dilatadas. Los condrocitos no migran y se multiplican poco o nada en el cartílago normal.

1.2.2. Matriz extracelular

La matriz extracelular está compuesta por agua (65-80% del peso húmedo) y macromoléculas (proteínas y glucosaminoglicanos, que constituyen el 20-35% del peso húmedo del cartílago) -Tabla 2-. Contiene abundantes cationes que equilibran las cargas negativas de los proteoglicanos. Las fibras de colágeno varían en su diámetro: en la capa superficial son de 20 nm y de 70 a 120 nm en la capa profunda¹³.

La matriz extracelular se divide en una zona circundante al condrocito, con poco colágeno, denominada espacio pericelular y que forma con la célula el condrón; y una matriz extracelular más alejada de la célula, denominada zona interterritorial, de pH neutro y que asegura la integridad del tejido y le confiere sus propiedades biomecánicas.

Espacio pericelular	Matriz extracelular interterritorial
<p>En la periferia inmediata de la célula hay acumulación de moléculas, adheridas a aquélla. 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 colagénicas como ancorina 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 submembranosas ligadas al citoesqueleto y las moléculas del espacio pericelular. 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.</p> <p>También se adhieren a la superficie de la membrana algunas enzimas: hialurónico sintetasa para la síntesis del ácido hialurónico y enzimas metaloproteínas.</p> <p>Esta zona pericelular se caracteriza por un pH ácido más elevado compatible con la actividad de las enzimas lisosómicas vertidas en el área circundante al condrocito.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Fibras de colágeno de tipo II - Moléculas de gran tamaño (agregados de proteoglicanos) y otras proteínas.

Tabla 2. Subdivisión de la matriz extracelular del cartílago.

1.2.2.1. Fibras de colágeno

El colágeno del cartílago articular es del tipo II en un 95%, representando el 25% del peso seco de aquél. El resto son colágenos de tipo VI, IX, X y XI. Si el único específico del cartílago es el tipo X, el de tipo II se comporta como marcador del condrocito normal y, en cultivo, indica la diferenciación del mismo. Cada molécula de colágeno está constituida por tres cadenas polipeptídicas alfa en forma de hélice triple o superhélice derecha. Cuando la hélice triple consta de tres cadenas alfa idénticas, el colágeno se denomina homotrimérico⁶. Cuando está formada por dos o tres cadenas alfa diferentes se le llama heterotrimérico. Los colágenos tipo II y X son homotriméricos, en tanto que los de tipo IX, VI y XI son heterotriméricos⁶. Los condrocitos secretan los colágenos en forma de procolágenos con extremos C- y N- terminales largos, llamados propéptidos. La escisión de algunos de estos, por la unión de varias moléculas colagénicas, da lugar a fibrillas.

El colágeno del cartílago forma fibrillas heterotópicas, es decir formadas por varios tipos de colágeno⁴⁷. Las moléculas en las fibrillas se disponen paralelamente pero decaladas la una con respecto a la otra, dando el aspecto de estriaciones con un periodo característico de 67 nm.

1.2.2.2. Proteoglicanos

Los proteoglicanos del cartílago articular son de dos tipos según su capacidad de agregación al ácido hialurónico: de masa molecular elevada, representados en su mayoría por el agrecano; y de masa molecular reducida, representados por la decorina, el biglicano y la fibromodulina^{6, 13}. Los agrecanos representan alrededor del 90% de los proteoglicanos del cartílago; los grandes no agregados representan algo menos del 10%; y los pequeños, alrededor del 3%. Todos se encuentran en las mallas formadas por la red de colágeno y su elevado tamaño garantiza su permanencia allí. Por sus propiedades

biofísicas (cargas negativas que atraen las moléculas de H₂O), los glucosaminoglicanos crean una presión osmótica que pone en tensión la red de colágeno, a modo de esponja, participando así en las propiedades biomecánicas del cartílago. De esta forma 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.

Los proteoglicanos están formados por una proteína axial (core protein) ligada de modo covalente a una o varias cadenas de glucosaminoglicanos. Estos son cadenas polisacáridas largas formadas por la repetición de disacáridos compuestos de azúcar aminada y un hexuronato. Cada unidad disacárido 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 Ca²⁺ y Na⁺, que atraen a las moléculas de agua. Entre los glucosaminoglicanos distinguimos el condroitín 6-sulfato, el condroitín 4-sulfato y el queratán sulfato.

Las cadenas de condroitín sulfato están formadas por unidades de disacáridos que se repiten (ácido glucurónico y un residuo de N-acetil-galactosamina). Según que el grupo sulfatado esté situado en posición 4 ó 6 sobre la N-acetil-galactosamina se distingue el condroitín sulfato 4 y el condroitín sulfato 6. El queratán sulfato, por su parte, está compuesto por unidades repetidas de galactosa y la N-acetil-galactosamina sulfatada.

1.2.2.2.1. Agrecano

El agrecano está formado por una proteína axial de 237-248 kDa sobre la cual se fijan unas cien cadenas de condroitín sulfato y unas treinta de queratán sulfato. La región N-terminal de la proteína se une de modo no covalente a una molécula de ácido hialurónico, con una glicoproteína de enlace como estabilizador. La molécula de ácido hialurónico, por su parte, puede contener más de 300 moléculas de agrecanos que, de este modo, forman superagregados de peso molecular muy elevado.

1.2.2.2.2. Proteoglicanos pequeños

La decorina, el biglicano y la fibromodulina tienen en común una misma proteína transportadora central (core protein) y sólo se diferencian por la calidad y cantidad de sus glucosaminoglicanos⁶. Las moléculas pertenecen a la familia de las proteínas ricas en leucina. La decorina posee una sola cadena de condroitín-sulfato (o dermatán-sulfato), mientras que el biglicano posee dos. La fibromodulina, por su parte, consta de cuatro cadenas de queratán-sulfato. Las dos primeras, de 70 y 100 kDa de peso molecular, respectivamente, pueden unir muchas moléculas de la matriz extracelular, igual que los colágenos II y VI, la fibronectina y algunos factores de crecimiento.

La fibromodulina es una glucoproteína de 220 kDa dimerizada presente en la mayoría de los tejidos conectivos con sitios de unión a las integrinas y sitios de interacción con distintos colágenos o el ácido hialurónico.

1.2.2.3. Otras proteínas

En este grupo, que algunos llaman “liga intercolagénica”⁶, se incluyen glucoproteínas y proteínas no colagénicas cuya función exacta se desconoce, aunque se intuye que participan en el mantenimiento de la estructura y conservación tridimensional de la matriz extracelular permitiendo distintas adhesiones moleculares¹³.

La condroadherina pertenece a la familia de las proteínas ricas en leucina, como la decorina, el biglicano y la fibromodulina, e intervendría, sobre todo, en procesos de interacción con integrinas y colágeno de tipo II. La tenascina, por su parte, que se expresa especialmente en la artrosis, también participaría en la modulación de la fijación del condrocito a la fibronectina. Otras son la osteonectina, las matrilinas cartilaginosas, las trombospondinas y la proteína de la matriz oligoméricas del cartílago.

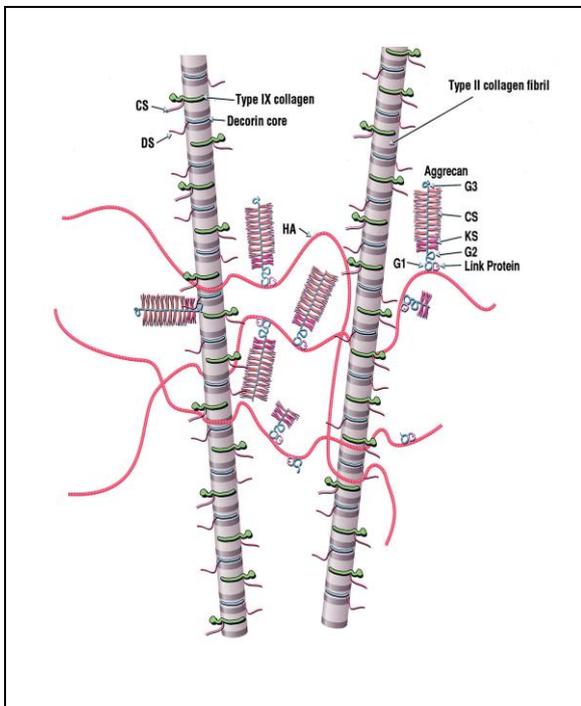


Fig. 6. Representación esquemática de la red macrofibrilar de colágeno, agreganos y ácido hialurónico. G1, G3 = dominios. HA = ácido hialurónico. CS = condroitín sulfato. KS = Keratán sulfato. Tomado de Poole y cols¹³.

MOLÉCULA	COMENTARIO	FUNCIÓN
Colágenos		
Tipo II	Componente principal de las microfibrillas	Fuerza ténsil
Tipo VI	Forma microfibrillas en zona pericelular	Desconocida
Tipo IX	Unido a la superficie de las microfibrillas	Interconexión fibrilar. Fuerza ténsil
Tipo X	Sociado con microfibrillas. Sólo sintetizado por condrocitos hipertróficos. Presente sólo en la capa calcificada	Soporte estructural
Tipo XI	Presente sobre y junto a las microfibrillas	Forma núcleos de fibrillas
Tipos XII y XIV	Homotriméricos	Forma microfibrillas
Proteoglicanos		
Agrecano	Forma la gran masa de proteoglicanos. Se une al hialurónico por el dominio G1. Mayor concentración en la capa profunda	Rigidez y resistencia a la compresión
Decorina	Tiene una cadena de condroitín o dermatán sulfato cerca de la región amino terminal. Equimolar al agregan. Se concentra en la superficie articular y en zona pericelular	Regula la formación de microfibrillas
Fibromodulina	Puede contener hasta 4 cadenas de keratán sulfato	
Lumicano	Contiene keratán sulfato en inmaduros	
Biglicano	Tiene dos cadenas de condroitín o dermatán sulfato	Desconocida
Perlecano	En células de la superficie. Contiene heparán sulfato	Adhesión de células y matriz
Otras moléculas		
Proteína oligomérica del cartílago	Cinco moléculas de la familia de la trombospondina	Se une al colágeno tipo II. Relacionada con el ensamblaje de microfibrillas
Proteína de unión	Estructura homóloga al dominio G1 del agrecano y versicano	Estabiliza la unión del agrecano y ácido hialurónico
Proteína ácida de la matriz	También conocida como proteína Gla	Inhibe la calcificación
Fibrilina-1	Forma red microfibrilar	Desconocida
Ácido hialurónico	Forma agregados macromoleculares de agrecano o versicano	Retiene el agrecano en la matriz. Interacciona con fibrillas de colágeno
Lubricina	Sintetizada por células de la zona superficial	Lubricación
Condroadherina	Proteína rica en leucina	Unión célula-matriz
CD44	Receptor de la superficie celular para el ácido hialurónico	Unión célula-matriz

Tabla 3. Moléculas de la matriz del cartílago .

1.3 . FISIOLÓGÍA Y NUTRICIÓN

1.3.1. Fisiología del cartílago articular

El cartílago articular facilita el deslizamiento de las superficies óseas gracias a un coeficiente de fricción extremadamente bajo ⁴⁸. Además, 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 deformabilidad.

1.3.1.1. Soporte de cargas

La organización molecular de la matriz extracelular es ideal para esta función. El armazón fibrilar del colágeno determina y mantiene la forma del tejido y resiste a las fuerzas de tracción; mientras que los agregados de proteoglicanos que ocupan sus intersticios proporcionan un gel viscoso hidratado que absorbe las fuerzas de compresión. Al someter al cartílago a estas fuerzas, la trama de proteoglicanos se comprime extruyendo el agua contenida en su interior. Cuando cesa la compresión la trama se expande, impregnándose nuevamente de agua hasta el límite fijado por las

fibras colágenas. Desde el punto de vista bioquímico diremos que los agregados de proteoglicanos con el ácido hialurónico tienen cargas aniónicas. Estas cargas se repelen mutuamente manteniendo las moléculas en estado de extensión y atraen a iones de carga opuesta, principalmente de sodio, que dan al tejido una gran hidrofilia por el efecto Donan.

1.3.1.2. *Deslizamiento – Lubricación*

El coeficiente de fricción de las articulaciones sinoviales es menor que el de un patín sobre el hielo (0.02), sin desgaste detectable de la superficie ⁶. El líquido sinovial nutre y lubrica el cartílago favoreciendo el deslizamiento.

El líquido sinovial es un trasudado plasmático procedente de los capilares fenestrados de la membrana sinovial. Contiene pequeñas moléculas del plasma al que se unen el ácido hialurónico y ciertas glicoproteínas secretadas por las células sinoviales. En condiciones normales, el líquido sinovial contiene menos de 300 elementos por mm³ y corresponde a un filtrado plasmático selectivo al que le faltan las proteínas de alto peso molecular ⁶. Actúa como lubricante articular, amortigua los golpes y evita el contacto de los cartílagos articulares entre sí.

El ácido hialurónico (sal sódica de hialuronato) es el constituyente principal del líquido sinovial y el que le confiere la mayoría de sus peculiaridades. Es un glucosaminoglicano descubierto por Meyer y Palmer en 1934, formado por 10.000 a 12.000 parejas de ácido glucurónico y de n-acetil-glucosamina, fuertemente hidratado, replegado en una pelota estática deformable de alrededor de 0,5 micrometros de diámetro. A su concentración en el líquido sinovial normal (una media de 3.8 mg/ml en el adulto joven, 2.5 mg/ml en el anciano) los dominios de su molécula se interrelacionan recíprocamente. Estas características moleculares explican las propiedades tan particulares de las soluciones de ácido hialurónico. Por una parte, excluyen todas las gruesas moléculas al mismo tiempo que ejercen una acción de filtración dinámica de solutos que son obligados a circular al interior de los dominios moleculares hidratados. Por otra parte muestran propiedades reológicas únicas. Tiene un comportamiento viscoelástico influenciado por las fuerzas cinéticas a las cuales se someten. Frente a fuerzas de cizallamiento débiles, como serían las que se producen en la interlínea de una rodilla durante la marcha (frecuencia de alrededor de 0,5-1 Hz), el comportamiento es principalmente viscoso producido por el frotamiento recíproco de moléculas de ácido hialurónico cuando el flujo de líquido sinovial se acerca a las superficies presentes. En el curso de un movimiento rápido, como sería el de la carrera (frecuencias de 2-3 Hz), el comportamiento de la solución de ácido hialurónico es esencialmente elástico. El mecanismo en juego aquí es la deformación elástica de las moléculas, que almacenan pasajeramente la energía disminuyendo las fuerzas aplicadas al cartílago, que se protege así contra los picos de sobrecarga. La transición súbita de compartimiento viscoso a comportamiento elástico es una singularidad de las soluciones de ácido hialurónico; y esto es muy dependiente de la concentración y, sobre todo, del peso molecular del ácido hialurónico. La disminución de estos 2 parámetros en las artropatías altera demasiado rápidamente las propiedades fisiológicas del líquido sinovial.

Finalmente, en el líquido sinovial, el 1-2% son proteínas (forman un complejo fuertemente aniónico que se adsorbe sobre la superficie del cartílago). Entre las glicoproteínas se aísla una "lubricina", con peso molecular de 220.000, que se adsorbe

sobre cada una de las superficies cartilaginosas opuestas, lubricando éstas y provocando una fuerza de repulsión intermolecular que favorece la resistencia a las fuertes cargas.



Fig.7. *Aspecto macroscópico del líquido sinovial de una hidrartrosis reactiva a un sobreesfuerzo.*

1.3.2. Nutrición del cartílago articular

Debido a la avascularidad del cartílago, los nutrientes básicos del mismo son aportados por dos vías: sinovial (por imbibición) ⁴⁹ y subcondral (por difusión a partir de vasos subcondrales en animales inmaduros). En el primer caso, los nutrientes difunden desde los capilares sinoviales hacia el líquido sinovial, hasta que alcanzan la matriz extracelular del cartílago.

Sólo las moléculas pequeñas pueden ingresar al cartílago por difusión simple o imbibición por efecto de la movilidad articular. Las moléculas grandes únicamente pueden penetrar por efecto de la compresión intermitente que generan los movimientos. Las macromoléculas (albúmina, inmunoglobulinas o macroinhibidores del líquido sinovial, como la alfa2-macroglobulina) no atraviesan las mallas apretadas de la superficie cartilaginosa. En general, el tamaño y la conformación de las moléculas nutrientes debe ser tal que puedan discurrir por poros teóricos de 6.8 nm en el espesor de la matriz cartilaginosa.

La glucosa es el principal sustrato energético del condrocito. Se metaboliza básicamente por la vía de la glucolisis anaeróbica y se transforma en glucosamina para la síntesis de los proteoglicanos.

Cada célula posee todas las organelas necesarias para la síntesis y la maduración de proteínas con destino intra y extracelular: núcleo voluminoso, ribosomas, retículo endoplasmático, complejo de Golgi, vacuolas lipídicas y glucogénicas y liposomas. En condiciones fisiológicas, el condrocito mantiene un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de las proteínas estructurales de la matriz cartilaginosa. En esta homeostasis intervienen muchos factores: exigencias mecánicas, factores de crecimiento (factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento de los fibroblastos β y factor de crecimiento similar a la insulina). Estos distintos factores regulan las síntesis condrocítica de proteínas de la matriz (colágenos, proteoglicanos, glucoproteínas), proteasas (metaloproteasas, agrecanasas, catepsinas) e inhibidores de proteasas (inhibidores titulares de metaloproteasas, activador del plasminógeno).

1.4. METABOLISMO

Inicialmente se pensó que el cartílago era una estructura inerte e hipometabólica debido a su baja densidad celular y al aspecto microscópico del tejido cartilaginoso. Estudios posteriores demostraron lo contrario: los condrocitos sintetizan los componentes de los proteoglicanos y el colágeno de la matriz extracelular manteniendo la estructura normal matricial y siendo capaces de responder, en condiciones anormales de carga y atricción, con modificación de la velocidad de renovación de los proteoglicanos.

Los substratos energéticos más importantes de las células del cartílago son los hidratos de carbono y los aminoácidos⁶. Los condrocitos también pueden utilizar ácidos grasos, pero su importancia como origen de energía no es bien conocida.

La renovación de la matriz extracelular es extremadamente lenta; la de los colágenos casi nula; y la de los proteoglicanos, de varios cientos de días. Existe un recambio (turnover) pericelular normal reducido del colágeno del cartílago de personas jóvenes que aumenta en el cartílago de las personas mayores. La actividad metabólica y la respuesta al estrés mecánico varían de una articulación a otra.

1.4.1. Metabolismo de los proteoglicanos y del colágeno del cartílago

1.4.1.1. Síntesis de proteoglicanos

La síntesis de agreganos comporta varias etapas: la síntesis de la proteína central, la de los dos tipos de oligosacáridos y la de las cadenas de condroitín sulfato y de su secuencia de enlace con la proteína y el queratán sulfato.

El precursor de la proteína central se sitúa en el retículo endoplásmico rugoso y se une con los oligosacáridos ricos en manosa ligado por un nitrógeno. El precursor de la proteína central pasa a ocupar los compartimentos del aparato de Golgi, donde es rápidamente completado por la adición de oligosacáridos ligados al oxígeno y cadenas de queratán sulfato y de condroitín sulfato.

La síntesis de las cadenas lineales sulfatadas de glucosaminoglicanos exige la acción coordinada y concertada de enzimas específicas (transferasas, epimerasas, sulfotransferasas) perimembranas, adyacentes al retículo endoplasmático y al complejo de Golgi. La primera etapa de la síntesis consiste en un añadido sucesivo de dos osas activadas: uridindifosfato (UDP)-galactosamina N-acetilada y UDP-ácido glucurónico para los condroitines y dermatansulfatos, y UDP-glucosamina N-acetilada y UDP-galactosa para los queratansulfatos. Después, reacciones bioquímicas sucesivas (N-desacetilación, N- y O-sulfataciones, epimerización) modifican las dos osas constitutivas de forma heterogénea a lo largo de la cadena. De todo ello resulta una gran diversidad estructural en un mismo glucosaminoglicano. Por ejemplo, en un glucosaminoglicano determinado pueden variar el número y la posición de las O-sulfataciones, así como la relación N-sulfato/O-sulfato.

Una vez sintetizados, los glucosaminoglicanos se fijan por covalencia a la proteína central durante el proceso posterior a la traducción en el complejo de Golgi, antes de la

etapa de secreción. Durante esta etapa (añadido de los glucosaminoglicanos), el proteoglicano adquiere su doble naturaleza bioquímica y se sulfata. En todas las etapas hay un control de calidad permanente de los agreicanos neosintetizados gracias a una red compleja de enzimas acompañantes, algunas de las cuales ya fueron identificadas (proteína de shock térmico 25, calnexina, calreticulina). Los agreicanos neosintetizados rechazados por el control de calidad se destruyen en el proteosoma citosólico.

Los agreicanos se secretan a continuación al medio extracelular. El enlace con el ácido hialurónico se produce en la cara externa de la membrana citoplásmica de los condrocitos, sobre los cuales se fijan las moléculas de ácido hialurónico mediante una molécula de adhesión: el CD44.

1.4.1.2. Catabolismo de los proteoglicanos

El catabolismo de los agreicanos se debe a la actividad catabólica de una enzima todavía mal caracterizada: la agreicanasa (sus productos catabólicos son identificados in vivo en el líquido sinovial y en el suero). Otras proteinasas tienen escasa participación. Un pequeño porcentaje de agreicanos es liberado del cartílago, aparentemente intactos, probablemente por difusión pasiva de las moléculas o de los fragmentos de agregados.

1.4.1.3. Síntesis de las fibrillas de colágeno

La prolina del retículo endoplásmico rugoso sufre una hidroxilación e incorporación a cadenas peptídicas alfa para elaborar protropocolágeno. Este pasa por el aparato de Golgi y es secretado al exterior celular. Una peptidasa amputa sus terminales amino y carboxílico, y se forman moléculas de tropocolágeno.

Las moléculas de tropocolágeno formarán fibrillas, que forman un fieltro laxo por toda la matriz. Las fibrillas así formadas tienen un diámetro variable: 40 nm aproximadamente en las capas próximas a la superficie; 70-100 nm en las medias; y 150 nm en las profundas.

A pesar de todo, la síntesis de colágeno en el cartílago articular adulto es casi nula. La red de colágeno es construida y desarrollada antes de la madurez del individuo. En el adulto, en condiciones normales, no hay turnover de colágeno, salvo un proceso modesto de conservación y, puede ser, de reparación. También la actividad de las colagenasas y metaloproteinases (sintetizadas por células conjuntivas, incluyendo condrocitos) está reducida.

1.4.2. Polipéptidos reguladores de los procesos metabólicos del cartílago

Los polipéptidos reguladores de los procesos metabólicos del cartílago son conocidos como factores de crecimiento (ciertos de ellos son mitógenos e intervienen probablemente en los procesos de reparación). Los mecanismos de regulación producidos por estos en condiciones normales y patológicas están por precisar. Entre ellos se cita el IGF-1, que aumenta la síntesis de agreicanos; y el TGF β , que aumenta la síntesis de agreicanos, del ácido hialurónico y de pequeños proteoglicanos, principalmente del biglicano. Además, inhibe el catabolismo de los agreicanos y no modifica el contenido en ADN y colágeno del tejido.

El IGF-1 se opone al efecto catabólico sobre los proteoglicanos de la interleukina y del TNF α ; mientras que el TGF β lo hace al IL1 y al ácido retinoico. Ambos pueden ser sintetizados por el cartílago, aunque también el IGF puede proceder del suero y el TGF β de una sinovial inflamada.

1.5. BIOMECÁNICA

La composición y la estructura del cartílago explican sus propiedades biomecánicas. Es un tejido elástico y resistente, lo que explica su deformabilidad y su resistencia a la compresión. La elasticidad se explica por la hidrofilia de los proteoglicanos, 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 de la duración de ésta. Se han realizado estudios ⁶ in vitro con condrocitos en cultivo y ex vivo con fragmentos de cartílago o explantes aplicando fuerzas diferentes, ya sea hidrostática, dinámica, por compresión o, incluso, por estiramiento con condrocitos en cultivo. De forma general, una carga fisiológica permanente (<15 MPa) aumenta el anabolismo, al igual que las fuerzas cíclicas (es decir, una carga intermitente). Por el contrario, una carga mecánica intensa o de velocidad elevada, o una carga intermitente a intervalos cortos, disminuyen la síntesis, sobre todo de los proteoglicanos, y potencialmente se acompaña de fisuraciones de la red de colágeno. Por último, la inmovilización prolongada de una articulación es también deletérea para su funcionamiento. La falta del efecto de bomba que posibilita el transporte de las macromoléculas conduce a la atrofia del cartílago que, a su vez, puede ser fuente de una artropatía degenerativa. Además, en esta situación, la reducción de la cinética del líquido articular provoca una acidificación nefasta para el cartílago.

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.

1.6. DINÁMICA DEL TEJIDO CARTILAGINOSO

Toda célula oscila entre dos estados: evoluciona hacia la muerte celular o sobrevive (con etapas de reposo, proliferación y división). Las células con mitosis frecuentes pasan por un proceso de senescencia llamada replicativa ⁵⁰. La protección contra la muerte celular reside, sobre todo, en el hecho de que los telómeros se acortan con el tiempo, de manera singular en las células carentes de telomerasa (la gran mayoría de ellas). Por el contrario, las células que expresan la telomerasa (células germinales y linfocitos proliferativos) tienen una vida más prolongada y mayor riesgo de acumular mutaciones.

El condrocito es una célula singular. La falta de vascularización, la ausencia de proliferación en la edad adulta, la lentísima renovación de la matriz, con vida

prolongada de sus componentes principales (colágeno de tipo II y agreganos), podrían otorgar al cartílago una especie de protección contra el envejecimiento. Después de una fase de crecimiento y osificación endocondral, caracterizada por un proceso de maduración celular que lleva al condrocito a la hipertrofia y a la muerte por apoptosis, algunos de ellos sobreviven en el cartílago articular adulto. Se encuentran en un estado de disminución drástica de la velocidad del proceso, que se caracteriza por mitosis escasa o nula. En el cartílago normal del adulto aún joven, las células están en fase G0 no replicativa. Al dividirse sólo un poco, el condrocito está a salvo de la senescencia replicativa. En esas condiciones, la apoptosis (muerte programada natural) pierde mucha velocidad.

Además, el condrocito adulto deriva de un proceso complejo de diferenciación, ampliamente regulado por diferentes factores de crecimiento (FGF β , TGF β). El condrocito adulto se encuentra, en cierto modo, bloqueado en una etapa preproliferativa. Ahora bien, la concentración de esos factores de crecimiento en el cartílago adulto no se conoce con precisión. Un desequilibrio de los factores podría desencadenar el proceso de maduración del condrocito hacia la proliferación y la muerte por apoptosis. Sin embargo, la protección contra la apoptosis natural podría disminuir de manera espontánea con el envejecimiento. En un estudio reciente a partir de 27 donantes de edades diferentes (1-87 años), se comprobó *in vitro* que con el envejecimiento se reduce la actividad mitótica y la longitud del telómero (que brinda protección contra la acción de las enzimas sobre el cromosoma) y que aumenta la expresión de la β -galactosidasa como indicio de la senescencia de la célula ⁵¹.

Con la edad, como respuesta al estrés mecánico, se produce una aceleración del proceso apoptótico ⁵². En la misma línea, en la senectud incluso fuerzas mecánicas normales pueden ser motivo de microfracturas de la red colágena del cartílago y/o del hueso subcondral. En este contexto, donde los radicales libres intermedian procesos de necrosis, el óxido nítrico (NO) es un factor proapoptótico fundamental ⁵³.

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.

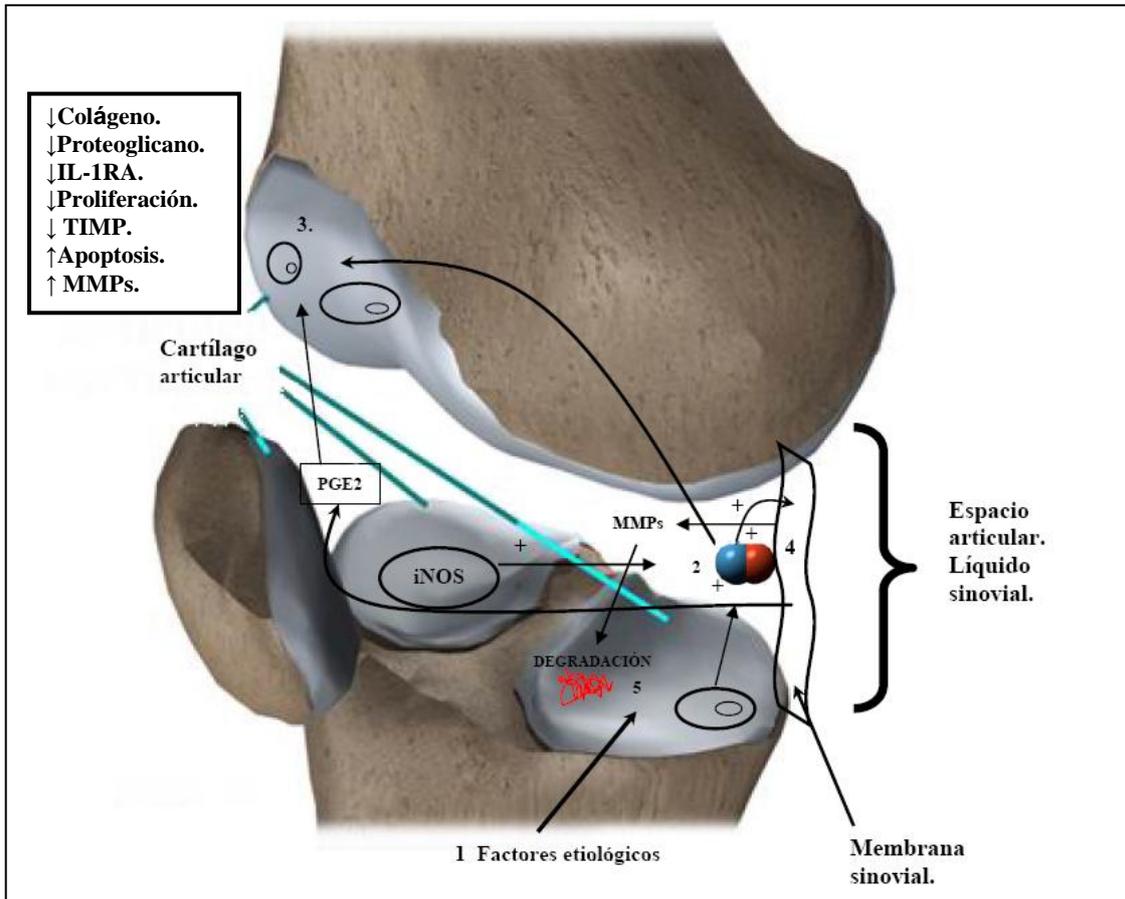
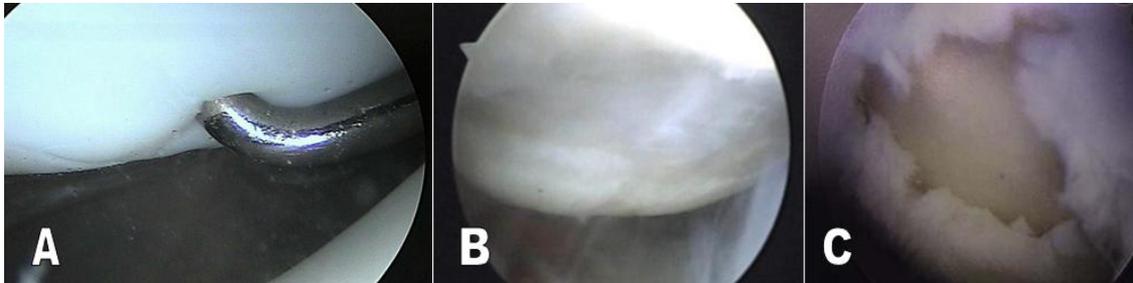


Fig. 8. Representación esquemática de la fisiopatología del óxido nítrico en la destrucción del cartílago articular. 1. Factores desencadenantes de la artrosis que inducen la formación del NO por medio de la iNOS en los condrocitos del cartílago articular. 2. Aumento de los niveles de NO en el espacio articular, donde producen sus efectos biológicos a diferentes niveles. 3. El NO inhibe la síntesis de colágeno, proteoglicanos, IL-1RA y de las TIMP, estimula la síntesis de MMPs e induce la apoptosis sobre los condrocitos. 4. El NO actúa sobre el tejido sinovial favoreciendo la secreción al espacio articular de mediadores proinflamatorios y con capacidad de destruir cartílago como MMPs. 5. La destrucción del cartílago articular produce la liberación al espacio articular de fragmentos de cartílago que liberan factores proinflamatorios.

2. DEFECTOS CONDRALES

El cartílago articular se lesiona como resultado de fuerzas excesivas de compresión en el espesor del tejido cartilaginoso o de cizallamiento a nivel subcondral. Pueden producirse 3 grados de daño tisular (Fig. 9 y Tabla 4).



- | |
|---|
| <p>A. Alteraciones de las células y de la matriz extracelular sin afectación visible de la superficie articular.</p> <p>B. Disrupción macroscópica del cartílago sin afectación del hueso subcondral (lesiones de espesor parcial o lesiones condrales).</p> <p>C. Disrupción macroscópica del cartílago y el hueso subcondral subyacente (lesiones de espesor total o fracturas osteocondrales).</p> |
|---|

Fig. 9 y Tabla 4. Grados de lesión del tejido cartilaginoso del cartílago articular ⁴⁵.

2.1. Lesiones microscópicas del cartílago articular

El cartílago articular puede verse lesionado como consecuencia de un impacto único de alta energía o de traumatismos repetidos de menor energía. En las regiones de impacto se aprecian bandas de condrocitos muertos, lo que repercute de forma negativa en los procesos de degradación y síntesis de la matriz extracelular. La matriz presenta concentraciones reducidas de proteoglicanos, desorganización de la ultraestructura del colágeno y aumento de hidratación tisular (Fig. 9). Estos cambios conducen a una reducción de la rigidez del cartílago y al aumento de su permeabilidad. El cartílago puede así verse afectado de forma negativa por la respuesta enzimática e inflamatoria de la membrana sinovial a los traumatismos. En la actualidad carecemos de métodos complementarios aplicables en la práctica clínica capaces de detectar las lesiones microscópicas del cartílago articular.

2.2. Lesiones condrales

Los traumatismos de mayor energía pueden ocasionar disrupciones macroscópicas del cartílago articular que pueden llegar a fisuras condrales o a desprender fragmentos de cartílago sin afectar al hueso subcondral (Fig. 9).

En las lesiones limitadas a la zona del cartílago propiamente dicha, avascular (lesiones parciales), no hay afectación vascular y ni la sangre ni las células de la médula ósea alcanzan la zona. Los condrocitos de alrededor tampoco migran a la lesión y no se repara la matriz ³³. La reacción local tras una laceración del cartílago limitada a la capa

no calcificada parece ser independiente de la profundidad y la extensión. Aparecen mínimas tentativas de reparación celular, que son infructuosas. Inmediatamente después de la lesión, los condrocitos próximos a la lesión empiezan a necrosarse. Después de unos pocos días, las células que aún son viables muestran cierta actividad mitótica, incrementando la producción de proteínas de la matriz. Sin embargo, el incremento en la actividad metabólica parece ser sólo transitorio, y es incapaz de cicatrizar la lesión. Por otra parte, las lesiones no parecen empeorar al cabo de un año ni progresar hacia la artrosis. Sin embargo, puede apreciarse fibrilación y fisuras del cartílago adyacentes a la lesión.

En contraste con las laceraciones superficiales, que no muestran signos espontáneos de curación, las laceraciones que afectan al cartílago calcificado, pero que respetan la capa de hueso subcondral, muestran algún revestimiento fibroso de las fisuras y un mayor acúmulo celular. No obstante, este proceso limitado de curación no es capaz de rellenar y curar una lesión profunda.

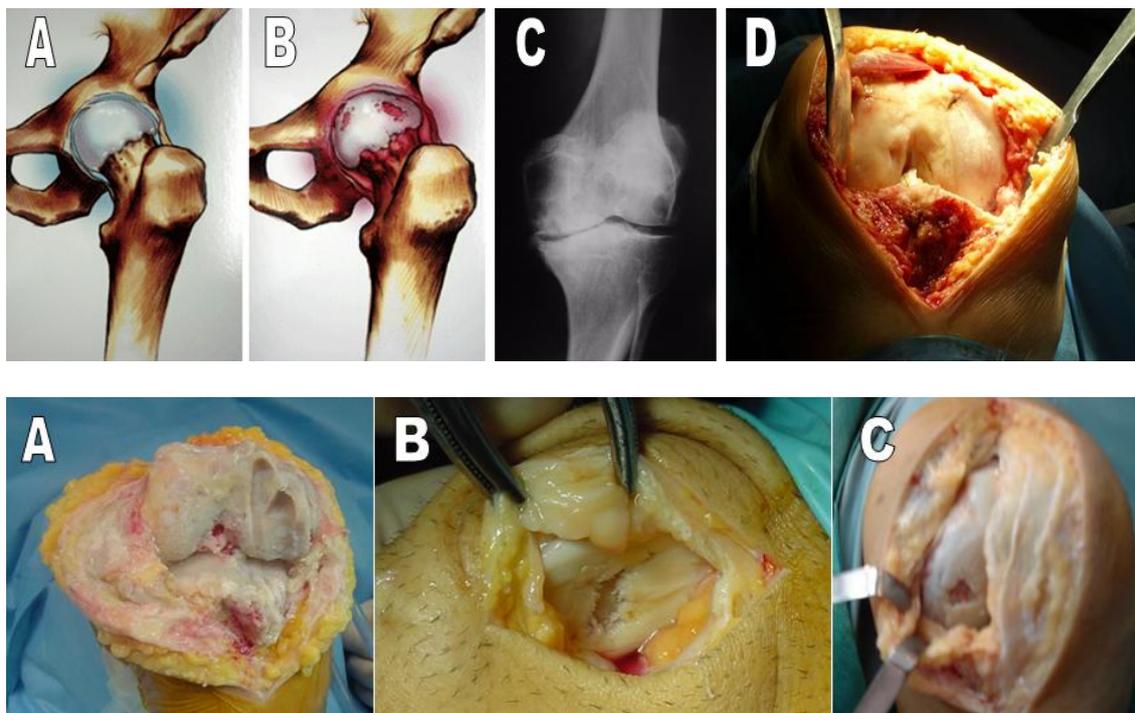
Las manifestaciones clínicas de las lesiones condrales son variables. Si existen fragmentos de cartílago libres que se desplazan por la articulación, los pacientes pueden experimentar episodios de bloqueo articular y otros signos mecánicos. La alteración de la superficie articular se manifiesta con dolor y crepitación, pudiendo existir, además, derrame articular. Los defectos condrales de mayor entidad pueden conducir a cambios degenerativos del resto de la articulación. El diagnóstico puede confirmarse mediante resonancia magnética o mediante una exploración artroscópica de la articulación afecta.

2.3. Lesiones de espesor completo del cartílago

En las lesiones del espesor total del cartílago (Fig. 9), en las cuáles hay un daño de la capa condral y del hueso subcondral, se observa una ruptura de vasos y formación de hematoma. Células condroprogenitoras derivadas de la médula ósea migran a la lesión e inician un proceso de reparación que resulta en la formación de un tejido fibrocartilaginoso. Estas células tienen su origen a partir de células mesenquimales progenitoras (*stem cells*), provenientes de la sangre, médula ósea y células endoteliales. Son pluripotenciales y toman el camino condrogénico u osteogénico dependiendo de su localización en la superficie articular, en función de las fuerzas de carga a las que se ven sometidas y a la tensión de oxígeno existente en el ambiente. Inicialmente, un coágulo de fibrina rellena el defecto y es reemplazado por tejido de granulación con fibroblastos y fibras de colágeno. Al mismo tiempo, el hueso subcondral empieza a remodelarse, lo que es evidente al observar la presencia de gran actividad osteoclástica y osteogénica. La metaplasia de los fibroblastos en condrocitos y la producción de proteínas de la matriz cartilaginosa comienza al cabo de dos semanas de la lesión. Los condrocitos se acumulan en las proximidades de aquélla, aunque no migran hacia el defecto ni son realmente factores significativos en la reparación lesional. Tampoco lo es el flujo de matriz proveniente del cartílago adyacente sano. La remodelación del tejido fibroso en el cartílago se produce entre las 6 y las 12 semanas después de las perforaciones del hueso subcondral. Por encima de los 3 meses la continuación del proceso reparador no es frecuente. Por el contrario, algunas zonas del cartílago con aspecto similar al hialino degeneran, convirtiéndose en tejido fibroso. Al mismo tiempo, en la porción ósea del defecto se genera tejido óseo inmaduro que posteriormente es reemplazado de forma gradual por tejido maduro.

La liberación de mediadores vasoactivos y factores de crecimiento (factor transformador de crecimiento beta o TGF- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas y proteínas óseas morfogenéticas), procedentes tanto de las plaquetas como de la matriz ósea, juegan un papel importante en la estimulación de la reparación de los defectos osteocondrales. Comparado con el cartílago articular hialino normal, el fibrocartílago tiene características biomecánicas inferiores, está pobremente organizado, contiene cantidades grandes de colágeno tipo I y es susceptible a la rotura, lo cuál, con el tiempo y la carga, conduce a la artrosis.

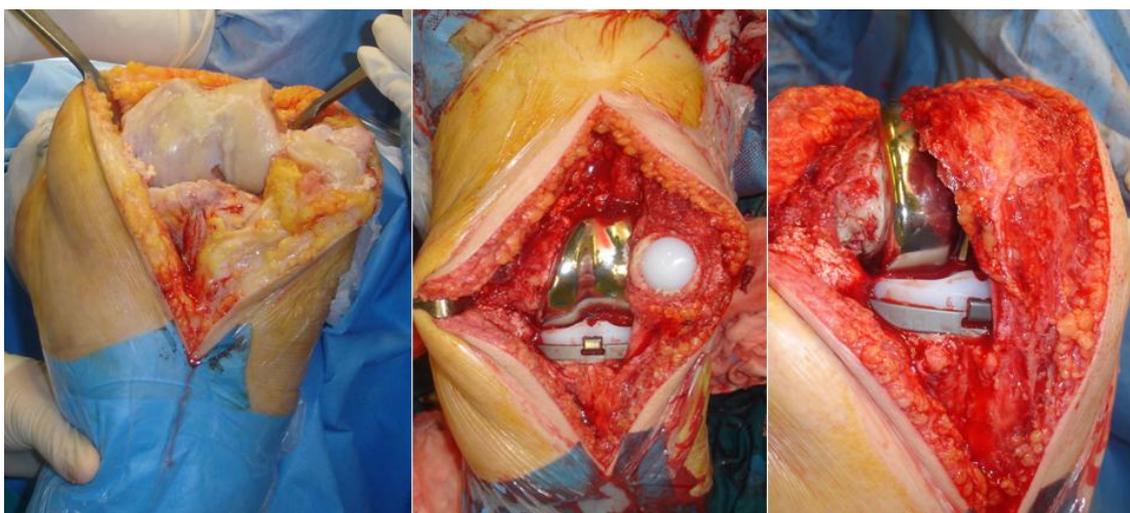
Además de la importancia de la profundidad de las lesiones, el diámetro parece ser también un factor determinante. Las lesiones de 3 mm o más de diámetro cicatrizan con mayor dificultad que las de menor diámetro ⁸⁷.



Figs. 10 y 11. Ejemplos de lesiones condrales. En la fila superior, de etiología artrósica: representación esquemática de una coxartrosis (A y B) y radiografía simple (C) y aspecto macroscópico de una gonartrosis (D). En la fila inferior, úlcera condral por material de osteosíntesis (A), condropatía rotuliana evolucionada (B) y osteocondritis disecante de rodilla (C).

3. TRATAMIENTO DE LOS DEFECTOS CONDRALES

El tratamiento de los defectos condrales es difícil y controvertido. Si en pacientes ancianos el problema no es tanto, habida cuenta de la posibilidad de la sustitución articular con una prótesis de rodilla, que suele deparar buenos resultados clínicos (Fig. 12 y Tabla 5), en pacientes jóvenes, debido a las complicaciones de la artroplastia (Tabla 6), sí lo es. También lo es cuando en estos pacientes de menor edad recurrimos a procedimientos alternativos, como las osteotomías en la rodilla o, más recientemente, las descompresiones en coxartrosis de inicio, de resultados impredecibles (Figs. 13 y 14 y Tabla 7).



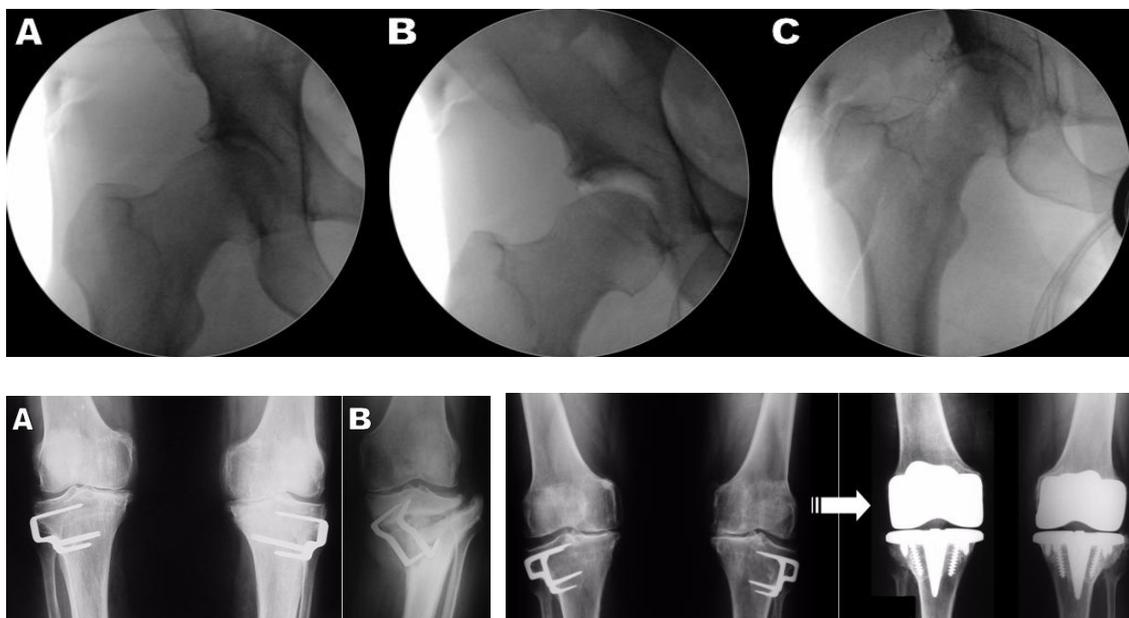
Autores	Nº de rodillas	Edad (años)	Seguimiento (años)	Comentarios
Pennington y cols, 2003	46	< 60	11	Supervivencia: 92%
Gioe y cols, 2003	516	68	2-13	Supervivencia 20 años: 89%
Squire y cols, 1999	103	69	15	Supervivencia: 90%
Berger y cols, 1999	62	68	7.5	Supervivencia: 98%
Schai y cols, 1998	28	< 60	2-6	Revisiones: 2

Autores	Nº de rodillas		Seguimiento (años)		Buenos/excelentes resultados (%)	
	PUnic.	OTA	PUnic.	OTA	PUnic.	OTA
Broughton y cols, 1986	42	49	5-10	5-10	76	43
Ivarsson y Gillquist, 1991	10	10	1	1	80	40
Sukengorg-Colsman y cols, 2001	28	32	7	7	65	71
	PUnic.	PTR	PUnic.	PTR	PUnic.	PTR
Cameron y Jung, 1988	20	20	3	3	80	90
Laurencin y cols, 1991	23	23	7	7	96	83
Newman y cols, 1998	51	51	5	4	-	-
Koskinen y cols, 2008	1886	48607	15	15	Superv.: 60%	Superv.: 80%

Figura 12 y Tabla 5. En la figura, ejemplo de sustitución articular con una prótesis total de rodilla. En la tabla, resultados clínicos de prótesis unicompartmentales de rodilla. Abajo, resultados comparativos entre prótesis unicompartmentales de rodilla (PUnic), osteotomías tibiales altas (OTA) y prótesis totales de rodilla (PTR). Modificado de Pagnano y cols⁸⁸.

<p>Complicaciones generales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Muerte (excepcional, generalmente por embolia pulmonar masiva) - Tromboembolismos (hasta el 40%) <p>Complicaciones locales</p> <ul style="list-style-type: none"> - Complicaciones cutáneas: seromas, hematomas y necrosis - Infecciones (2% -67% tardías-) - Complicaciones neurovasculares (parálisis del nervio peroneo -0.58%-, vasculares -0.2%-) - Rigidez (1.3-12%) - Inestabilidad - Complicaciones del aparato extensor (4-13%) <ul style="list-style-type: none"> - Si no implante rotuliano: dolor en cara anterior de rodilla (50%) - Si implante rotuliano (5-50%): inestabilidad femoro-patelar (< 1%), fractura de rótula (1-2%), desgaste y aflojamiento (< 2% si no cementado; 0.6-11% si no cementado) o fallo del componente patelar; síndrome del choque patelar (3.5%) y rotura del aparato extensor de la rodilla (0.17-2.5%) - Movilización aséptica - Fracturas periprotésicas (intraoperatorias o postoperatorias, del fémur, de la tibia o de la rótula. Supracondíleas postoperatorias: 0.3-2%) - Otras: neuroma cicatricial; síndrome de dolor regional complejo (0.8%)
--

Tabla 6 .Resumen de las complicaciones de las prótesis totales de rodilla primarias ⁸⁹.



<ul style="list-style-type: none"> - Recidiva de la deformidad (varo en osteotomías valguizantes) ->30%- - Sobrecorrección (con defecto cosmético) / infracorrección (con persistencia del dolor) - Alteración de la cinemática fémoro-patelar, con dolor en cara anterior de rodilla - Malalineamiento fémoro-patelar - Patela baja - Aumento del ángulo Q y subluxación patelar - Fracturas (hasta 20% en osteotomías valguizantes de sustracción) - Retardos de consolidación y pseudoartrosis (3.6% en osteotomías proximales al tubérculo tibial) - Traumatismos del nervio peroneal (0-20%) y de la arteria poplítea - Infecciones superficiales y profundas (0-4%) - Tromboembolismos (hasta 41% de alteraciones venográficas)

Figs. 13 y 14 y Tabla 7. En la fila superior, control radiológico del tratamiento de una coxartrosis incipiente por compresión fémoro-acetabular (A) y descompresión (B y C). En la fila del centro, ejemplo de osteotomías en una gonartrosis bilateral (A), pseudoartrosis de una osteotomía tibial en otro paciente (B) y, a la derecha, rescate del fracaso de osteotomías valguizantes con sendas prótesis totales de rodilla. Abajo, relación de complicaciones tras osteotomías en el entorno de la rodilla ⁹⁰.

Actualmente no existe ninguna técnica satisfactoria ampliamente aceptada para la reparación regenerativa de las lesiones condrales^{12, 14}, existiendo, de hecho, una gran variedad de métodos terapéuticos (Tabla 8).

Reducción anatómica y fijación estable	<ul style="list-style-type: none"> - Fracturas osteocondrales - Osteocondritis disecante
Tratamiento sintomático	<ul style="list-style-type: none"> - Lavado artroscópico - Desbridamiento artroscópico
Estimular o provocar la reparación de la lesión condral por parte del organismo	<ul style="list-style-type: none"> - Estimulación de la respuesta procedente del hueso subcondral: <ul style="list-style-type: none"> - Perforaciones múltiples - Microfractura múltiple - Artroplastia por abrasión - Espongiolización - Injertos periósticos - Injertos de pericondrio
Implantes o trasplantes de cartilago	<ul style="list-style-type: none"> - Mosaicoplastia (autoinjerto) - Trasplante de aloinjerto osteocondral - Trasplante de condrocitos alógenos. - Trasplante de condrocitos autólogos. (ACI). - Implantes de andamiajes (MACI). - Trasplante de células mesenquimales.
Gestos asociados	<ul style="list-style-type: none"> - Osteotomías correctoras en pacientes con malalineamiento de los miembros - Reconstrucciones ligamentosas - Reparación o reconstrucción (trasplante) meniscal
Sustitución de las zonas de lesión por implantes	<ul style="list-style-type: none"> - Artroplastia patelofemoral - Artroplastia unicompartimental - Artroplastia total

Tabla 8. Estrategias disponibles para el tratamiento de las lesiones condrales articulares.

3.1. Reducción anatómica y síntesis estable

La reducción anatómica y una síntesis estable es el tratamiento de elección de las fracturas osteocondrales que lo permiten y de algunas osteocondritis disecantes, compartiendo principios terapéuticos (Tabla 9).

<ol style="list-style-type: none"> 1. Restablecer anatómicamente la superficie articular 2. Mejorar el aporte vascular al fragmento 3. Si existe inestabilidad del fragmento, emplear métodos de fijación rígida 4. Iniciar la movilidad articular tan pronto como sea posible
--

Tabla 9. Fundamentos del tratamiento de las lesiones osteocondrales.

3.2. Tratamiento sintomático

3.2.1. Lavado artroscópico

El lavado artroscópico es el tratamiento más antiguo y simple de la gonartrosis por vía artroscópica, aunque también puede practicarse con menos morbilidad y coste con una aguja percutánea de calibre². Consiste en hacer pasar suero salino o una solución de

ringer lactato por el interior de la rodilla para eliminar por arrastre los productos de degeneración articular (partículas, enzimas degradativas y mediadores de la inflamación) y, así, enlentecer el catabolismo de proteoglicanos y colágeno y minimizar la respuesta inflamatoria que aquéllos facilitan^{1,3}. Practicado de forma aislada, pues puede asociarse a desbridamientos, la respuesta suele ser temporal y limitada⁵⁴.

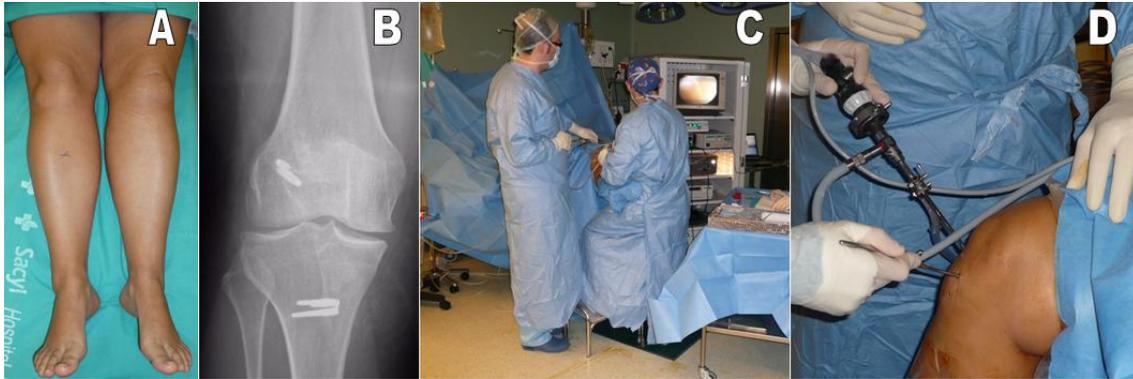


Fig. 15. Ejemplo de lavado artroscópico en paciente con gonartrosis postraumática (A y B). Se observa la artroscopia diagnóstica (C) y un detalle del procedimiento (D).

3.2.2. Desbridamiento artroscópico

El desbridamiento artroscópico (Fig. 16), que implica un lavado articular, consiste en alisar las superficies meniscales y articulares inestables, eliminar cuerpos libres y sinovitis hipertrófica y reducir los osteofitos de la espina tibial procurando no dañar el cartílago sano ni exponer el hueso subcondral. Con todo ello se eliminan elementos mecánicamente irritantes de la cavidad articular y obstáculos para la movilidad de la rodilla. Aunque los resultados del procedimiento son controvertidos y no detienen la evolución de la enfermedad artrósica, en algunos casos proporciona buenos resultados, sobre todo cuando se indica para retirar obstáculos mecánicos para la función articular normal, sobre todo tras lesiones traumáticas focales². El alivio sintomático producido por el desbridamiento es inicialmente bueno, con el 80% de mejoría durante el primer año, pero los resultados se deterioran con el tiempo⁵⁵.

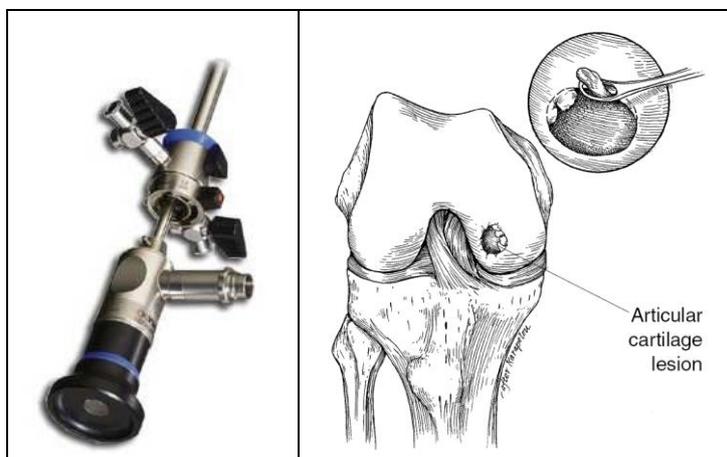
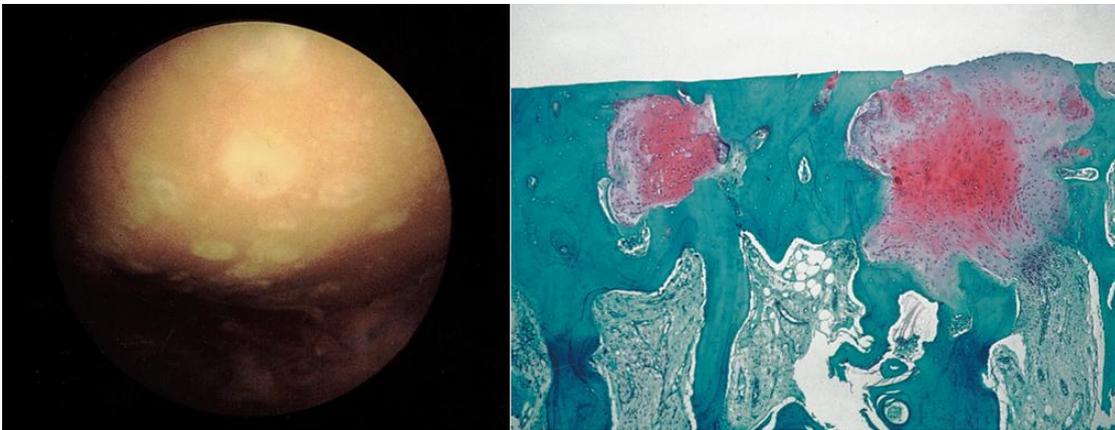


Fig. 16. Desbridamiento artroscópico de un fragmento condral. Tomado de Hunt y cols.².

3.3. Estimulación o provocación de la reparación por parte del organismo

3.3.1. Estimulación del hueso subcondral

La placa de hueso subcondral separa el rico plexo vascular de la médula ósea del cartílago articular avascular. Mediante la apertura del hueso subcondral y, como en algunas técnicas, penetrando en él, los fibroblastos y las células pluripotenciales mesenquimales pueden invadir el área dañada y producir tejido de reparación capaz de rellenar una lesión condral. Sin embargo, el tejido de reparación, incluso si inicialmente tenía apariencia condroide, degenerará en fibrocartílago con el tiempo. Las siguientes técnicas se incluyen en este grupo: perforación múltiple y microfractura múltiple, que penetran en el hueso trabecular; artroplastia por abrasión, que afecta solamente al estrato superficial del hueso subcondral y no penetra realmente en el hueso trabecular; y la espongiolización, que supone la eliminación del hueso subcondral dejando una superficie de hueso esponjoso trabecular.



Figs. 17 y 18. A la izquierda, visión artroscópica de islotes de fibrocartílago reparativo de lesiones condrales. A la derecha, fotomicrografía de una muestra de un área de fibrocartílago. Tinción: safranina. 100x. El tejido es de diferente estructura, composición y propiedades mecánicas que el hialino. No tiene proteoglicanos ni otras proteínas fundamentales del cartílago hialino y es, por lo tanto, más susceptible a la rotura. Aunque cubra el defecto, fracasa en la distribución de cargas y en la prevención de la degeneración, con resultados clínicos generalmente pobres ². El fibrocartílago contiene principalmente colágeno tipo I y relativamente poca cantidad de agreganos ¹³.

3.3.1.1. Perforaciones múltiples

Pridie ⁵⁶, en 1959, fue el primero en introducir el drenaje del hueso subcondral como técnica de reparación del defecto condral. Insall hizo un seguimiento de pacientes con este tratamiento durante 6 años y demostró un índice de éxito de aproximadamente el 40% ⁵⁷.

Las perforaciones consisten en practicar varios microtúneles osteocondrales separados entre sí por 3-4 mm, de 4 mm de profundidad, para crear una superficie articular de fibrocartílago capaz de soportar la carga sin daño ulterior. Con el paso del tiempo, sin embargo, el tejido neoformado, en un principio de naturaleza similar a la del cartílago hialino, experimenta una serie de cambios degenerativos que llevan a su transformación hacia un tejido fibroso cuya superficie resulta fibrilada.

La perforación múltiple afecta a los huesos subcondral y trabecular y, por ello, afecta también a la unidad funcional del cartílago. Las propiedades elásticas del hueso subcondral están sometidas a variaciones, como son los efectos de absorción de impactos de la placa de hueso subcondral y trabecular. Ésta podría ser una de las explicaciones de la degeneración del tejido de reparación subsiguiente a la técnica.

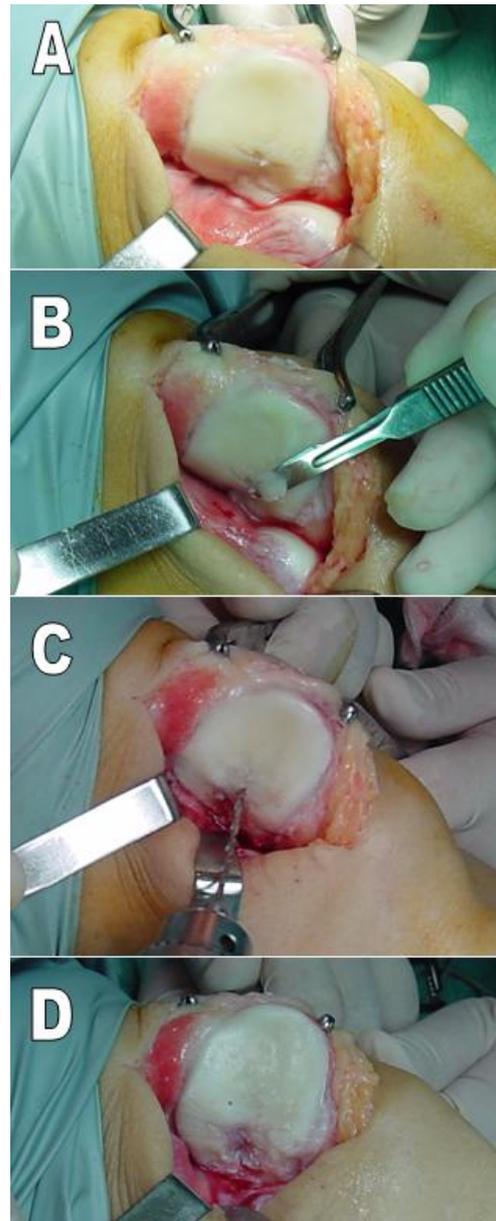


Fig. 19. Secuencia de tratamiento de una lesión condral de la rótula (A): desbridamiento con bisturí (B), perforaciones (C) y aspecto final del lecho (D), listo para ser asiento de tejido fibrocartilaginoso.

3.3.1.2. Microfractura múltiple

Steadman y Rodrigo ⁵⁸ introdujeron una técnica similar a la perforación pero con penetración exclusivamente de la placa de hueso subcondral, después del desbridamiento del defecto, para conseguir cartílago sano.

La idea de las perforaciones subcondrales fue la base principal de la técnica de la microfractura, que es un procedimiento mínimamente invasivo y de bajo coste que, actualmente, se ha convertido en el método de primera elección en pacientes previamente no tratados ¹². Desbridada la lesión con una cureta y expuesto el hueso subcondral, se hacen “microfracturas” con un punzón artroscópico de forma que queden 3 ó 4 agujeros de unos 4 mm de profundidad en cada cm². Frente a técnicas similares, depararía menos necrosis termal en el hueso subcondral, manteniendo su integridad y una superficie áspera donde se adhiriera el coágulo a partir del cual se formaría el fibrocartílago. Como en las técnicas de la artroplastia por abrasión y perforaciones, se recomienda la movilidad pasiva de la rodilla después del procedimiento y la descarga del miembro durante 6-8 semanas ². La ventaja de la técnica es que preserva la placa de hueso subcondral, aunque también puede incrementar la rigidez de la misma a largo plazo.

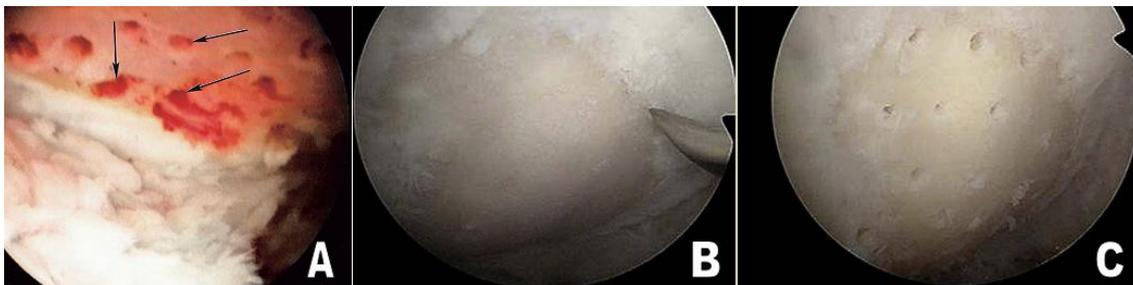


Fig. 20. Imagen artroscópica de microfractura múltiple, donde se observan elementos procedentes de la médula ósea, como son la sangre y la grasa (flechas negras), afluyendo a la cavidad articular después de que se haya disminuido la presión del líquido de irrigación en la artroscopia (A). A la derecha, lesión condral de espesor completo (B) y control artroscópico de la técnica finalizada (C).

3.3.1.3. Artroplastia por abrasión

La artroplastia por abrasión fue introducida hace aproximadamente unos 25 años por Johnson, que informó de un índice de éxitos del 77% a los 2 años de seguimiento ⁵⁹. Implica el raspado superficial del hueso subcondral con una fresa mecánica, eliminando 1-2 mm de la superficie ósea. Alcanza la vascularización intracortical, donde los fibroblastos y las células pluripotenciales pueden repoblar el defecto y facilitar la formación del tejido fibrocartilaginoso de sustitución. En el postoperatorio la carga debe demorarse 8 semanas y el tejido fibrocartilaginoso se forma al cabo de 9 meses. Aunque éste puede mantener su integridad más de 6 años, los resultados de la artroplastia por abrasión tienden a deteriorarse con el tiempo, presumiblemente como resultado del deterioro de la capacidad de carga del fibrocartílago reparativo ². Al cabo de 5 años los éxitos se cifran en porcentajes próximos al 50% ⁶⁰.

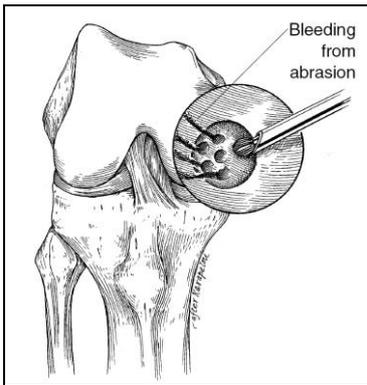


Fig. 21. Esquema de artroplastia por abrasión con instrumental mecánico. También podría hacerse con láser, si bien encarece el procedimiento y puede complicarse con osteonecrosis por penetración subcondral marcada. Tomado de Hunt y cols.².

3.3.1.4. Espongiolización

La espongiolización fue introducida por Ficat y cols. en 1979⁶¹. Consiste en la extirpación completa de la placa de hueso subcondral, dejando expuestas las superficies de hueso trabecular. El 75% de los pacientes experimenta mejoría al cabo de 2 años de seguimiento, si bien la técnica se utiliza más en lesiones extensas, especialmente rotulianas y trocleares.

3.3.2. Injerto perióstico

El periostio posee un potencial condroide, como ha sido puesto de manifiesto por Salter, Rubak y O'Driscoll⁶². La utilización del periostio, con su estrato más profundo (el *cambium*) enfrentado a la articulación, ha sido practicada por Salter y O'Driscoll en combinación con el movimiento pasivo continuo en estudios en animales. El 58% de los conejos presentaron cartílago articular hialino de reparación. En el uso clínico de esta técnica los resultados informados no han sido importantes.



Fig. 22. Imagen de injerto perióstico en patela⁹¹.

3.3.3. *Injerto de pericondrio*

El injerto de pericondrio es otro procedimiento en el intento de restauración de los defectos de cartílago articular. Se ha usado el de las costillas, apuesto en el defecto sobre una superficie de hueso subcondral abrasionada y fijado con solución de fibrina, si bien con resultados mediocres ^{67, 68}.

3.4. **Implantes o trasplantes de cartílago**

3.4.1. *Autotrasplante osteocondral. Mosaicoplastia*

El autotrasplante osteocondral consiste en la resección limitada de un fragmento de tejido osteocondral sano de la misma rodilla en la que se localiza la lesión y trasplantarlo al defecto. Cuando éste es inferior a 15 mm el abordaje puede hacerse por vía artroscópica y una de sus formas es la mosaicoplastia, que también puede realizarse a través de una artrotomía ¹. La técnica, descrita y popularizada por Hangody en 1993 ^{8, 16}, aunque con limitaciones por la morbilidad que supone en el lugar de la donación y dificultades para tratar defectos extensos, así como para obtener superficies condrales con la convexidad exacta ¹⁴, depara resultados histológicos y clínicos satisfactorios ^{9, 10}.

La mosaicoplastia se realiza con el paciente en decúbito supino, con anestesia general o espinal e isquemia del miembro. Comienza con una revisión artroscópica de la articulación para descartar y tratar patologías asociadas, lo cual sucede no infrecuentemente, así como para poder medir las dimensiones de la patología condral u osteocondral a tratar y su localización y, en base a ello, decidir si continuar el procedimiento por vía artroscópica o hacerlo a través de una artrotomía. Según Pérez-Caballer ⁹, cualquier lesión mayor de 1,5 cm en alguno de sus diámetros o situada claramente posterior a la región central de carga del cóndilo femoral, es abordada con mayor seguridad y eficacia mediante cirugía abierta (Fig. 23). El resto podría tratarse, en principio, de forma artroscópica.

El defecto condral, previamente inspeccionado y medido, se somete a una condroplastia por abrasión en sus bordes, con instrumental motorizado y, a continuación, a un fresado de poca profundidad en el fondo, hasta la aparición de un discreto sangrado. En función del tamaño del defecto se elige el número apropiado de injertos a utilizar y su correspondiente dimensión individual, que puede oscilar entre 5 y 9 mm, y se procede a su obtención de una zona articular que no sea de carga. La de elección es la del margen súper-interno o súper-externo de la articulación fémoro-patelar, alejadas del recorrido de la patela sobre la región supracondílea (Fig. 23). Con extractores específicos, repitiendo el procedimiento tantas veces como sea necesario, se obtienen cilindros osteocondrales de profundidad comprendida entre 12 y 15 cm, que se preparan e introducen en el defecto con un impactor, permitiéndose que sobresalgan no más de 1 mm de la superficie articular adyacente.

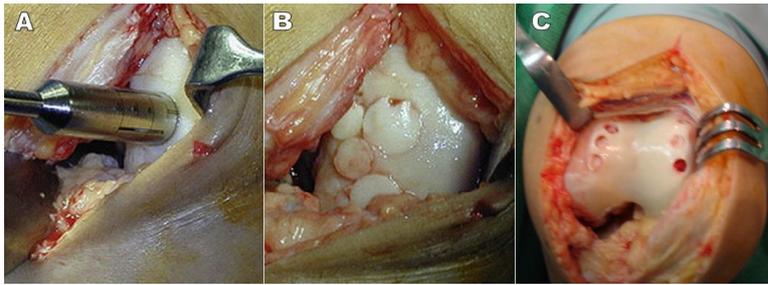


Fig. 23. Mosaicoplastia abierta: detalle de la colocación de los injertos (A y B) y aspecto del lugar de la donación (C).

3.4.2. Trasplante de aloinjerto osteocondral

El trasplante de homoinjertos osteocondrales es una alternativa terapéutica en la reparación de grandes defectos condrales. Su uso se remonta a primeros del siglo XX⁶⁹, con resultados aceptables a pesar de las complicaciones de los homoinjertos, que cuestionan su empleo en pacientes jóvenes^{70, 71}. Otros inconvenientes son la reducida viabilidad celular del injerto, limitada al 10-30% del contenido celular normal, la nula integración del cartílago trasplantado y la dificultad técnica de la fijación.



Fig. 24. Tratamiento de un defecto osteocondral del cóndilo femoral interno (A) con un homoinjerto osteocondral (B y C). Tomado de Getgood y cols.⁹².

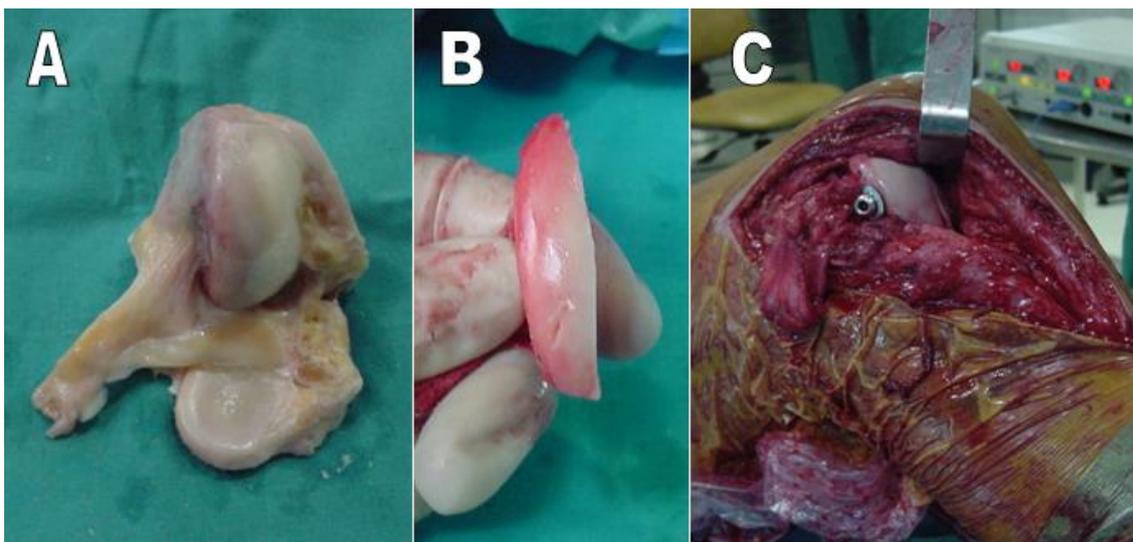


Fig. 25. Tratamiento de un defecto osteocondral postraumático del cóndilo femoral externo. Se observa el homoinjerto osteocondral antes (A) y después (B) del tallado, y el aspecto final de la reconstrucción, utilizando un tornillo para la fijación del injerto (C).

3.4.3. *Trasplante de condrocitos homólogos*

El trasplante de condrocitos homólogos fue publicado por primera vez en 1968¹⁷, con pobres resultados debido a la dificultad para mantenerlos físicamente en el lecho donde se trasplantaban y en condiciones adecuadas para su crecimiento. El colágeno como andamiaje corrigió gran parte de esas deficiencias con mejores resultados^{14, 18, 19}.

3.4.4. *Trasplante de condrocitos autólogos: ACI*

La técnica ACI (autotrasplante de condrocitos autólogos), aprobada por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) en 1997, aunque publicada por primera vez en modelos animales en 1989^{18, 20}, así como su efectividad clínica en 1994¹, se ha realizado en más de 20.000 pacientes en todo el mundo¹⁴. Su efectividad, sin embargo, continúa controvertida y no se ha demostrado su superioridad frente a la mosaicoplastia^{21, 22} ni frente a otra técnica de mucho menor coste, como la microfractura²³. Además, es difícil de realizar en algunas áreas articulares por motivos anatómicos o ser muy difícil la fijación del colgajo perióstico en defectos sin un claro borde cartilaginoso sano.

El mecanismo del proceso reparador de los defectos condrales con trasplantes de condrocitos autólogos es desconocido. Se ha sugerido la producción de una nueva matriz cartilaginosa; el estímulo de la replicación de los condrocitos a partir del periostio; y el estímulo de los condrocitos del cartílago sano vecino al defecto o de las células de la profundidad del hueso subcondral por el periostio y las células trasplantadas¹. Sin embargo, aunque los resultados a corto y medio plazo han sido buenos, el procedimiento tiene los inconvenientes del riesgo del derrame o escape de los condrocitos trasplantados desde el defecto, una desigual distribución de los mismos en la zona a tratar (debido al efecto de la gravedad), la hipertrofia perióstica, la pérdida de células dentro de la cavidad articular y la complejidad del procedimiento quirúrgico, que supone reintervenciones en alrededor del 25-36% de los casos^{33, 72, 73, 74}. La dificultad para adquirir el fenotipo de los condrocitos previamente desdiferenciados es otra desventaja del método¹². A pesar de todo, sus resultados pueden mejorar con la sustitución del periostio por una membrana de colágeno, que reduciría la hipertrofia del injerto^{73, 74}, y con la conocida como segunda generación ACI, basada en el uso de andamiajes. Estos podrían actuar como barrera para la invasión del injerto por fibroblastos, que pudieran inducir una reparación fibrosa⁷⁵.

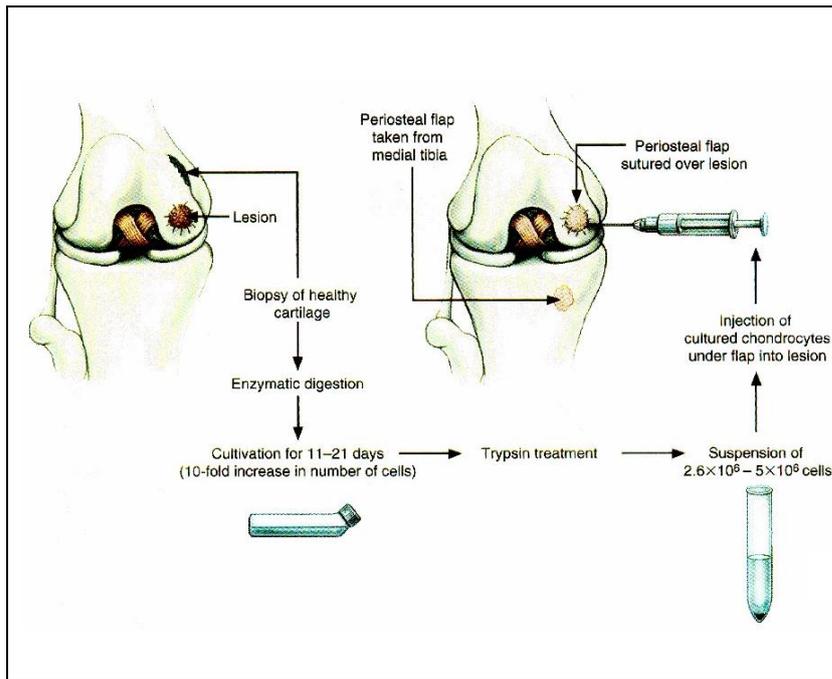


Fig. 26. Esquema del trasplante de condrocitos autólogos en el cóndilo femoral, según Brittberg y cols. (1). La técnica se resume en 3 tiempos: 1) artroscopia de rodilla para obtener muestras de cartilago de 300-500 mg de peso aproximado, de una zona articular libre de cargas; 2) procesado de las muestras (obteniendo 2.6-5 millones de células en un volumen de 50-100 microlitros; y 3) trasplante de los condrocitos a los 14 ó 21 días de la toma (a través de artrotomía, escisión de la lesión condral hasta alcanzar el cartilago sano, cobertura del defecto con un colgajo perióstico tomado de la cara medial del extremo proximal de la tibia que se sutura con Dexon de 5-0, e inyección de los condrocitos cultivados). Al cabo de 8 semanas se autoriza la carga progresiva.

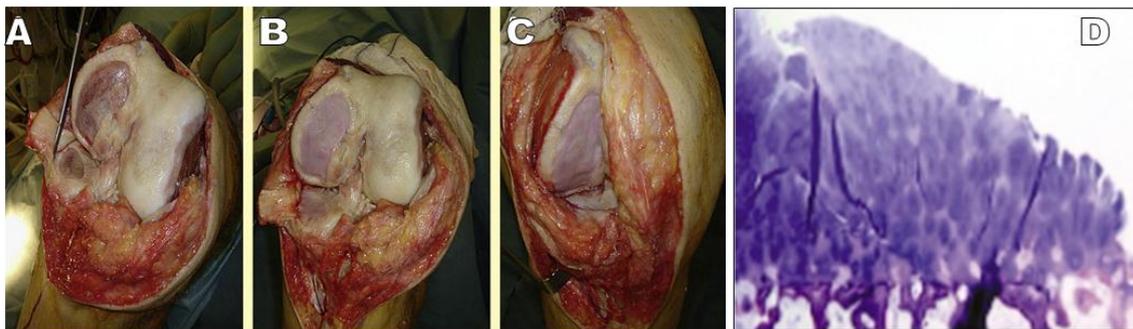


Fig. 27. Técnica ACI: aspecto de la lesión desbridada (A) y tras el injerto con una membrana de colágeno de contención (B y C). A la derecha, biopsia de un paciente sometido a la técnica mostrando la formación de cartilago hialino (D). Tomado de Getgood y cols ⁹².

3.4.5. Trasplante de células mesenquimales

Puesto que células aisladas de la médula ósea tienen el potencial para diferenciarse a otras específicas de tejidos mesenquimales ^{24, 25, 26, 27}, se ha ensayado el trasplante de aquellas células en defectos osteocartilaginosos en estudios experimentales y clínicos con buenos resultados ^{28, 29}. En el contexto artrósico de la rodilla, sin embargo, se ha desaconsejado su uso ³⁰. Con la misma intención de diferenciación condroblástica las células mesenquimales podrían obtenerse de otros tejidos más accesibles ¹⁴. Entre estos, el sinovial parece el asiento de las células con más capacidad de diferenciación condral ³¹, mientras que la grasa ofrece la ventaja de su gran abundancia y disponibilidad ³². Otras células utilizadas han sido las mesenquimales derivadas del músculo asociadas a proteína morfogenética (BMP-2), y células embrionarias, si bien estas son difíciles de diferenciar sólo a condrocitos ¹⁴.

En todos los casos habría que contar con la posibilidad de degeneración tumoral; con la de transmitir enfermedades como la encefalopatía espongiiforme bovina por el uso de proteínas xenogénicas en los cultivos celulares; y con el coste de las técnicas ¹⁴.

3.4.6. Trasplante de condrocitos autólogos con andamiajes: MACI.

El implante de condrocitos autólogos con una matriz que sirve de andamiaje o soporte tridimensional a las células (MACI) podría reducir el tiempo quirúrgico y la morbilidad de la técnica ACI (al no precisar de la obtención de periostio), así como los riesgos de hipertrofia perióstica y de adherencias postoperatorias. Sin embargo, la evidencia es relativa en cuanto a una distribución más homogénea de las células dentro del andamiaje y al mantenimiento del fenotipo de los condrocitos, que se cuentan como otras de sus ventajas teóricas. Tampoco hay estudios de resultados clínicos e histológicos de la técnica y, a pesar de la mejoría clínica que puedan experimentar los pacientes, se desconoce el futuro del tejido de reparación. Con todo, tampoco se han demostrado ventajas significativas con respecto al ACI ^{12, 33}.

Los andamiajes de la técnica MACI deben ser biocompatibles, estables mecánica y estructuralmente, con posibilidad de incorporar células (que deben poder anclarse mediante moléculas bioactivas que promuevan su diferenciación/maduración) y biodegradables ¹². De forma particular debieran conseguir una distribución homogénea de un gran número de condrocitos vivos, debieran proporcionar una estabilidad biomecánica inicial y promover la diferenciación celular y la formación de matriz cartilaginosa ¹². Otras mejoras potenciales del procedimiento serían la aplicación de células condroprogenitoras en lugar de condrocitos, para minimizar la morbilidad en el lugar de la donación; o el desarrollo de biofactores y agentes genéticos que se almacenaran en la matriz para que, de forma programada, indujeran una respuesta condrogénica favorable inhibiendo procesos locales o sistémicos contra el injerto.

Las matrices utilizadas hasta la fecha, faltando la ideal, han sido naturales (colágeno, ácido hialurónico, fibrina, alginato, azarosa, chitosan) y sintéticas (ácido poliláctico), con inconvenientes tales como la transmisión de enfermedades o el estímulo de reacciones inmunitarias.

La técnica MACI es idéntica a la del ACI, sin necesidad de hacer la toma de periostio. El cultivo de condrocitos se procesa en una membrana que se implanta al cabo de 4-6 semanas de la extracción, recortada y adaptada a la forma y tamaño del defecto y pegada con fibrina. Con un menor tiempo quirúrgico y más sencillez, con menos posibilidades de perder el injerto líquido, se puede realizar por vía artroscópica anclando la membrana con arpones biorreabsorbibles.

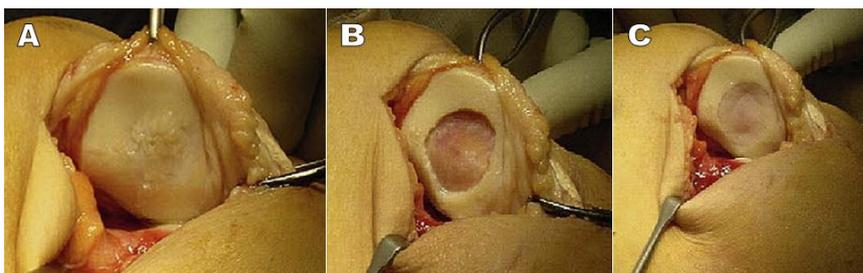


Fig. 28. Técnica MACI en un defecto condral de la rótula (A): desbridamiento (B) y aspecto tras la aplicación del injerto (C). Tomado de Getgood y cols ⁹².

4. INGENIERÍA TISULAR

4.1. Introducción

La ingeniería tisular puede definirse como la creación o inducción de la formación de un tejido específico, en una localización específica, por medio de la manipulación y selección de células, matrices y estímulos biológicos. Es un campo interdisciplinar que aplica principios de ingeniería y ciencias de la vida hacia el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular ⁸⁵.

Actualmente la ingeniería tisular combina el aporte de células, indiferenciadas o no, que se colocan sobre una matriz a la cual se pueden añadir factores de crecimiento que aceleren su proliferación y diferenciación para ser trasplantadas a una estructura dañada y conseguir su regeneración.

Para los cirujanos del aparato locomotor es imperativo el conocimiento de las llamadas ciencias básicas porque contribuirán a la toma de decisiones correctas en la utilización de nuevas tecnologías e, incluso, en el diseño de ensayos para el control de calidad clínica.

4.2. Cultivos celulares

Los antecedentes de los cultivos celulares se remontan al año 1885, cuando Roux demostró que células embrionarias de pollo podían mantenerse en cultivo con suero salino ⁸⁵. Posteriormente, en 1907, Ross Harrison cultivó explantes de embriones de rana en coágulo de su líquido linfático y estudió sus nervios. En 1912 el cirujano e investigador Carrel introdujo técnicas de cultivo con medio nutricional enriquecido con extracto de embrión de pollo y asepsia estricta, consiguiendo mantener poblaciones celulares durante largos periodos de tiempo. Con el fin de poder subcultivar células adherentes, en 1916 se comenzó a utilizar la tripsina.

Todos los cultivos se hacían sobre distintos soportes de vidrio, hasta que se difundió el frasco en T o de "Carrell", también de vidrio, como un envase estándar que permitía hacer observaciones microscópicas de las células *in vitro* (que literalmente significa "en vidrio"), para distinguirlas de las condiciones *in vivo*. Actualmente, en la gran mayoría de los cultivos se utilizan placas o frascos de plástico.

En los años 40, la incorporación de penicilina y estreptomina a los medios de cultivo permitieron disminuir notablemente la contaminación de los cultivos celulares. En 1955, Eagle estudió las necesidades mínimas nutricionales de las células, produciéndose el primer medio básico químicamente bien definido. Seguidamente, en 1965, Ham introdujo el primer medio de cultivo libre de suero capaz de mantener el crecimiento de algunos tipos celulares, quedando así establecidas las bases del moderno cultivo celular.

Las células se disocian del tejido original, se dispersan y se cultivan, habitualmente formando monocapas, aunque también en suspensión, estableciéndose así lo que se denomina cultivo primario. Estas células se tratan con sustancias que las desprenden de la superficie de los frascos de cultivo, pudiendo así realizarse los

subcultivos, que pueden mantenerse diferenciados durante semanas o meses. Sin embargo, todas las células eucariotas normales poseen un número máximo de divisiones programado en su genoma y no soportan más de unas 50 divisiones. Por ello, para el establecimiento de líneas celulares se emplean normalmente células neoplásicas que, por definición, son inmortales.

Pocas células son adecuadas para el cultivo en suspensión y la mayor parte necesitan adherirse a una superficie previamente tratada o recubierta con alguna sustancia que favorezca la fijación de las mismas, para crecer y dividirse. En un principio, los cultivos se hacían con coágulos o geles de plasma. Actualmente se utilizan plásticos especialmente diseñados para favorecer la adhesión celular. Sin embargo, muchas células necesitan crecer sobre una superficie similar a la matriz extracelular, como ocurre con los condrocitos, los cuales, para diferenciarse adecuadamente, necesitan de una matriz generalmente compuesta de colágeno y/o proteoglicanos.

El medio de cultivo basal diseñado por Eagle (BME) ha sufrido muchas modificaciones con el paso del tiempo. El más empleado es aquél modificado por Dulbecco (DMEM -Dulbecco/Vogt modified Harry Eagle minimal essential médium-). Contiene, aproximadamente, cuatro veces más vitaminas y aminoácidos y entre dos y cuatro veces más glucosa, así como hierro y otros elementos que mejoran el crecimiento celular.

4.3. Cultivo de condrocitos

Los condrocitos diferenciados pueden crecer en un medio de cultivo apropiado y dar lugar a clones de células que sintetizan grandes cantidades de matriz extracelular de cartílago, la que, a su vez, contribuye a mantener el fenotipo celular. Otra forma de mantener el fenotipo es la utilizada para el cultivo de órganos. Los subcultivos sucesivos de condrocitos pueden hacer cambiar el fenotipo de los mismos, dependiendo todo ello de las condiciones de cultivo.

Cuando los condrocitos diferenciados se separan de su matriz extracelular pueden cambiar su fenotipo por un proceso que se conoce como modulación⁸⁵ y que ocurre particularmente en los sistemas de cultivo en monocapa. En estos sistemas los condrocitos pueden dejar de segregar colágeno tipo II y sintetizar el colágeno tipo I, a la vez que pierden su forma redondeada característica.

Como factores que podrían influir en el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos se podrían considerar los siguientes: las condiciones del cultivo, la proteólisis de la superficie celular, la degradación de la matriz pericelular, la propia proliferación celular y, finalmente, el grado de contacto celular.

La matriz celular que rodea a los condrocitos tiene un papel fundamental en el mantenimiento de su fenotipo. Los proteoglicanos exógenos de cartílago añadidos al cultivo de condrocitos hacen que la monocapa sintetice una mayor cantidad de proteoglicanos sulfatados. Por el contrario, si a los condrocitos se les provoca la degradación de la matriz pericelular mediante la adición de sustancias como la hialuronidasa testicular, las células sufren una transición a una forma fibroblástica y se produce un cambio en la síntesis del colágeno tipo II hacia colágeno tipo I. Estos

experimentos sugieren que el material extracelular actúa, en parte, como un sistema de retroalimentación positiva haciendo que la síntesis de la matriz cartilaginosa constituya un sistema autoperpetuante del proceso.

Los fibroblastos segregan grandes cantidades de ácido hialurónico mientras que los condrocitos segregan relativamente poca cantidad del mismo. Cuando se añade ácido hialurónico exógeno al cultivo en monocapa, se provoca un efecto inhibitorio de la síntesis de proteoglicanos y de depósito de matriz extracelular del cartílago.

Otro aspecto importante en el control del fenotipo de los condrocitos lo constituye el relacionado con la forma celular. Uno de los factores que puede influenciar en la morfología celular lo constituye la fibronectina, que es una glicoproteína de alto peso molecular que se encuentra en abundancia en la superficie celular de los fibroblastos en cultivo. Se sabe, por otro lado, que los condrocitos diferenciados no poseen fibronectina, ni en la superficie celular ni en su matriz pericelular. Esta sustancia sólo es sintetizada y acumulada por los condrocitos durante los primeros días de cultivo; posteriormente, cuando las células comienzan a depositar matriz extracelular cartilaginosa, la producción de fibronectina cesa. Este hecho sugiere que la fibronectina no favorece la condrogénesis ni el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos, por lo que no sería recomendable añadirla al medio de cultivo. Añadiendo fibronectina exógena a un cultivo de condrocitos en monocapa se estimula una transformación morfológica hacia células fibroblásticas, al mismo tiempo que disminuye la producción de glucosaminoglicanos y se sintetiza colágeno tipo I.

Tanto la densidad como el contacto celular del cultivo de condrocitos en monocapa influye definitivamente en el fenotipo de las mismas, el cual está representado por la forma poligonal característica y por la capacidad para acumular matriz extracelular metacromática. Esta característica descrita sucede en el caso de que la densidad de siembra sea elevada, puesto que en caso contrario, si el cultivo de condrocitos se hace sembrándolos a una densidad baja, las células tienden a asociarse en agregados o clones formando colonias separadas unas de otras y adheridas a la superficie del frasco de cultivo. En el centro de estas colonias los condrocitos tienden a rodearse de una matriz propia del cartílago. En la periferia, sin embargo, la secreción de matriz cartilaginosa se hace cada vez menor, hasta tal punto que las células más periféricas segregan colágeno tipo I y van tomando una forma fibroblástica.

Otros aspectos a tener en cuenta para el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos en cultivo son los relacionados con la concentración de CO₂ y oxígeno en la atmósfera que rodea al cultivo. Tensiones bajas de oxígeno favorecen la máxima producción de condromucoproteína, mientras que concentraciones altas inhiben la incorporación de sulfato a los cultivos en monocapa. En condiciones hiperóxicas también se producía una alteración general de la maduración normal de los condrocitos y un aumento de la aparición de células con fenotipo fibroblástico, así como un descenso en la producción de matriz cartilaginosa y, por lo tanto, de la metacromasia.

La síntesis y liberación de glucosaminoglicanos sulfatados en los cultivos de condrocitos se ve afectada directamente por el pH del medio de cultivo. Estudios metabólicos realizados en cultivos de condrocitos normales sometidos a distintos pHs han revelado que los procesos anabólicos de las células se elevan aproximadamente tres

veces más cuando el pH del medio sube de 7,0 a 8,0⁸⁶. Estos resultados muestran que el estadio estable del cultivo de condrocitos se obtiene alrededor de un pH 8,0.

4.4. Células mesenquimales

Durante el desarrollo embrionario, las células de la capa mesodérmica se diferencian a múltiples tipos de tejidos, incluyendo hueso, cartílago, tendones, músculo, grasa y estroma medular. Estos precursores celulares, también presentes en la etapa postnatal, se denominan células mesenquimales troncales (MSCs) y son células no hematopoyéticas, estromales, que presentan multilineaje, con capacidad para diferenciarse a diferentes tejidos.

En el año 2006 la Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society Cellular Therapy -ISCT-) propuso tres criterios para definir las células troncales mesenquimales: debían ser adherentes en cultivo; expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD 45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y ser capaces de diferenciarse in vitro a osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo. Adicionalmente mostrarían la posibilidad de autorrenovarse, de desarrollarse en múltiples líneas celulares y de proliferar sin límite (Fig. 29).

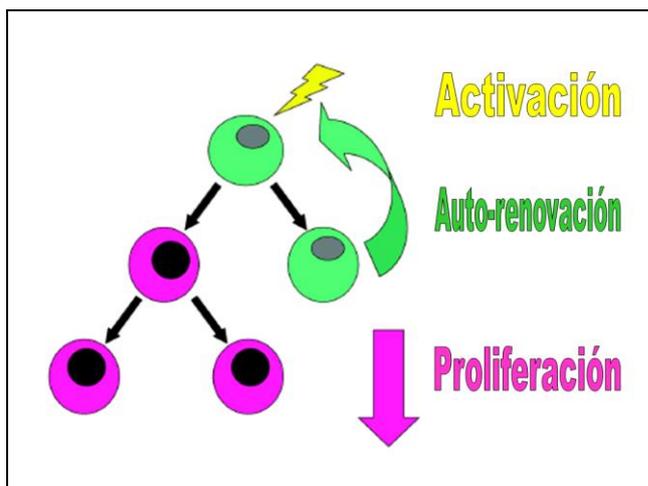


Fig. 29. Proceso de autorrenovación de las células troncales. Tomado de Musxhler y cols.¹²⁶.

Las células troncales mesenquimales adultas o células madre adultas, que son células pluripotenciales, se encuentran entre las células diferenciadas de un órgano o tejido adulto y pueden replicarse y diferenciarse hacia los fenotipos celulares especializados del tejido en el que residen en respuesta al estímulo adecuado (Fig. 30). Su función en un organismo vivo consiste principalmente en el mantenimiento y reparación del tejido en el que se encuentran. Si antes se pensaba que se podían diferenciar únicamente en el linaje celular del tejido en el que se encontraban, actualmente se sabe que tienen un mayor grado de diferenciación plástica. De tal forma, se ha conseguido diferenciar células musculares a partir de células neurales, y obtener células musculares, grasas o células neurales a partir de células madre de la dermis.

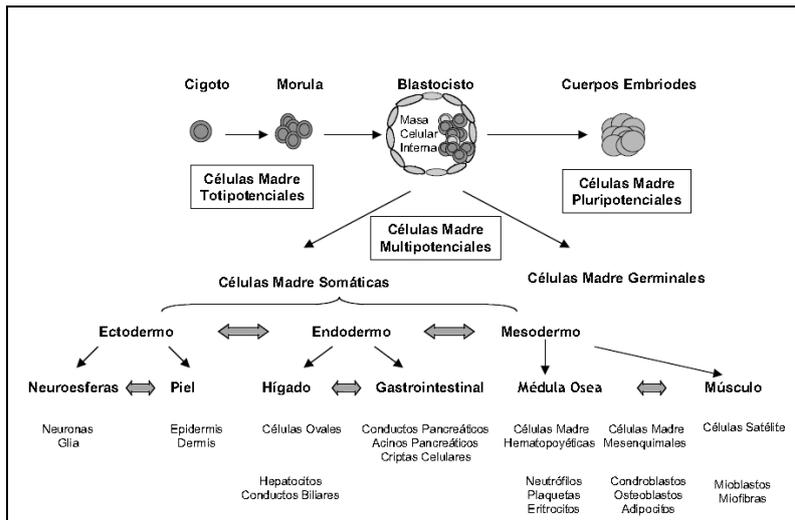
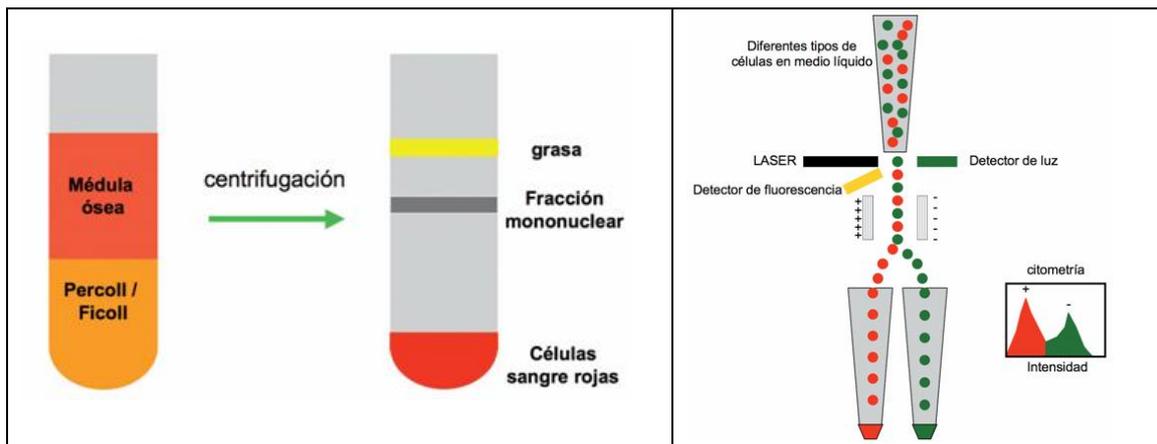


Fig.30. Esquema modelo jerárquico de las células madre de acuerdo con su potencial. Tomado de Prosper¹²⁷.

Las células mesenquimales se localizan principalmente en la médula ósea, originando fibroblastos medulares o células reticulares, adipocitos, osteoblastos y condrocitos, pero también se localizan en el periostio, en el músculo, en la grasa, en el cerebro y en la piel. Los métodos de aislamientos son variados (Figs. 31 y 32).



Figs. 31 y 32. Métodos para aislar MSCs: por centrifugación (a la izquierda) y por fluorescencia (a la derecha). Tomado de Forriol y cols.¹²⁸.

4.5. Células mesenquimales procedentes del tejido graso

El tejido adiposo, al igual que la médula ósea, deriva de la capa mesodérmica embrionaria y contiene un estroma que es fácil de aislar, con adipocitos, células estromales (células musculares lisas, células endoteliales, fibroblastos, células de la sangre y preadipocitos) y células madre. Estas células pueden ser digeridas enzimáticamente y separadas de los adipocitos flotantes por centrifugación. Esta población, denominada células madre o estromales derivadas del tejido adiposo (ADSCs), comparten muchas de las características de las células madre de la médula ósea, incluyendo el extenso potencial de diferenciación y la habilidad para la diferenciación multilínea (Tabla 10 y Fig. 33). También se las conoce como células madre adultas derivadas del tejido adiposo (ADAS), células estromales adultas derivada

del tejido adiposo, células estromales adiposas (ASC), células madres adiposas mesenquimales (ADMSC), lipoblastos, pericitos, preadipocitos, células procesadas del lipoaspirado (PLA) y como “células madres derivadas del tejido adiposo” (ASCs), que es como la Sociedad Internacional para las Aplicaciones Tecnológicas de la Grasa ha decidido que se las conozca, con la particularidad de la multipotencialidad y adherencia al plástico.

MARCADORES DE SUPERFICIE	PATRONES DE EXPRESION	
	ADSCs	MSCs
CD9	+	+
CD10	+	+
CD13	+	+
CD29	+	+
CD31	-	-
CD34	-	-
CD44	+	+
CD45	-	-
CD49d	+	-
CD49e	+	+
CD54	+	+
CD55	+	+
CD59	+	+
CD90	+	+
CD105	+	+
CD106	-	+
CD117	+	+
CD146	+	+
CD166	+	+
STRO-1	+	+

Tabla 10. Fenotipo de los marcadores de superficie de ADSCs y MSCs. Tomada de *Strem y cols.*¹²⁹.

El número aproximado de células madre que se obtienen de un lipoaspirado de tejido graso, aunque dependiente de la edad, del índice de masa corporal y del lugar de la obtención, es de 5.000 CFU-F (unidades formadoras de colonias de fibroblastos) por gramo de tejido adiposo. Es decir, al menos 500 veces más que las que se obtienen de la médula ósea, cuya prevalencia es de 100 a 1000 por mililitro. Zuck y cols.^{104, 106}, de hecho, consiguieron aislar células madre adultas mediante lipoaspiración (procesed lipoaspirate –LPA-) del compartimento adiposo estromal en suficiente número, con un crecimiento estable y parámetros cinéticos en cultivo; y las mismas células se han conseguido diferenciar, con el tratamiento específico, a linajes mesenquimales clásicos (osteogénico, adiposo, biogénico y condrogénico) y a linajes no mesenquimales.

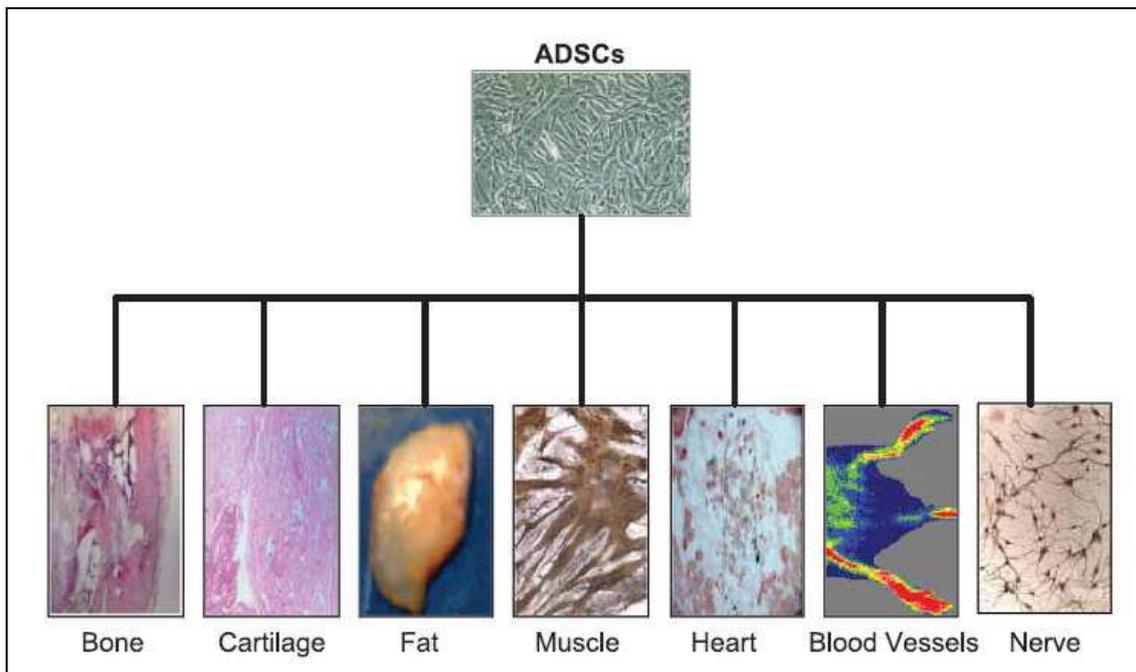


Fig. 33. Esquema de la multipotencialidad de las células madre (ADSCs). Tomada de Strem y cols.¹²⁹.

4.6. Estrategias para la ingeniería tisular del cartílago (Fig. 34)

Como fuente celular para la formación de cartílago se pueden utilizar condrocitos o, en su lugar, células mesenquimales, indiferenciadas o pluripotentes. En el caso de las células mesenquimales, existen una serie de factores conocidos que inducen su diferenciación hacia el fenotipo condroide, entre los que se encuentran la utilización de un medio de cultivo sin suero, la dexametasona, el ascorbato, los TGF β y las BMPs, siendo el método de cultivo tridimensional a alta densidad uno de los más empleados para aquel fin. Se podría hacer un injerto osteocondral cultivando células mesenquimales a alta densidad, añadiendo TGF β y consiguiendo así un gránulo o precipitado de células que luego se utilizaría para recubrir o rellenar a presión un armazón de un polímero biodegradable.

Para la implantación de células en el defecto del cartílago éstas deberían estar incrustadas en el espesor de un andamiaje. Estos compuestos necesitan mantenerse un largo periodo de tiempo en cultivo con el fin de obtener un tejido suficientemente maduro como para sustituir funcionalmente al cartílago normal y facilitar su integración completa. Por lo tanto, es necesario escoger andamiajes que permitan construir estructuras con unas propiedades controlables mediante el estudio del comportamiento biológico de las células y los armazones de matrices, tanto in vitro, con la ayuda de biorreactores, como in vivo. En todo caso, para la producción de cartílago es importante conseguir la producción máxima de matriz extracelular porque se favorece el comportamiento mecánico del tejido artificial implantado, sobre todo al utilizar andamiajes menos resistentes que el cartílago articular normal. Este objetivo se puede

también conseguir optimizando las condiciones del cultivo, aumentando la producción celular y la condrogénesis de células progenitoras. En la actualidad algunos andamiajes son de uso clínico y otros se están desarrollando en ensayos preclínicos.

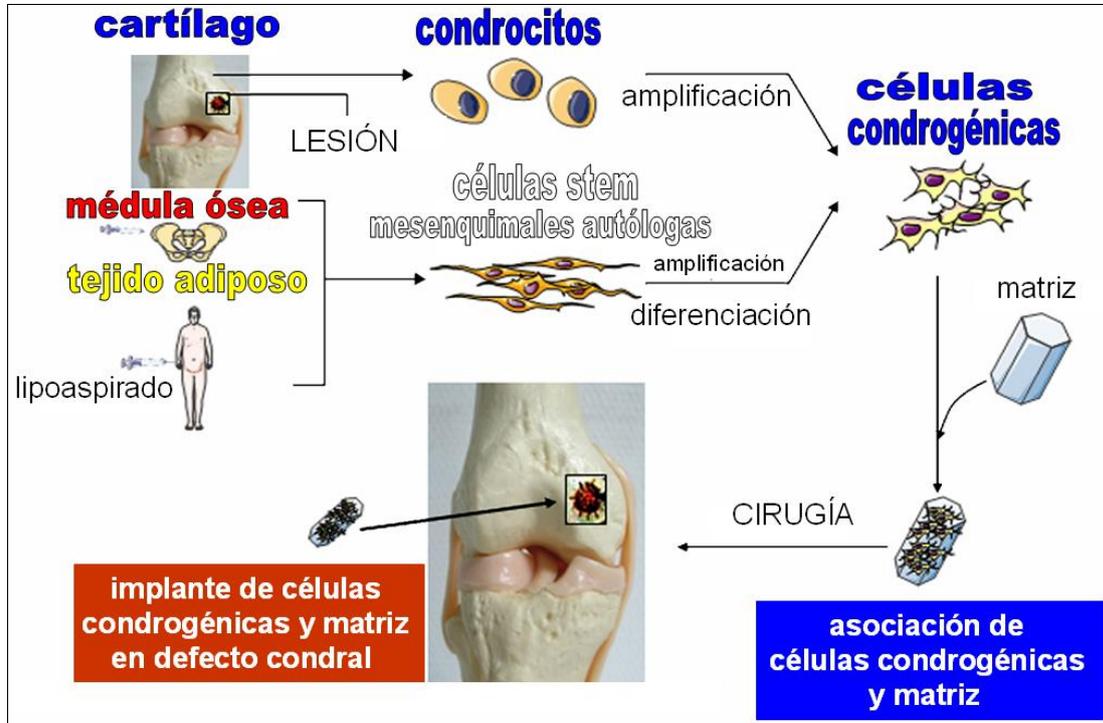


Fig. 34. Estrategia para la ingeniería tisular del cartílago. Células autólogas procedentes del cartílago, de la médula ósea o del tejido adiposo son amplificadas y diferenciadas al linaje condrogénico mediante la exposición a varios factores morfogenéticos y finalmente embebidas en andamiajes. Esta asociación puede finalmente ser implantada en el defecto.

5. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

Admitidas las dificultades de la reparación del tejido condral por sus particularidades anatómo-fisiológicas y, en la misma línea, las limitaciones de la mayoría de las técnicas terapéuticas disponibles en la actualidad para aquel fin, las investigaciones actuales se centran en la terapia celular y en técnicas de ingeniería de tejidos.

Siendo el trasplante autólogo de condrocitos (ACI) una de las técnicas más prometedoras, el origen celular y otros aspectos de la técnica pueden mejorarse. Los condrocitos de procedencia homóloga, por su parte, son difíciles de obtener en algunos medios. En general, se necesita una técnica que induzca la proliferación de condrocitos *in vitro* sin que pierdan su expresión fenotípica. Cuando aquellas células son cultivadas en monocapa habitualmente proliferan, pero rápidamente pierden sus características. Cuando se cultivan en condiciones tridimensionales, como puede ser con un gel de colágeno, mantienen su expresión fenotípica pero no proliferan tan rápido. El uso de cultivos tridimensionales con diferentes andamiajes utilizando factores de crecimiento podría resolver el problema ¹⁴.

Aunque en los últimos años han sido numerosos los estudios que han intentado establecer las condiciones óptimas para la obtención de poblaciones celulares que favorezcan la regeneración del cartílago dañado, todavía son muchos los interrogantes sin respuesta: ¿cuál es la fuente celular ideal para la ingeniería tisular aplicada al cartílago articular?, ¿qué condiciones de cultivo son más adecuadas para la obtención de condrocitos funcionales?, ¿qué tipo de andamiaje utilizar?.

Las líneas de investigación actuales, en suma, se basan en el uso de técnicas de ingeniería tisular que produzcan células que, combinadas con factores de crecimiento y terapia génica, puedan ser incluidas y utilizadas en andamiajes.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El cartílago articular o hialino es un tipo de tejido conectivo compuesto por un único tipo celular, el condrocito, y una matriz extracelular altamente hidratada formada principalmente por colágeno y proteoglicanos. Se trata de un tejido aneural, avascular y alinfático con células prácticamente incapaces de dividirse y, en consecuencia, con una capacidad de regeneración muy limitada tras sufrir cualquier tipo de alteración. Por el mismo motivo las lesiones destructivas de su estructura son irreversibles.

Las alteraciones más frecuentes del cartílago articular son traumáticas, degenerativas (osteoartritis) o inflamatorias (artritis reumatoide), por lo que, dada la gran prevalencia de ese conjunto de enfermedades en la población, es necesario el desarrollo de tratamientos que permitan restaurar la funcionalidad del tejido condral ¹.

Entre los métodos más comunes para el tratamiento de las lesiones articulares se encuentran la microfractura, la mosaicoplastia y el implante de auto y homoinjertos osteocondrales. Estas técnicas pueden reducir el dolor y mejorar la función articular, aunque presentan numerosos inconvenientes, como son la formación de tejido fibrocartilaginoso (que carece de las propiedades mecánicas del tejido articular), la limitada disponibilidad de tejido y la morbilidad del sitio donante en el caso de los autoinjertos, la posibilidad de transmisión de enfermedades y las dificultades del manejo de los homoinjertos ². Por todo ello, en los últimos años el interés de los especialistas clínicos en las posibilidades que las nuevas técnicas de ingeniería tisular puedan aportar a la regeneración del tejido cartilaginoso ha experimentado un importante incremento.

El trasplante autólogo de condrocitos viene utilizándose desde 1987 para tratar lesiones articulares y ya son muchos los pacientes que se han beneficiado de la técnica. Consiste en la obtención de pequeñas biopsias de cartílago articular del propio paciente y la posterior expansión *in vitro* de las células aisladas del tejido. A continuación, la población celular obtenida en el laboratorio es implantada en el cartílago articular dañado y recubierta con un parche perióstico.

Uno de los inconvenientes del uso de condrocitos autólogos en técnicas de terapia celular es el bajo número de células presentes en las muestras de cartílago, lo que obliga a realizar procedimientos de expansión *in vitro* durante los cuales las células sufren un proceso denominado “desdiferenciación”, adoptando una morfología fibroblástica, y su capacidad para sintetizar colágeno tipo II y proteoglicanos se ve disminuida ³.

Las nuevas líneas de investigación en el campo de la ingeniería tisular apuestan por la combinación de células, biomateriales y factores de crecimiento para conseguir mimetizar *in vitro* el microambiente al que las células se ven expuestas *in vivo* y así aumentar las posibilidades de éxito tras su implante en el tejido dañado. En el caso del tejido articular, el cultivo de condrocitos en un ambiente tridimensional permite preservar la morfología y funcionalidad de las células, evitando el fenómeno de desdiferenciación. Diversos tipos de matrices han sido investigados con este fin (colágeno, agarosa, alginato, quitosan, polímeros sintéticos...), cada uno con sus ventajas e inconvenientes.

La fibrina es un polímero natural y biocompatible que favorece las interacciones célula-matriz y puede elaborarse a partir de sangre autóloga, evitando así problemas inmunológicos. Por todo ello, la fibrina autóloga se perfila como un vector de implante a tener en cuenta en la búsqueda del andamiaje ideal para el cultivo e implante de células en la reparación de cartílago articular. El ambiente tridimensional que proporciona la matriz de fibrina promueve el mantenimiento de la morfología celular y la producción de matriz cartilaginosa.

Sin embargo, la fibrina presenta una consistencia gelatinosa que no permite una fácil manipulación a la hora de moldear el constructo para adaptarlo a la lesión a tratar, ni aporta estabilidad mecánica a la zona. La elaboración de matrices que combinen polímeros sintéticos biocompatibles y geles de fibrina puede resultar adecuada para potenciar las propiedades de la fibrina autóloga como andamiaje y suplir sus deficiencias mecánicas para ingeniería tisular de cartílago. De entre los polímeros sintéticos biocompatibles disponibles en el mercado, el ácido hialurónico es el que parece más adecuado para la elaboración de matrices que soporten el crecimiento y diferenciación condrocíticos, puesto que éste es un componente de la matriz orgánica que forma el cartílago articular sano. Así pues, la elaboración de matrices a partir de ácido hialurónico y fibrina autóloga puede constituir el andamiaje ideal que soporte el crecimiento de las células en cultivo, promueva el mantenimiento de su fenotipo y proporcione la estabilidad mecánica requerida en el tratamiento de una lesión articular.

Por otra parte, y ante las limitaciones del cartílago como fuente de células para técnicas de ingeniería tisular (necesidad de realizar una cirugía invasiva para la obtención de la biopsia, escaso número de células, fenómeno de desdiferenciación, lenta proliferación, etc), están siendo investigadas otras alternativas. Una de las más prometedoras se centra en la utilización de células de naturaleza mesenquimal, que pueden ser aisladas de diferentes tejidos (médula ósea, cordón umbilical, placenta...), siendo el adiposo el más interesante para su utilización debido a su gran disponibilidad y fácil obtención y al elevado número de células madre que pueden obtenerse de él ^{101, 115}. Cuando las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADMSCs) son cultivadas bajo los estímulos adecuados, son capaces de diferenciarse hacia células de diversas estirpes celulares. En estudios previos ^{125, 129} hemos conseguido aislar, cultivar e inducir la diferenciación de ADMSCs hacia células óseas, adiposas y condrocíticas.

Las condiciones óptimas de cultivo para la diferenciación condrogénica de las ADMSCs están siendo actualmente investigadas, aunque parece que un ambiente tridimensional y la presencia de determinados factores de crecimiento son requisitos imprescindibles. Por lo tanto, matrices que combinen fibrina autóloga y ácido hialurónico podrían favorecer la diferenciación condrogénica de estas células, convirtiéndose así en una fuente celular a tener en cuenta a la hora de diseñar nuevas terapias en ingeniería tisular de cartílago.

El mantenimiento del fenotipo y funcionalidad de los condrocitos articulares en cultivo *in vitro* se ve favorecido cuando éste se realiza en el ambiente tridimensional proporcionado por una matriz de fibrina autóloga y ácido hialurónico. Así mismo, mediante la inducción condrogénica de células madre de tejido adiposo en matriz de

fibrina autóloga y ácido hialurónico a diferentes concentraciones se pueden obtener poblaciones celulares funcionalmente equivalentes a las obtenidas a partir de muestras de cartílago articular. Con estas premisas elaboramos nuestra hipótesis de trabajo: los condrocitos inducidos desde células madre de tejido adiposo infrapatelar (grasa de Hoffa) pueden sustituir eficazmente a los obtenidos del cartílago articular, elaborando *in vitro* un hidrogel con las características histológicas del cartílago articular hialino.

OBJETIVOS

Objetivo principal

Comparar la funcionalidad *in vitro* (proliferación celular y mantenimiento del fenotipo condrocítico) de las poblaciones celulares obtenidas durante el cultivo tridimensional en gel de fibrina y ácido hialurónico de condrocitos articulares y células madre del tejido adiposo infrapatelar (grasa de Hoffa) diferenciadas a fenotipo condrocítico y deducir de ello un sustitutivo biológico para la estructura del cartílago.

Objetivos específicos

1. Aislar y cultivar el componente celular del cartílago articular.
2. Aislar y cultivar las células madre mesenquimales del tejido adiposo infrapatelar (grasa de Hoffa).
3. Definir las condiciones óptimas para el cultivo primario de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo infrapatelar.
4. Cultivar ambas poblaciones celulares en el hidrogel tridimensional de fibrina y ácido hialurónico a diferentes concentraciones mediante la adición de los suplementos nutricionales específicos, según el caso.
5. Evaluar la morfología y las tasas de crecimiento celular de cada tipo de hidrogel durante su cultivo *in vitro*.

MATERIAL Y MÉTODO

1. MATERIALES, CONCEPTOS Y CLASIFICACIONES

- 1.1. Grasa de Hoffa.** La grasa de Hoffa es un acúmulo de tejido graso infrapatelar, a nivel de la rodilla, de estructura heterogénea y fibrosa que difiere significativamente de los tejidos obtenidos de liposucción. El estudio histológico con hematoxilina eosina indica que gran cantidad de esta grasa es tejido colágeno denso. Contiene también pericitos, células endoteliales y células musculares ligeras.
- 1.2. Cartílago articular hialino condíleo femoral.** El cartílago articular hialino condíleo, compuesto por condrocitos y matriz extracelular, es un tejido avascular, aneural y alinfático que recubre la superficie de los cóndilos femorales.
- 1.3. Plasma sanguíneo.** El plasma sanguíneo es la fracción líquida y acelular de la sangre. Está compuesto por un 90% de agua, un 7% de proteínas, y el 3% restante por grasa, glucosa, vitaminas, hormonas, oxígeno, gas carbónico y nitrógeno, además de productos de desecho del metabolismo como el ácido úrico. Es el componente mayoritario de la sangre, representando aproximadamente el 55% del volumen sanguíneo total, mientras que el 45% restante corresponde a los elementos formes.
- 1.4. Células Troncales Mesenquimales Derivadas del Tejido Adiposo (ADSMCs).** Las células troncales mesenquimales son células estromales no hematopoyéticas que muestran las siguientes propiedades: son adherentes en cultivo; expresan los antígenos CD73, CD90 y CD105 en ausencia de antígenos hematopoyéticos, como CD34, CD45, marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B; y son capaces de diferenciarse in vitro hacia osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo. Adicionalmente, muestran la posibilidad de autorrenovarse, de desarrollarse en múltiples líneas celulares y de proliferar sin límite.
- 1.5. Ácido tranexámico.** Es una sustancia utilizada para neutralizar el sistema de fibrinólisis. Su mecanismo de acción radica en el bloqueo de la formación de plasmina mediante la inhibición de la actividad proteolítica de los activadores de plasminógenos, cosa que, en definitiva, inhibe la disolución de los coágulos (fibrinólisis). Es, por lo tanto, un antifibrinolítico. El ácido tranexámico bloquea el punto de enlace de la lisina, esencial para el enlace de la plasmina a la fibrina. De este modo se bloquea el efecto normal de la plasmina: la disolución de coágulos (fibrinólisis). En dosis reducidas, el ácido tranexámico actúa como inhibidor competitivo de la plasmina, mientras que en dosis elevadas lo hace como inhibidor no competitivo.

- 1.6. Cloruro cálcico.** El cloruro cálcico (CaCl_2) es un compuesto químico inorgánico que se utiliza como fuente de calcio necesario para activar las plaquetas y el mecanismo de coagulación.
- 1.7. Ácido hialurónico.** El ácido hialurónico (sal sódica de hialuronato) es el constituyente principal del líquido sinovial (que le confiere la mayoría de sus peculiaridades) y de la matriz cartilaginosa. Es un polisacárido lineal formado por 10.000 a 12.000 parejas de ácido glucurónico y de n-acetilglucosamina, fuertemente hidratado, replegado en una pelota estática deformable de alrededor de 0,5 micrometros de diámetro. El ácido hialurónico se suele obtener de fuentes naturales, como las crestas de los gallos, la aleta de tiburón, las articulaciones de las vacas, los residuos del procesado de pescado (intestinos, ojos...) y el cordón umbilical.
- 1.8. Medio DMEM.** DMEM son las abreviaturas de medio esencial mínimo Dulbecco. Se elaboró añadiendo al medio BME (medio basal de Eagle) una mayor cantidad de vitaminas y aminoácidos, y se utilizó por primera vez para cultivar células de embrión de ratón. Sin embargo, en la actualidad se emplea para una amplia gama de líneas celulares de mamífero, principalmente aquéllas que crecen como monocapas celulares adherentes.
- 1.9. Medio F12 de Ham.** Es un medio de cultivo con suplementos proteicos útil para el cultivo y crecimiento de líneas celulares.
- 1.10. Suero bovino fetal.** Es suero procedente de fetos de las vacas. Su rica variedad de proteínas proporciona a las células un medio en el cuál pueden vivir, crecer y dividirse, además las protege de la digestión enzimática.
- 1.11. Fibrina.** La fibrina es una proteína fibrilar con la capacidad de formar redes tridimensionales. Esta proteína desempeña un importante papel en el proceso de coagulación. Tiene la forma de un bastón con tres áreas globulares y la propiedad de formar agregados con otras moléculas de fibrina formando un coágulo blando. Normalmente se encuentra en la sangre en una forma inactiva, el fibrinógeno, el cual por la acción de una enzima llamada trombina se transforma en fibrina.
- 1.12. Cultivo primario.** Son los cultivos preparados directamente de tejido de un organismo sin división celular.
- 1.13. TGF- β 1.** El factor de crecimiento transformante beta 1, TGF- β 1 ó TGFB1 es una proteína perteneciente a la superfamilia de factores de crecimiento transformante beta de las citoquinas. Es una proteína de

secreción que lleva a cabo diversas funciones en la célula, como el control del crecimiento celular, proliferación celular, procesos de diferenciación y apoptosis.

1.14. Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, *fibroblast growth factor*).

Es un factor de crecimiento que aumenta el índice de actividad mitótica y síntesis de ADN facilitando la proliferación de células precursoras, como el condroblasto, osteoblasto, etc. Esta familia de factores de crecimiento contiene más de 20 miembros, de los cuales FGF ácido (aFGF o FGF-1) y FGF básico (bFGF o FGF-2) son los mejor caracterizados.

1.15. Cámara de Neubauer (Fig. 35).

La Cámara de Neubauer es un instrumento utilizado en medicina y biología para realizar el recuento de células en un medio líquido, que puede ser un cultivo celular, sangre, orina, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, etc. Esta cámara de contaje está adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas, en el fondo de las cuales se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de dimensiones conocidas. Cubierta la cámara con un cubrecámaras que se adhiere por simple tensión superficial, seguidamente se introduce el líquido a contar, al que generalmente se ha sometido a una dilución previa con un diluyente por capilaridad entre la cámara y el cubrecámara. El hecho de tener dos zonas permite hacer dos recuentos simultáneamente. Para contar las células se observa el retículo al microscopio con el aumento adecuado y se cuentan las células. En base a la cantidad de células contadas, conociendo el volumen de líquido que admite el campo del retículo, se calcula la concentración de células por unidad de volumen de la muestra líquida inicial.



Fig. 35. Cámara de Neubauer

$\frac{\text{Partículas por } \mu\text{l (partículas contadas)}}{\text{Superficie contada (mm}^2\text{) x profundidad de la cámara (mm) x dilución}}$

Tabla. 11. *Fórmula de valoración del N° de células (validez universal).*

1.16. Campana de flujo laminar (Fig. 36). Su función es la de mantener un área libre de partículas, especialmente de posibles contaminantes (bacterias, levaduras, ...) que puedan acceder al cultivo. Esto se consigue mediante un dispositivo mecánico que fuerza el paso del aire a través de un filtro de gran superficie (filtro HEPA) situado o bien en el techo (flujo vertical) o en la pared frontal (flujo horizontal) y que con una eficiencia del 99,999% retiene partículas por debajo de un cierto calibre que es en general de $0,2 \mu\text{m}$. El flujo de aire es laminar, sin turbulencias en las que puedan quedar retenidas partículas contaminantes. El flujo laminar se asegura tanto por la gran superficie del filtro HEPA como por la velocidad constante del aire, como por la ausencia de fuentes intensas de calor en el interior de las cabinas.



Fig. 36. *Campana de flujo laminar.*

2. CRONOGRAMA Y FASES DEL ESTUDIO

El estudio fue llevado a cabo una vez puestas a punto las técnicas del procesado de muestras, aislamiento y cuantificación celular, purificación, establecimiento del cultivo primario y diferenciación de células mesenquimales (ADMSC) de la grasa de Hoffa, de los condrocitos derivados del cartílago articular artrósico y de la determinación del porcentaje óptimo fibrina-ácido hialurónico. Para ello se utilizaron las muestras de los 5 primeros pacientes. Para el desarrollo de los sustitutivos tisulares y el estudio final se destinaron 15 muestras. Todo ello se especifica en el cronograma de la figura 37.

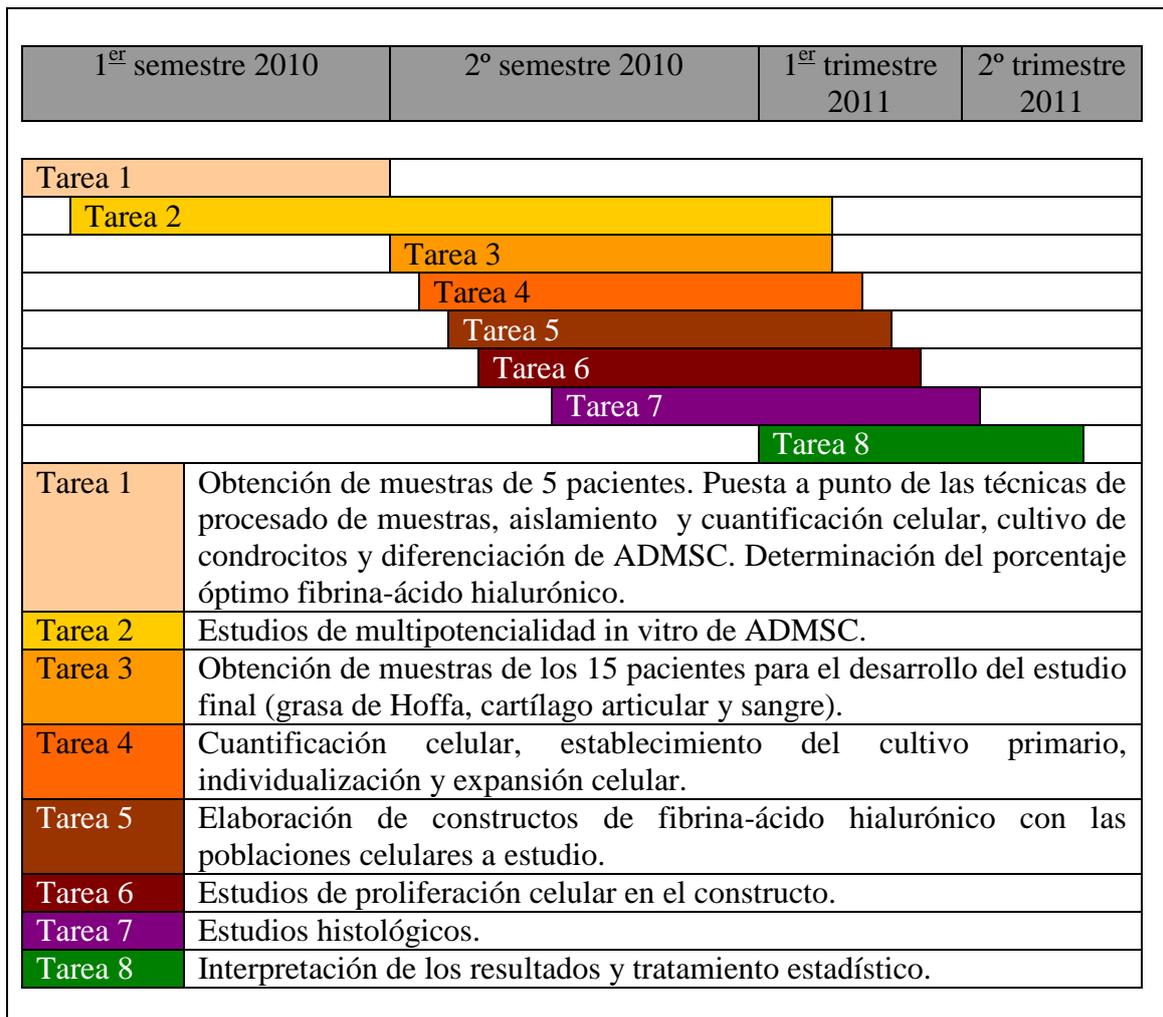


Fig. 37. Cronograma del estudio.

3. DISEÑO DEL ESTUDIO

Realizamos un estudio experimental y prospectivo comparando *in vitro* dos poblaciones celulares (condrocitos de cartílago articular y células madre mesenquimales derivadas de la grasa de Hoffa diferenciadas a condrocitos) que incluimos en una matriz de fibrina y ácido hialurónico a diferentes concentraciones de este último (0%, 5% y 20%).

4. ÁMBITO DEL ESTUDIO

El presente estudio fue desarrollado entre el Establecimiento de Tejidos Humanos de la Fundación Clínica San Francisco de León y el Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial Universitario de León (Fig. 38). El procesamiento de las muestras para la obtención del componente celular y su posterior expansión *in vitro* para el desarrollo de técnicas de ingeniería tisular fue realizado en el laboratorio de cultivos celulares del Establecimiento de Tejidos Humanos.

- **Población de referencia:** Pacientes diagnosticados de gonartrosis.
- **Población accesible:** Pacientes diagnosticados de gonartrosis primaria e incluidos en lista de espera quirúrgica para la realización de una artroplastia total de rodilla.
- **Población en estudio (material):** 20 pacientes y sus respectivas poblaciones celulares a los que durante el acto quirúrgico se les tomaron las muestras (grasa infrapatelar de la rodilla, cartílago articular procedente del corte frontal del cóndilo externo y 25 cc de sangre). Los pacientes se seleccionaron al azar entre Enero de 2010 y finales de Enero de 2011.



Fig. 38. Complejo Asistencial Universitario de León y Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco, donde se llevaron a cabo los diferentes pasos del estudio.

5. OBTENCIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS DE ESTUDIO

La obtención de las muestras fue realizada por personal especializado durante el implante de una prótesis primaria de rodilla en 20 pacientes del Servicio de Cirugía Ortopédica y Traumatología del Complejo Asistencial Universitario de León. De los 20 pacientes (Tabla 12), 14 fueron mujeres y 6 hombres (Fig. 39), siendo la edad media del grupo de 70,2 años (rango 62-79).

Todos los pacientes fueron informados de la finalidad del estudio en el momento de su inclusión en la lista de espera quirúrgica, comprendiendo y firmando el documento de consentimiento redactado para tal fin (Anexo 1). Se cumplieron los principios éticos y legales definidos por la legislación vigente (Ley 14/2007 de investigación biomédica y Ley Orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal).

De cada paciente se obtuvieron tres tipos de muestras:

1. Grasa de Hoffa, obtenida mediante bisturí o tijera, sin uso del bisturí eléctrico (Fig. 40).
2. Cartílago articular, obtenido con el correspondiente segmento óseo subcondral del cóndilo femoral externo, al realizar el corte frontal distal de éste con sierra eléctrica refrigerada con suero (Fig. 41).
3. Sangre, extraída después de la administración de la anestesia y antes de la preparación del campo quirúrgico. Cinco tubos con citrato de 5 cc cada uno (25 cc en total) (Fig. 42).

Las dos primeras muestras fueron introducidas en un recipiente estéril con suero fisiológico, mientras que la sangre fue extraída en tubos de citrato. A continuación, todas fueron enviadas a temperatura ambiente al Establecimiento de Tejidos Humanos de la Fundación Clínica San Francisco, donde fueron procesadas. Se rellenó un formulario para el control de las mismas con los datos del donante, fecha y hora de recogida, y condiciones de preservación (Anexo 2).

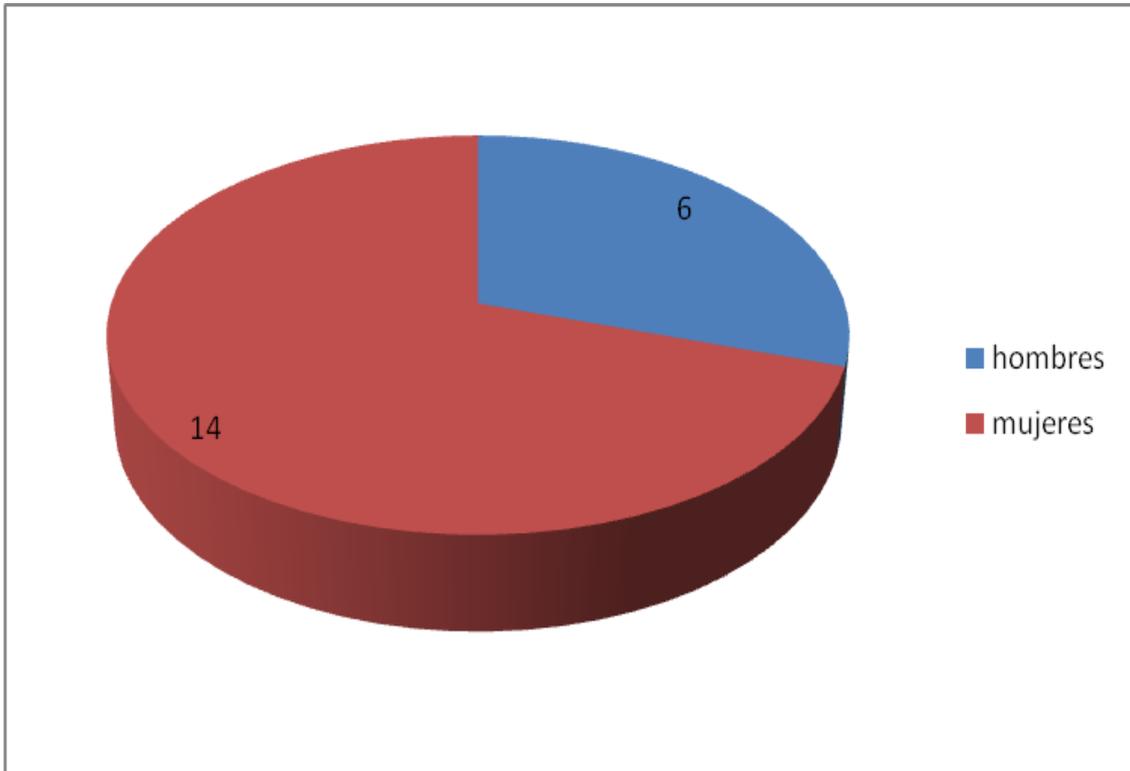


Fig. 39. Distribución de los pacientes que constituyeron la población en estudio por sexo.

	Nº	EDAD MEDIA Y RANGO
HOMBRES	6	68 (64-73)
MUJERES	14	72 (62-79)
TOTAL	20	70,2 (62-79)

Tabla. 12. Edad media y rango de los pacientes que constituyeron la población en estudio.

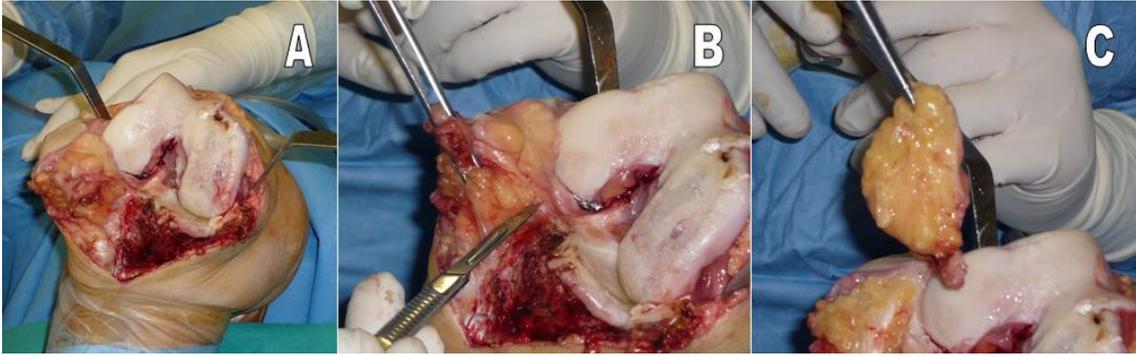


Fig 40. *Secuencia de la obtención de la grasa de Hoffa: exposición de la grasa (A), momento de la toma (B) y detalle de la misma (C).*

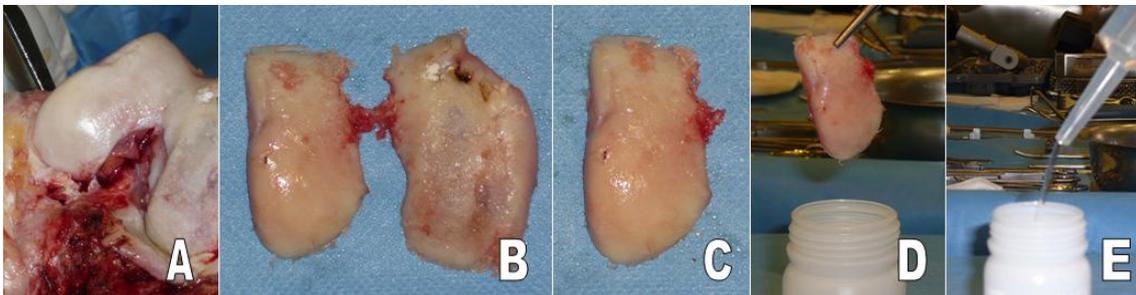


Fig. 41. *Secuencia de la obtención de la muestra de cartílago: exposición de los cóndilos femorales (A), aspecto del cartílago de los cóndilos después de la osteotomía (B), detalle del aspecto del cartílago del cóndilo femoral externo (C), momento de la inclusión del fragmento condral en un recipiente (D) y relleno del mismo con suero fisiológico (E).*



Fig. 42. *Secuencia de la obtención de la sangre y depósito en tubos de citrato.*

6. MÉTODOS INSTRUMENTALES

6.1. Puesta a punto de las técnicas

Las cinco primeras muestras fueron destinadas a la puesta a punto de las técnicas y a la determinación de la composición óptima de la matriz. Todo el procesamiento de las muestras y técnicas de cuantificación, cultivo, purificación, aislamiento y diferenciación se realizaron dentro de una campana de flujo laminar y con material estéril.

El tiempo transcurrido entre la recogida de la muestra hasta el inicio del procesamiento fue de 3 horas en el caso del cartílago articular y de 5 horas para la grasa de Hoffa.

6.1.1. Procesado de las muestras

6.1.1.1. Tejido adiposo infrapatelar

Previo pesaje (2900 mg de media, rango 1040-3600), cada muestra fue sometida a sucesivos lavados con suero salino tamponado con fosfato (PBS-Sigma-) estéril para eliminar el componente sanguíneo en la medida de lo posible. Posteriormente, el tejido graso fue troceado en fragmentos de 0,5 cm² aproximadamente (Fig. 43) y sometido a digestión enzimática con colagenasa tipo I (Sigma). Tras el periodo de digestión, la solución obtenida fue centrifugada a 20000 r.p.m. (centrífuga Eppendorf 5804) durante 10 minutos. Se obtuvieron tres fases que, de superficial a profunda, fueron: componente graso, solución de digestión y, por último, la fracción del estroma vascular, que contenía las ADMSCs (Fig.44).



Fig. 43. Secuencia de disgregación mecánica del tejido adiposo.

Fig. 44. *Tubo de centrifugado tras la digestión enzimática del tejido adiposo. De arriba abajo se distingue el componente graso, la solución de digestión y la fracción del estroma vascular donde están las ADMSCs.*



La fracción de estroma vascular que contenía ADMSCs tras el procesado y digestión de la grasa de Hoffa, fue resuspendida en un volumen conocido de medio de cultivo base (MCB) suplementado con factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF, Sigma).

6.1.1.2. Tejido cartilaginoso articular condíleo

Las muestras de cartílago articular, previo pesado (1700 mg de media, rango 1020-2050) fueron digeridas de forma mecánica (Fig. 45) y, a continuación, enzimática. Tras el periodo de digestión, la solución obtenida fue centrifugada a 1400 r.p.m. (centrífuga Eppendorf 5804) durante 10 minutos.

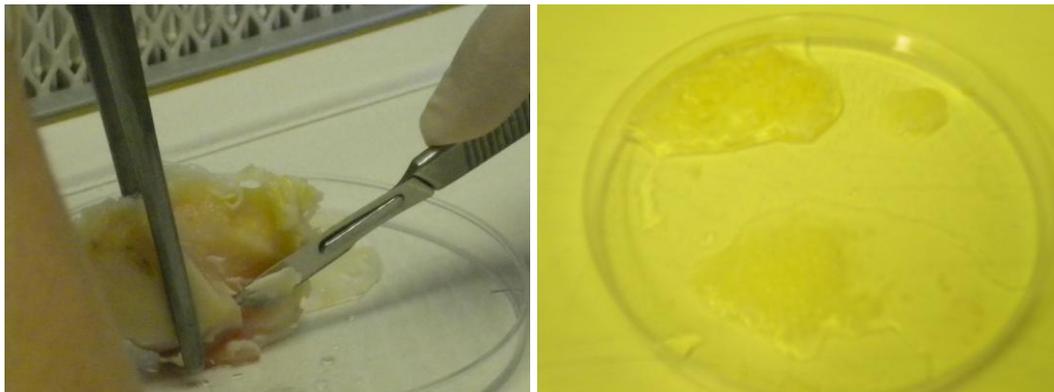


Fig. 45. *Secuencia de disgregación mecánica del cartílago articular condíleo.*

El sobrenadante obtenido tras la digestión y centrifugación de las muestras de cartílago articular fue aspirado mediante vacío y el pellet, donde estaba contenido el componente celular, fue resuspendido en un volumen conocido de medio específico para el cultivo de condrocitos (MCC).

6.1.1.3. Sangre

Las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 1800 r.p.m. durante 10 minutos. Tras este periodo, en la parte superior fue obtenida la fracción plasmática, que fue recuperada y preservada a -80°C hasta su posterior uso en la elaboración de matrices.

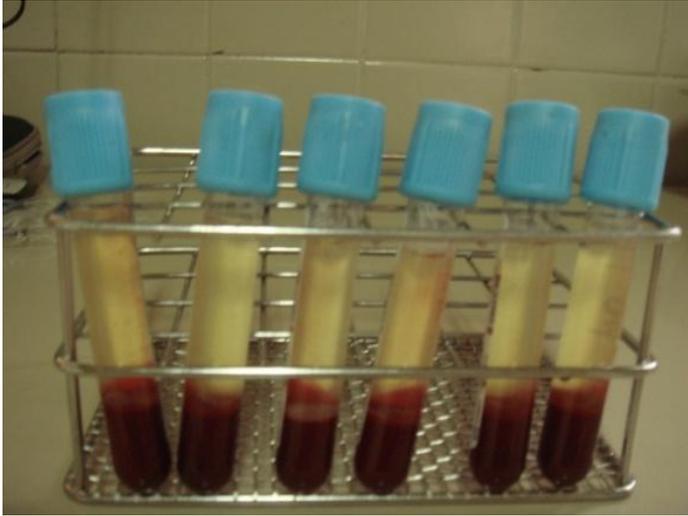


Fig. 46. Separación del componente celular del plasmático.

6.1.2. Determinación de parámetros óptimos para el aislamiento de ADMSCs

Con objeto de establecer las condiciones óptimas para el aislamiento de ADMSCs se seleccionaron diferentes variables del protocolo estándar que se estudiaron de forma secuencial:

6.1.2.1. Concentración enzimática para la digestión del tejido graso infrapatelar: se comprobó el rendimiento celular obtenido tras la completa digestión de 5 muestras de tejido adiposo infrapatelar con colagenasa tipo I en DMEM a concentraciones de 0,5 mg/ml, 1 mg/ml y 2 mg/ml.

6.1.2.2. Temperatura de preservación del tejido hasta su procesamiento: 5 de las muestras fueron preservadas entre 6 y 8 horas en DMEM estéril conteniendo un 10% de solución antibiótica. Se comprobó el rendimiento celular obtenido tras su preservación a 4° C y a temperatura ambiente.

6.1.2.3. Efecto de la agitación durante la digestión: se comprobó el rendimiento celular obtenido tras la digestión de 5 muestras de tejido adiposo infrapatelar en condiciones de agitación magnética suave y sin dicha agitación.

6.1.2.4. Efecto del filtrado de la muestra digerida: tras la digestión enzimática, se sometieron las muestras a filtración a través de filtros de 40 µm de poro (Falcon) para retirar los restos de tejido no digerido.

6.1.3. Cuantificación celular

Para cuantificar y comprobar la viabilidad de las suspensiones celulares obtenidas del procesado de las muestras de grasa de Hoffa y de cartílago articular condíleo fue utilizada la técnica del azul tripán (Sigma), método de tinción por exclusión. Una alícuota de 10µl de suspensión celular fue resuspendida en 20µl de azul tripán. Tras homogeneizar bien la solución se cargaron 10µl de la misma en una cámara de Neubauer. Únicamente fueron contabilizadas las células viables que presentaban morfología redondeada y aspecto brillante. Las células no viables se identificaron porque presentaban alteraciones en su membrana, y aparecían teñidas de azul (Fig. 47).

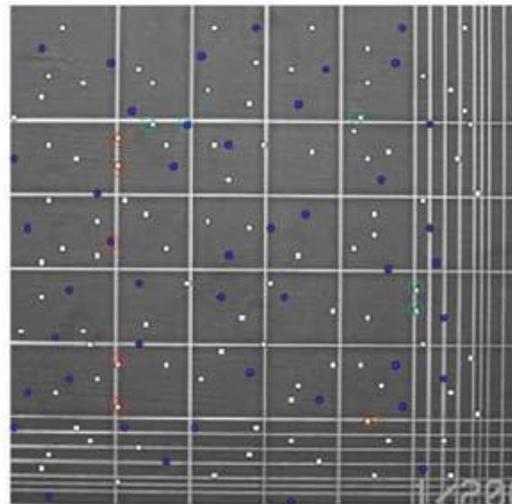


Fig. 47. Método de Azul Tripán para contabilizar las células viables en la cámara de Neubauer.

6.1.4. Establecimiento del cultivo primario P0

Tras el contaje celular fue establecido el cultivo primario (P0) de las poblaciones celulares obtenidas, sembrando dichas células en placas de poliestireno de 24 pocillos (Corning, Fig. 48) a una densidad de 20000 células/cm² para los condrocitos articulares y de 30000 células/cm² en el caso de las ADMSCs. Las muestras fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂ en una atmósfera con 95% de humedad, realizando cambios de medio cada dos días.

Diariamente fueron evaluados los cambios en la morfología y la proliferación de las células en cultivo mediante su observación a través del microscopio invertido, y fueron fotografiados los cambios significativos.

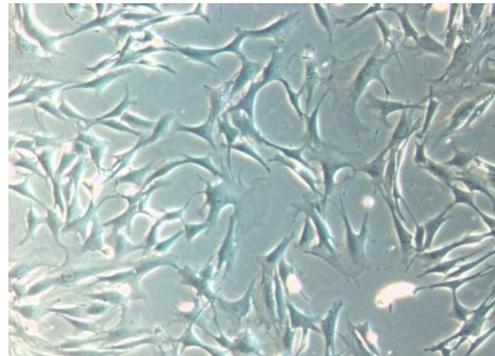
Fig.48. Establecimiento de cultivo primario sobre superficie plástica.



6.1.5. Individualización y expansión celular

Una vez alcanzado el estado de preconfluencia se procedió a la recuperación de las células cultivadas utilizando una solución Tripsina/EDTA (0,05/0,02%) (PPA) a 37°C durante 5 minutos. Cuando las células estuvieron completamente individualizadas se procedió a la neutralización con medio de cultivo suplementado con un 10% de suero bovino fetal. La solución obtenida fue recuperada y se centrifugó durante 10 minutos a 1400 rpm. El pellet resultante fue resuspendido en medio de cultivo específico, en función del tipo celular (ADMSCs o condrocitos articulares).

Fig. 49. Individualización de ADMSC en cultivo primario y expansión.



6.1.6. Determinación del % óptimo fibrina-ácido hialurónico

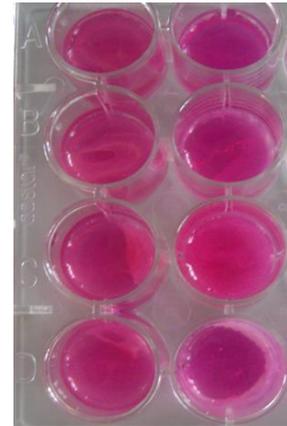
Para la determinación de la composición de las matrices combinadas se probaron distintas formulaciones, que variaron en función del % de ácido hialurónico (AH, Hyalgan®, Bioibérica), estimando el grado de retracción de las mismas (Tabla 13).

La concentración de ácido hialurónico utilizada variaba en función de la cantidad de este biopolímero contenido en el interior de la matriz. Se probaron rangos desde el 0% hasta el 50%, cuanto mayor era el % de ácido hialurónico, más temprana fue la aparición del fenómeno de retracción en las mismas (Fig. 50). Finalmente, tras el análisis de los resultados de estos estudios previos, se determinaron tres % de estudio: 0%, 5% y 20%. El primero de ellos se utilizó como control, el segundo para determinar el efecto de una concentración baja de ácido hialurónico sobre las células en estudio y el tercero para determinar el efecto sobre las células de una concentración alta de ácido hialurónico.

% de ácido hialurónico	1%	2%	3%	5%	10%	20%	25%	50%
Ácido hialurónico (µg/ml)	48	96	144	240	480	960	1200	2400

Tabla 13. Estudio preliminar para la elaboración de matrices combinadas de fibrina-ácido hialurónico. Diferentes % de ácido hialurónico probados.

Fig. 50. Elaboración de matrices combinadas fibrina-ácido hialurónico. Aparición de retracción temprana en las matrices compuestas por 25%AH (primera columna) y en las matrices compuestas por 50%AH (segunda columna).



6.1.7. Estudio de multipotencialidad in vitro de ADMSC

En cuanto a la multipotencialidad de las ADMSCs en cultivo de cada muestra, se pusieron a punto las técnicas de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica para cumplir los criterios definidos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society Cellular Therapy, ISCT) en el año 2006.

Inducción adipogénica. Para la diferenciación de las ADMSCs hacia células de fenotipo adipocítico, éstas se cultivaron en medio adipogénico (DMEM, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina -PAA Lab.-, 1µM dexametasona -Sigma-, 0,5mM IBMX -Sigma-, 10µM insulina -Sigma- y 200µM indometacina -Sigma-) y, posteriormente, se realizó la tinción Oil Red O (Sigma) para evidenciar la formación intracelular de vacuolas con contenido lipídico (marcador característico de adipocitos) (Fig. 51).

Inducción osteogénica. Para inducir células osteogénicas, las ADMSCs fueron cultivadas en medio osteogénico (DMEM, 5% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina, 10µM dexametasona, 150mM ácido L-ascórbico -Biomedica- y 10mM β-glicerolfosfato -Sigma-), completando la inducción con la adición al medio durante las primeras 48 horas de 10 ng/ml de proteína morfogenética 2 (BMP2) -Sigma-. Tras 7, 14 y 21 días de inducción se realizó una tinción con Alizarin Red (Sigma), que tiñe de rojo la matriz mineralizada (marcador característico de diferenciación osteogénica) (Fig. 51).

Inducción condrogénica. Para inducir la diferenciación condrogénica de ADMSCs, las células fueron cultivadas en medio condrogénico (DMEM, 1% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina, 50 µg/ml ácido ascórbico, 6,25 µg/ml insulina y 10 ng/ml TGF β1 –Sigma-) durante 21 días. Se probaron diversas estrategias de cultivo: en monocapa, en pellet y en matriz de fibrina. Para el cultivo en monocapa las células fueron sembradas sobre superficies plásticas y cultivadas con medio condrogénico. Para el cultivo en pellet, 1×10^6 células fueron centrifugadas y cultivadas adicionando el medio condrogénico sin provocar la resuspensión del pellet. Para el cultivo en matriz de fibrina, 1×10^6 células fueron sembradas en 100 µl de fibrina elaborada a partir de plasma humano. La caracterización de la diferenciación condrogénica se realizó mediante la observación al microscopio de la morfología celular y mediante tinción con Azul Alcían, que tiñe de azul los proteoglicanos típicos de la matriz cartilaginosa (Fig. 51).

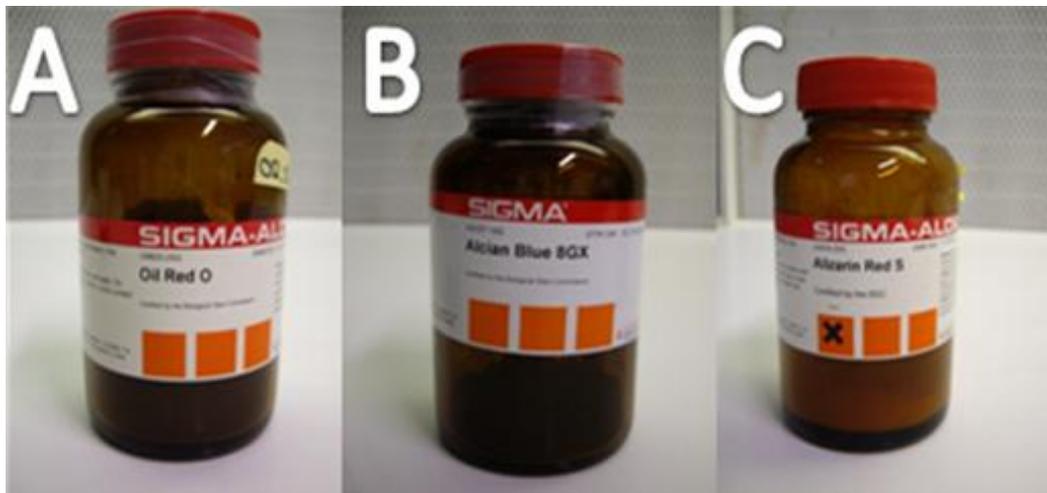


Fig. 51. Tinciones utilizadas para demostrar la multipotencialidad celular: Oil red, adipogénica (A); Alcian Blue, condrogénica (B); Alizarin red, osteogénica (C). Tomada de Saldaña¹²⁵.

6.2. Fabricación de los sustitutivos de cartílago articular

De cada muestra procedente de los 15 pacientes incluidos en el estudio, se elaboraron 48 matrices (18 para la población celular de condrocitos articulares, 12 para la de ADMSCs no inducidas y 18 para las ADMSCs inducidas), lo que sumó un total de 720 matrices. Estas matrices fueron mantenidas en contacto con diferentes medios de cultivo en función del tipo celular (Tabla 14).

		TIPO CELULAR		
		Condrocitos articulares	ADMSCs	ADMSCs inducidas
% de AH	0	n = 6	n = 4	n = 6
	5	n = 6	n = 4	n = 6
	20	n = 6	n = 4	n = 6
Composición del medio de cultivo específico	Medio de cultivo específico para el cultivo de condrocitos (MCC): - HAM'S F12 - 10% suero bovino fetal - 1% Penicilina/Estrepto - 1% L-Glutamina - 50µg/ml ác. Ascórbico - 10 ng/ml TGFβ1	Medio de cultivo base (MCB): - DMEM - 10% suero bovino fetal - 1% Penicilina/Estrep - 1% L-Glutamina	Medio de diferenciación condrogénico (MDC): - DMEM - 1% suero bovino fetal - 1% Penicilina/Estreptomic. - 1% L-Glutamina - 50µg/ml ác. Ascórbico - 6,25 µg/ml insulina - 10 ng/ml TGFβ1	

Tabla 14. Número de matrices elaboradas de cada uno de los 9 tipos en cada estudio, total 720 matrices. Composición de los medios de cultivo específicos utilizados.

El procedimiento general utilizado para la elaboración de los sustitutivos de cartílago articular fue el siguiente:

Partiendo de dos tipos celulares, se elaboraron tres tipos de matrices a los tres % de ácido hialurónico del estudio. El volumen de cada matriz fue de 1 ml y la densidad celular de 25.000 células/ml. Sobre el plasma autólogo se añadió el medio de cultivo específico para cada tipo celular, así como el componente celular. El ácido tranexámico ($C_8H_{15}NO_2$) se utilizó como inhibidor de la fibrinólisis. Las matrices contenían tres % distintos de ácido hialurónico: 0%, 5% y 20%. El cloruro cálcico ($CaCl_2$) favoreció la polimerización de la matriz tras su incubación a 37°C y 5% de CO_2 en una atmósfera con 95% de humedad. Todo este procedimiento se expresa gráficamente en la figura 52.

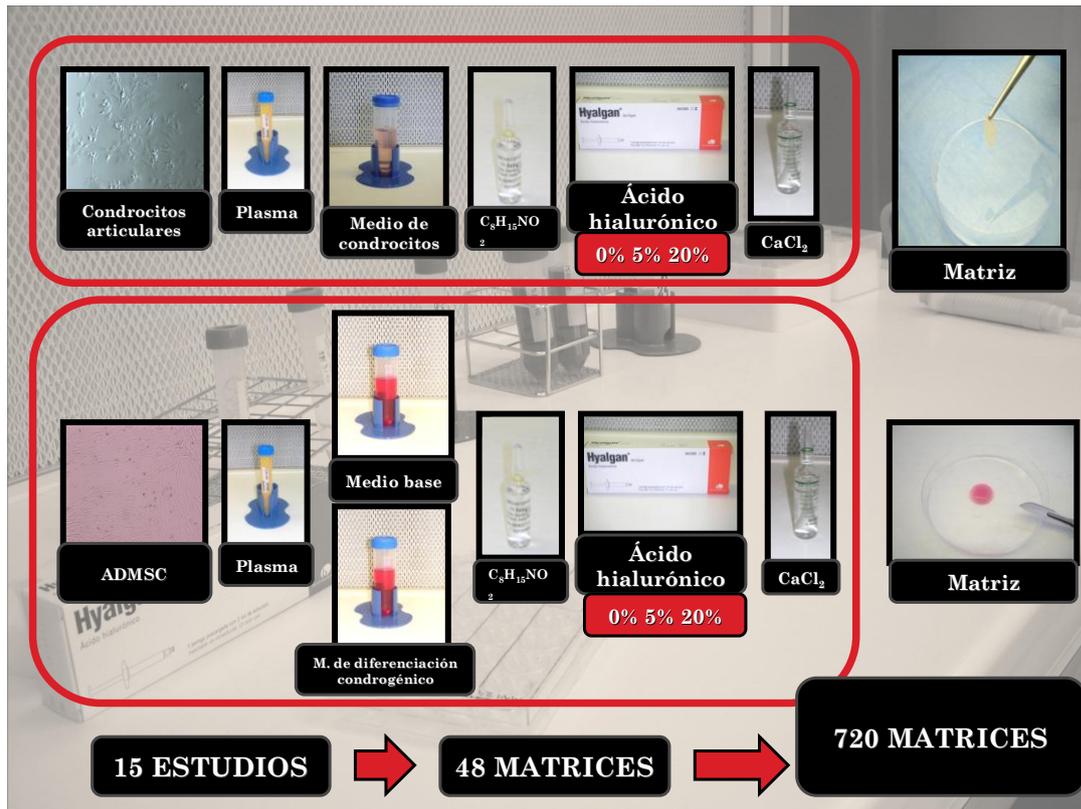


Fig. 52. Proceso de elaboración de los sustitutos de cartílago articular.



Fig. 53. *Diferentes matrices de: condrocitos articulares (A), ADMSCs no inducidas (B) y ADMSCs inducidas (C). DC Panreac (D) (paraformaldehido 4%). Resultado final listo para estudios.*

6.3. Estudios de proliferación celular

Para determinar el crecimiento celular en el interior de los hidrogeles combinados de fibrina y ácido hialurónico, matrices que contenían condrocitos articulares y ADMSCs inducidas (n=15), fueron recogidas a las 2 y 4 semanas para su digestión enzimática mediante la incubación en una solución de colagenasa tipo I a una concentración 2 mg/ml en medio DMEM. La solución obtenida fue centrifugada durante 10 minutos a 1400 rpm. El pellet resultante fue resuspendido en medio de cultivo específico, tras lo cual se procedió a la cuantificación celular.



Fig. 54. Matriz puesta a digerir en una solución de colagenasa I en medio DMEM.

6.4. Estudios de histología

Para determinar las características histológicas de los sustitutos tisulares fabricados, a las 4 y 8 semanas del estudio fueron recogidas muestras de los 9 tipos de matrices y fijadas en paraformaldehído 4%.

Las muestras fijadas se introdujeron en el procesador de tejidos (Shandon Excelsior-Thermo) para su deshidratación y parafinado. El montaje fue realizado en el inclusor de parafina (Leica EG1150H). Previo a su corte, las muestras se dejaron enfriar entre 15 y 20 minutos en la placa enfriadora (Microm CP60) para la solidificación de la parafina. En el microtomo (Leica RM 2255) fueron realizados los cortes histológicos a 8 micras (μm) (Fig. 55). Posteriormente, se colocaron en el baño (Termofin) a 40 °C para evitar superposiciones del tejido y cada muestra fue colocada sobre un portaobjetos (Thermo).

La caracterización histológica se basó en la detección de síntesis de proteoglicanos característicos de la matriz extracelular cartilaginosa. Para determinar su presencia fue utilizada la tinción Azul Alcian (Sigma) (Tabla 15).

1. Desparafinar e hidratar los cortes: 2 minutos en cada paso.
2. Solución Ácido Acético Glacial 3%: 3 minutos.
3. Solución Azul Alcían: 30 minutos.
4. Lavar con agua del grifo: 2 minutos.
5. Lavar con agua destilada.
6. Contrastar con Nuclear Fast Red (NFR): 5 minutos.
7. Lavar en agua corriente: 1 minuto.
8. Deshidratar (gradadación creciente de alcoholes): 2 minutos.
9. Xilol: 2 minutos.
10. Montar

Tabla 15. *Protocolo de tinción Azul Alcían.*

Una vez teñidas, las secciones histológicas fueron montadas (DPX , VW Internacional) y recubiertas con un cubreobjetos (Thermo) para su preservación. Por último, fueron evaluadas y fotografiadas mediante un microscopio óptico asociado a un sistema informático (Olympus) –Fig. 56-.



Fig. 55. *Laboratorio para estudios histológicos.*

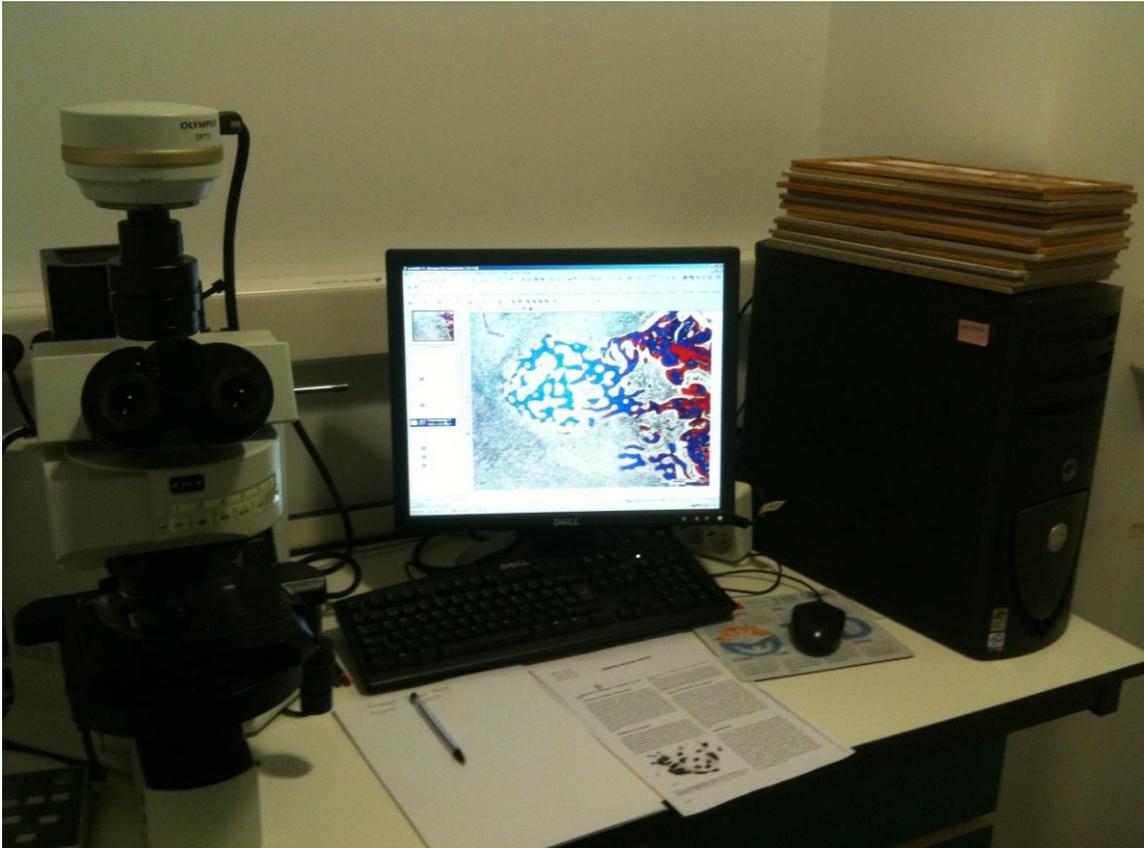


Fig. 56. *Microscopio asociado a sistema informático. Tomada de Saldaña ¹²⁵.*

7. MANEJO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

El manejo y análisis de la información se realizó de forma automatizada mediante el uso de ordenadores PC compatibles equipados con el sistema operativo Windows 2007. La información se recogió en una base de datos creada con el programa Access de Microsoft, desde la que se realizó el volcado de la información a la hoja de cálculo Excel para su depuración, con el fin de corregir errores de recogida de la información. El tratamiento estadístico se realizó con el programa SPSS 19.

Se utilizaron medidas de frecuencia absoluta y relativa para las variables cualitativas y medidas de centralización (media, mediana y moda) y dispersión (varianza, rango, desviación estándar) para variables cuantitativas. Los recursos gráficos utilizados fueron histogramas y diagramas de caja.

Las significancias o diferencias entre los distintos grupos fueron determinadas mediante la prueba T de Student, considerando 2 colas de distribución y varianzas distintas. Toda $p < 0,05$ fue considerada estadísticamente significativa.

RESULTADOS

1. RESULTADOS DE LA PUESTA A PUNTO DE LAS TÉCNICAS

1.1. Procesado de las muestras

El tiempo necesario para la digestión enzimática de las muestras tisulares, cartílago articular y grasa de Hoffa, fue claramente menor en las muestras de grasa de Hoffa (Fig. 57).

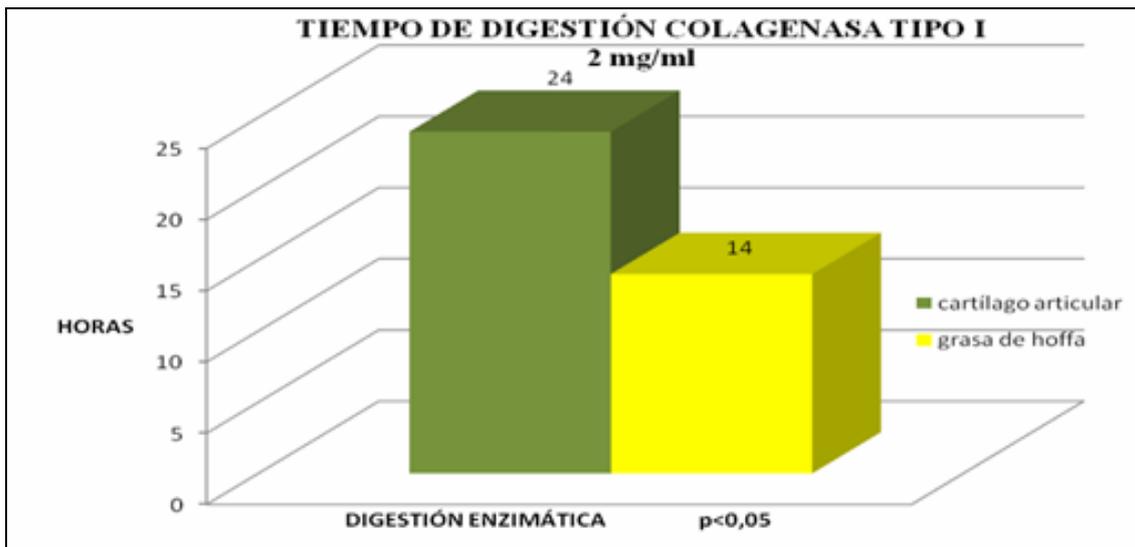


Fig. 57. Tiempo de digestión enzimática para cada tipo de biopsia tisular.

1.2. Determinación de parámetros óptimos para el aislamiento de ADMSCs

1.2.1. Sobre la concentración de colagenasa tipo I.

De entre las distintas concentraciones de colagenasa tipo I que se ensayaron para la digestión enzimática de las muestras de tejido graso infrapatelar (0,5 mg/ml; 1 mg/ml; y 2 mg/ml), se comprobó que las digestiones a concentraciones de enzima de 0,5 mg/ml apenas liberaron células, y que la liberación de células a una concentración de colagenasa de 2 mg/ml fue claramente superior a la obtenida a 1 mg/ml (Fig. 58).

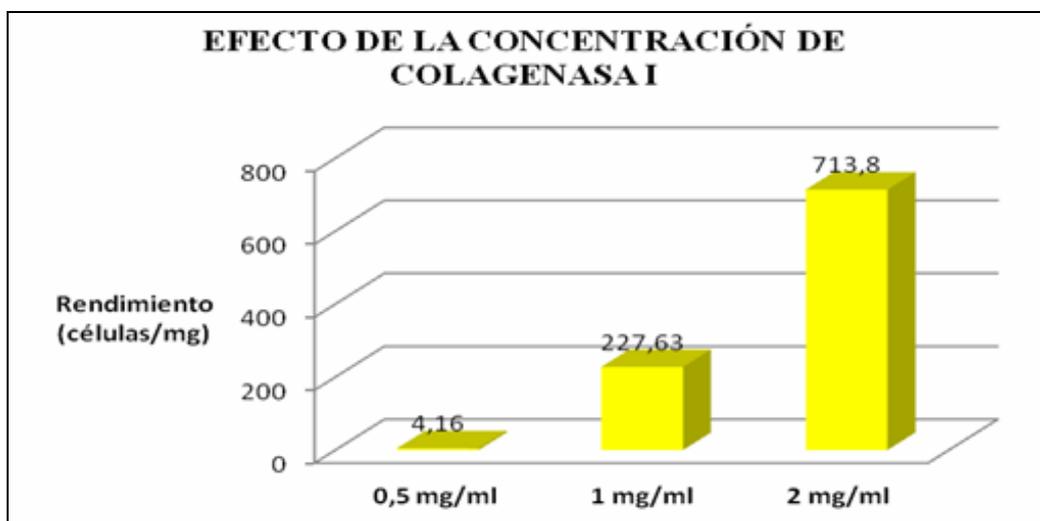


Fig. 58. Representación gráfica de la influencia de distintas concentraciones de colagenasa I en el aislamiento de células de las muestras de tejido graso infrapatelar

1.2.2. Sobre la temperatura de preservación de las muestras.

La media del número de células aisladas de las muestras de tejido graso preservadas a temperatura ambiente fue de 713,8 células/mg de tejido digerido. A una temperatura de preservación de 4°C el número medio de células fue de 324,4 células/mg para el tejido adiposo. Sólo en un caso (muestra número 5) el número medio de células preservadas a temperatura ambiente fue inferior (261,19 células/mg de tejido digerido) al de células aisladas a 4°C (475,6 células/mg de tejido digerido) (Fig. 59).

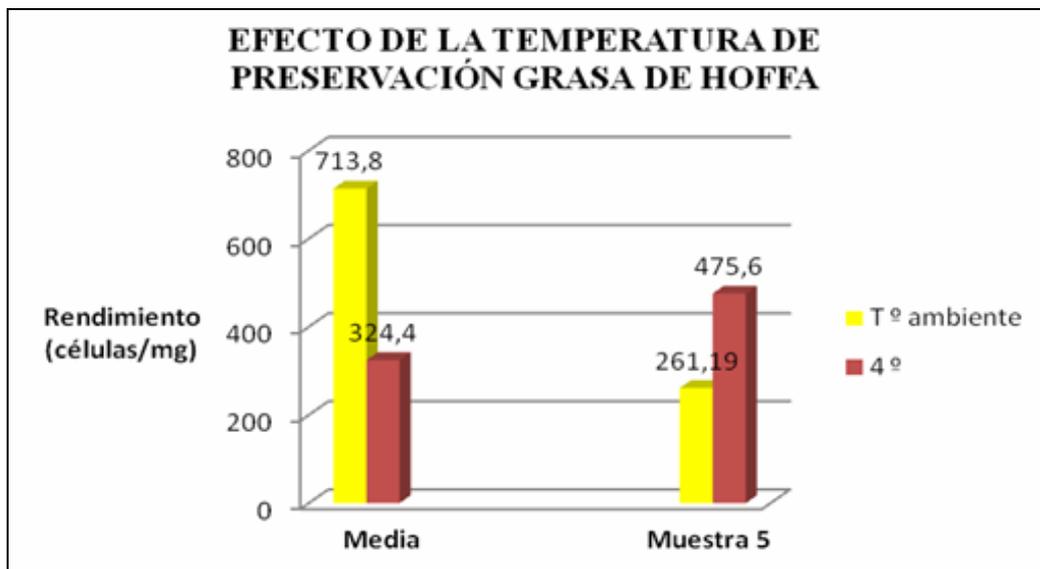


Fig. 59. Representación gráfica del número de células aisladas de las muestras de tejido graso preservadas a temperatura ambiente y a 4°C.

1.2.3. Sobre la agitación magnética durante la digestión enzimática.

En cuanto al efecto de la agitación durante la digestión enzimática del tejido adiposo infrapatelar, se observó una reducción de los tiempos de digestión en las muestras sometidas a agitación magnética suave. Sin embargo, también se observó una reducción del número de células aisladas por miligramo de tejido digerido en las muestras agitadas, con una media de 320,49 células/mg, respecto a las mantenidas sin agitación, que liberaron una media de 713,8 células/mg (Fig. 60).

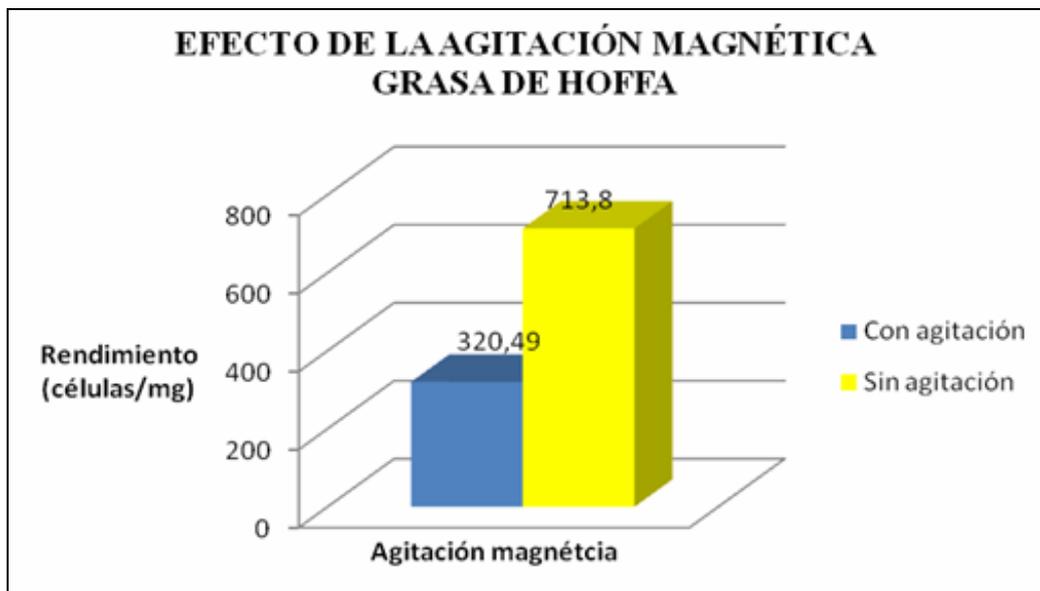


Fig. 60. Representación gráfica de la influencia de la agitación de la solución durante la digestión en el aislamiento de células de las muestras de tejido graso infrapatelar.

1.2.4. Sobre la filtración de la solución resultante de la digestión enzimática.

Dado que tras la digestión de las muestras, en ningún caso se obtuvieron suspensiones celulares homogéneas, se trató de eliminar los restos de tejido no digerido mediante el filtrado de las suspensiones obtenidas. La filtración permitió retirar los restos de tejido sin digerir, pero en el filtro también quedaron atrapadas gran cantidad de células, por lo que en todos los casos se obtuvieron mayores rendimientos celulares a partir de las muestras no filtradas (Fig. 61).

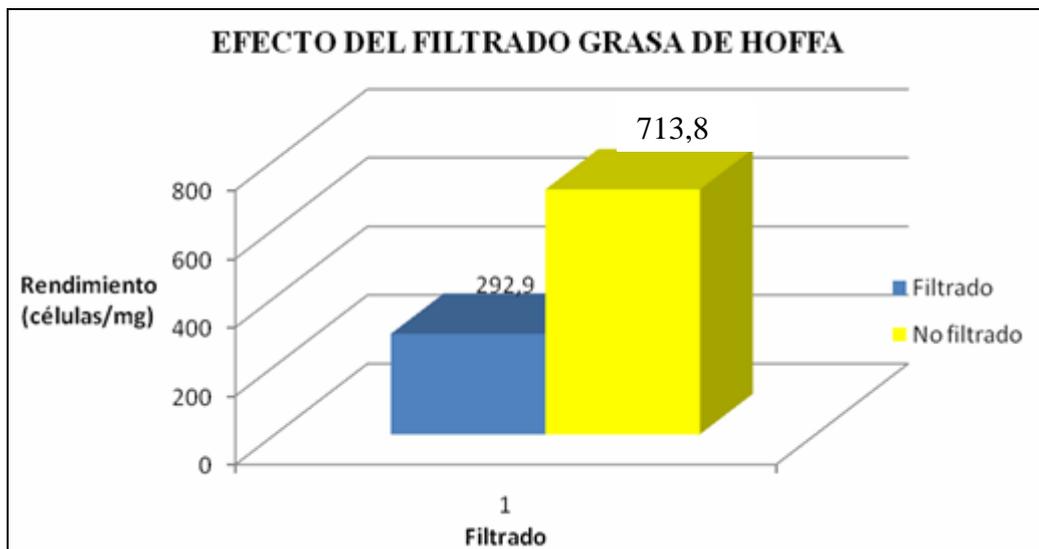


Fig. 61. Representación gráfica de la influencia del filtrado tras la digestión en el aislamiento de células de las muestras de tejido graso.

1.3. Cuantificación celular

Como resumen, una vez establecidos los parámetros óptimos anteriores, se obtuvieron un mayor número de condrocitos por mg de cartílago articular digerido que ADMSCs por mg de grasa de Hoffa digerida: $1423,2 \pm 382,7$ (n= 20) frente a $713,8 \pm 133,3$ (n= 20), respectivamente (Fig. 62).

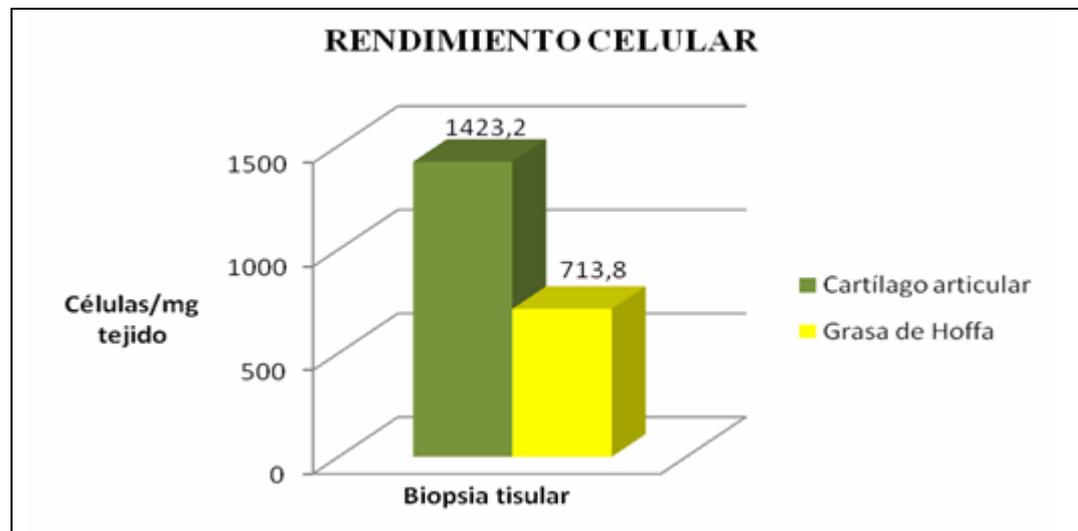


Fig. 62. Rendimiento celular de ambos tejidos.

1.4. Establecimiento del cultivo primario (P0)

En el 100% del total de las muestras de grasa de Hoffa y de cartílago articular sometidas al protocolo de digestión empleado, se consiguieron obtener suspensiones celulares correctamente aisladas y viables para su uso.

Para el establecimiento del cultivo primario (P0) de las ADMSCs obtenidas tras el proceso de digestión celular, en todos los casos estudiados, se utilizó una densidad de siembra alta (30.000 cel/cm^2). Con ella, se lograron obtener un 100% de éxitos en el establecimiento de este cultivo. A las 24-48 horas de la siembra celular sobre el plástico de las placas de cultivo, las células adoptaron una morfología fusiforme (Fig. 63) que, con el paso de los días, fue conformándose en una extensa red de células interconectadas entre sí que alcanzaban el estado de preconfluencia al término de los 6 primeros días (Fig. 64).

La densidad de siembra de los condrocitos articulares fue de $20.000 \text{ células/cm}^2$. Alcanzaron el estado de preconfluencia a los 10 días de la siembra (Fig 65).

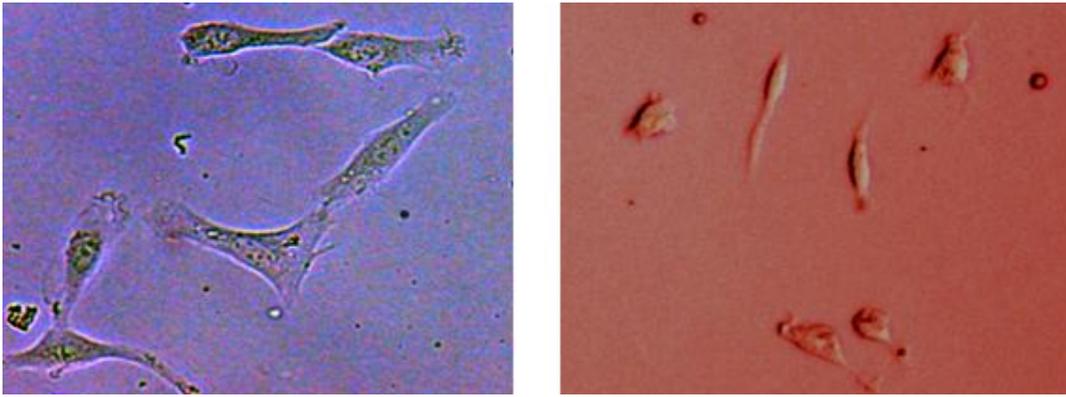


Fig. 63. Morfología celular de ADMSCs a las 24-48 horas de la siembra (20X).

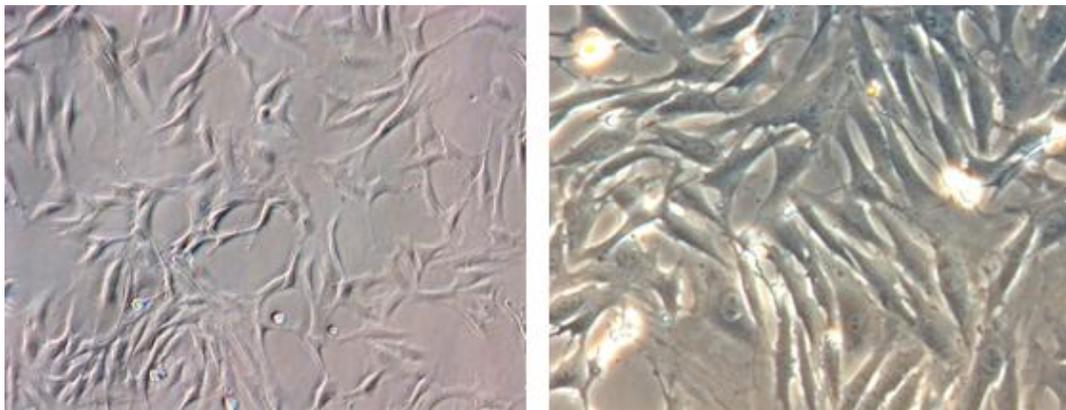


Fig. 64. Estado de preconfluencia de los cultivos celulares de ADMSCs (izquierda: 10X; derecha: 20X).

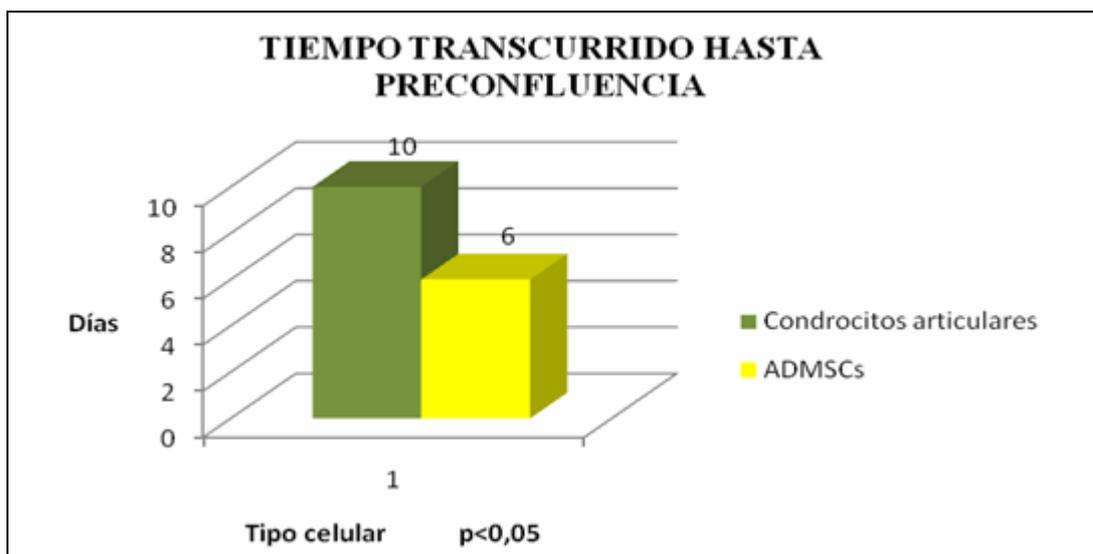


Fig. 65. Días transcurridos hasta alcanzar el estado de preconfluencia para cada uno de los tipos celulares de estudio.

1.5. Individualización y expansión celular

En lo referente a la proliferación celular, en todos los casos estudiados las células presentaron un comportamiento estándar. En ellos, se distinguieron claramente varias fases: una primera fase de acomodación al medio (4 días); una segunda, o fase exponencial de crecimiento, en la que en todos los cultivos las células crecieron hasta llegar a estados de preconfluencia; una tercera, o fase de latencia, que en todos los casos se consiguió entre los 8 y 10 días; y una fase final en la que en todos los casos se observó un repunte en el crecimiento celular debido a que las células se retrajeron en grumos y nuevas células ocuparon la superficie plástica libre. En pocos días, sin embargo, la mayoría de las células se soltaron y murieron (Fig. 66).

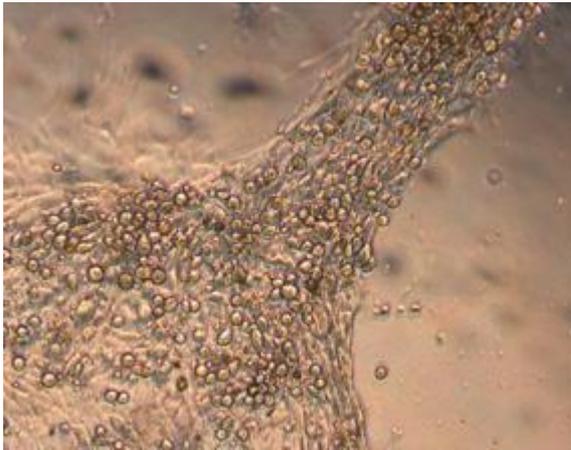


Fig. 66. Estado de hiperconfluencia y retracción en agregados celulares (10X).

Al analizar las tasas de expansión de ambos tipos celulares durante el P0, se observó que las ADMSCs presentaban una mayor tasa de expansión, multiplicando el tamaño de la población por $3,74 \pm 0,181$ ($n=20$) frente a la tasa de expansión de los condrocitos articulares, que fue de $1,725 \pm 0,233$ ($n=20$) (Fig. 67).

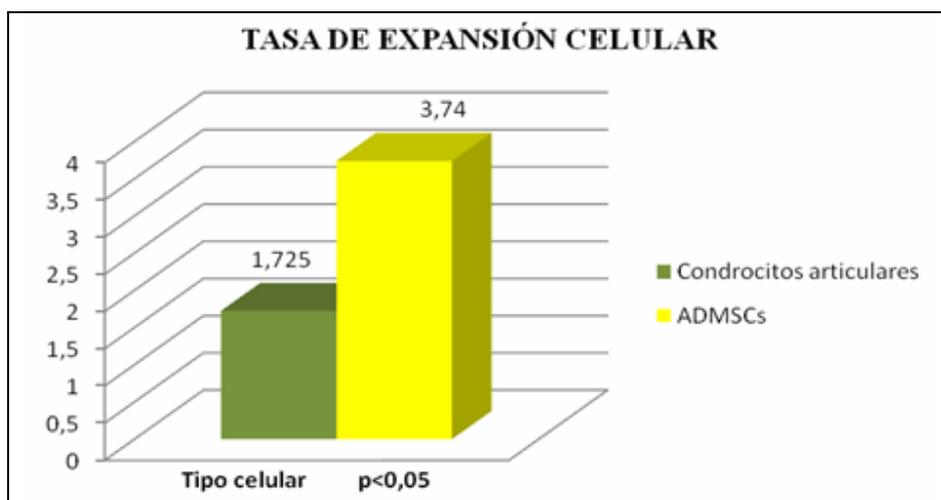


Fig. 67. Tasa de expansión celular en los dos tipos celulares de estudio.

1.6. Multipotencialidad de ADMSCs

En todos los casos estudiados, las poblaciones celulares mostraron su capacidad de diferenciación hacia diferentes estirpes celulares tras la expansión *in vitro*. En los cultivos control no se apreció en ningún caso la existencia de características propias de la células diferenciadas (formación de vacuolas, presencia de proteoglicanos y signos de mineralización respectivamente).

1.6.1. Adipogénesis

Al cabo de 3 días de inducción adipogénica se observó un cambio en la morfología de las células en cultivo, que pasaron de mostrar una morfología fusiforme con finas prolongaciones a una morfología más estrellada. Tras 7 días de cultivo en medio adipogénico la tinción Oil Red O puso en evidencia la formación de vacuolas lipídicas en el interior de las células (Fig. 68).

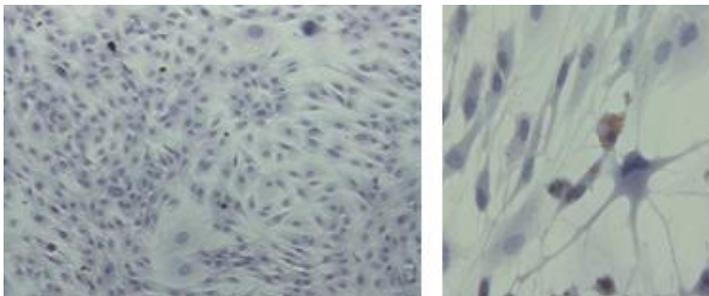


Fig. 68. A la izquierda, control negativo de diferenciación adipogénica (10X). A la derecha, células de fenotipo adipocítico diferenciadas de ADMSCs (40X).

1.6.2. Condrogénesis

El cultivo en condiciones de alta densidad y ambiente tridimensional en matriz de fibrina favoreció la adquisición de características condrocíticas por parte de las poblaciones celulares que, tras 21 días de cultivo en medio condrogénico, comenzaron a mostrar una morfología redondeada y se dispusieron en lagunas dentro de la matriz. Además, la tinción Azul Alcían puso de manifiesto la presencia de proteoglicanos en las zonas de la matriz cercanas a las células diferenciadas (Fig. 69).

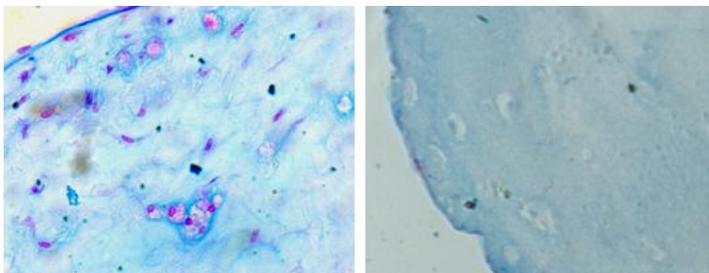


Fig. 69. A la izquierda, células de diferenciación condrogénica en matriz de fibrina teñidas con Azul Alcían (20X). A la derecha, control negativo de diferenciación condrogénica (20X).

1.4.3. Osteogénesis

El cultivo de ADMSCs en medio osteogénico provocó un cambio en el patrón de crecimiento y distribución de las células en cultivo que se tradujo en la formación de nódulos que mostraron signos de mineralización tras la tinción con Alizarin Red. La mineralización comenzó a ser evidente a los 7 días de inducción y fue más intensa a los 14 y 21 días de cultivo en medio osteogénico (Figs. 70 y 71).

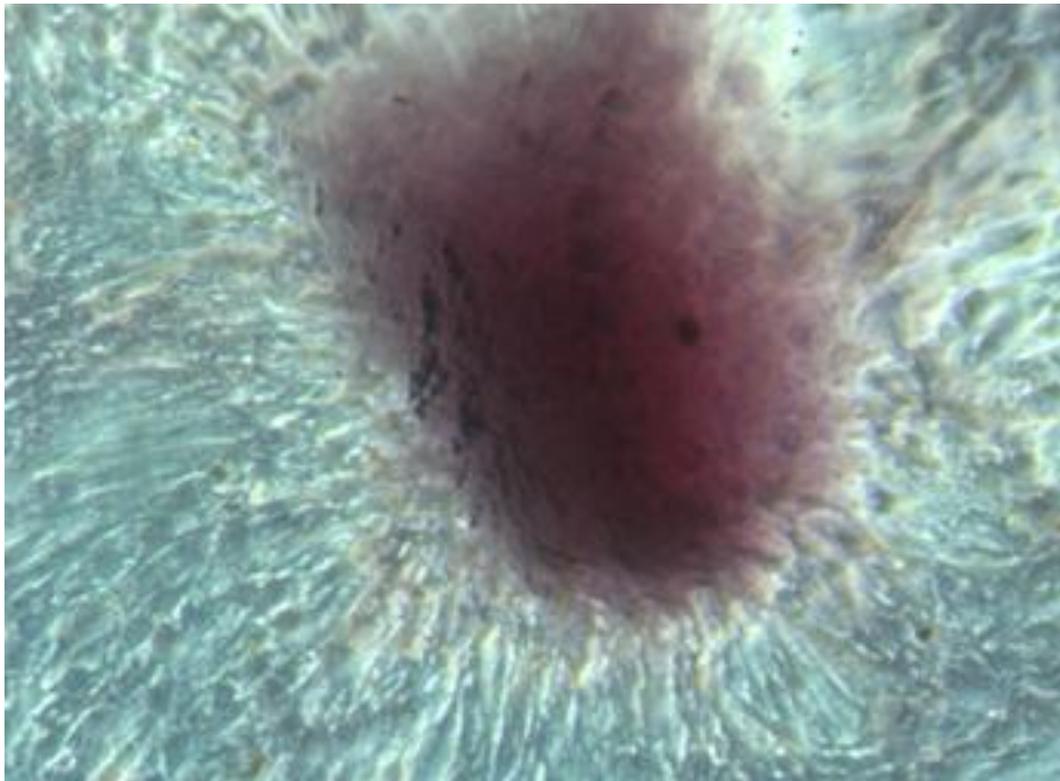


Fig. 70. Control negativo de diferenciación osteogénica (10X).

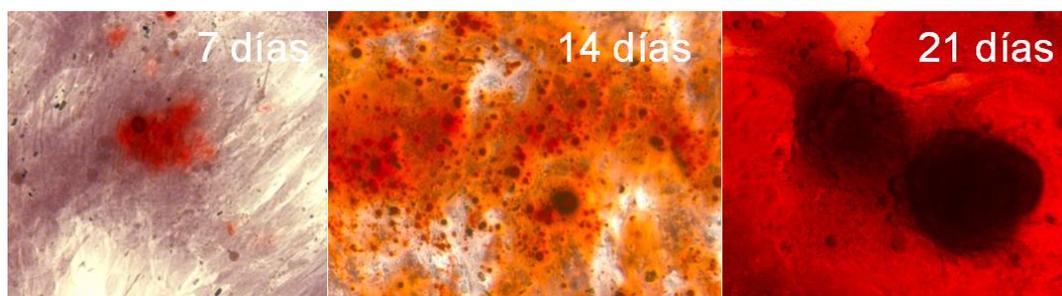


Fig. 71. Fases de mineralización progresiva de la matriz extracelular en cultivo osteogénico con tinción Alizarín Red.

2. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS DE PROLIFERACION CELULAR EN EL SUSTITUTIVO DE CARTÍLAGO

Tras dos semanas de cultivo in vitro no se apreciaron diferencias significativas en cuanto a la proliferación celular tanto de los condrocitos articulares como de las ADMSCs inducidas con MDC, cultivadas en matrices combinadas a los tres % de AH de estudio ($p>0.05$). No se apreciaron, a su vez, diferencias significativas entre ambos tipos celulares ($p>0,05$) (Fig. 72).

A las 4 semanas de cultivo in vitro, no aparecieron diferencias significativas en cuanto a la proliferación celular tanto de los condrocitos articulares como de las ADMSCs inducidas con MDC cultivadas en matrices combinadas a los tres % de AH de estudio ($n=15$). Sin embargo, en este caso, sí se apreciaron diferencias significativas entre ambas poblaciones celulares ($p<0.05$) (Fig. 73).

Por otra parte, al analizar la proliferación celular a las 2 y 4 semanas de cultivo in vitro (Figs. 74 y 75), se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) en cuanto a la proliferación celular de las ADMSCs en el interior de la matriz combinada a los tres % de AH para ambos tiempos de estudio.

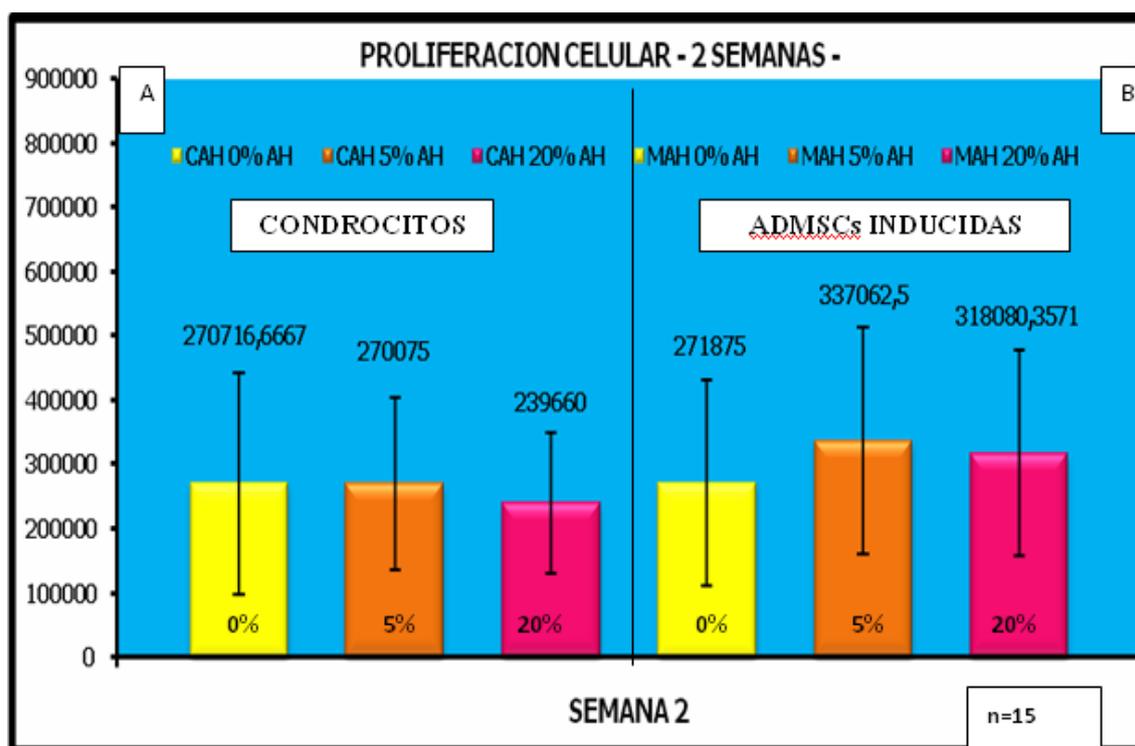


Fig. 72. Proliferación celular a las 2 semanas de estudio de ambos tipos celulares a los tres % de ácido hialurónico de estudio. Se representa el promedio del número de células. Las barras de error representan la desviación estándar (SD).

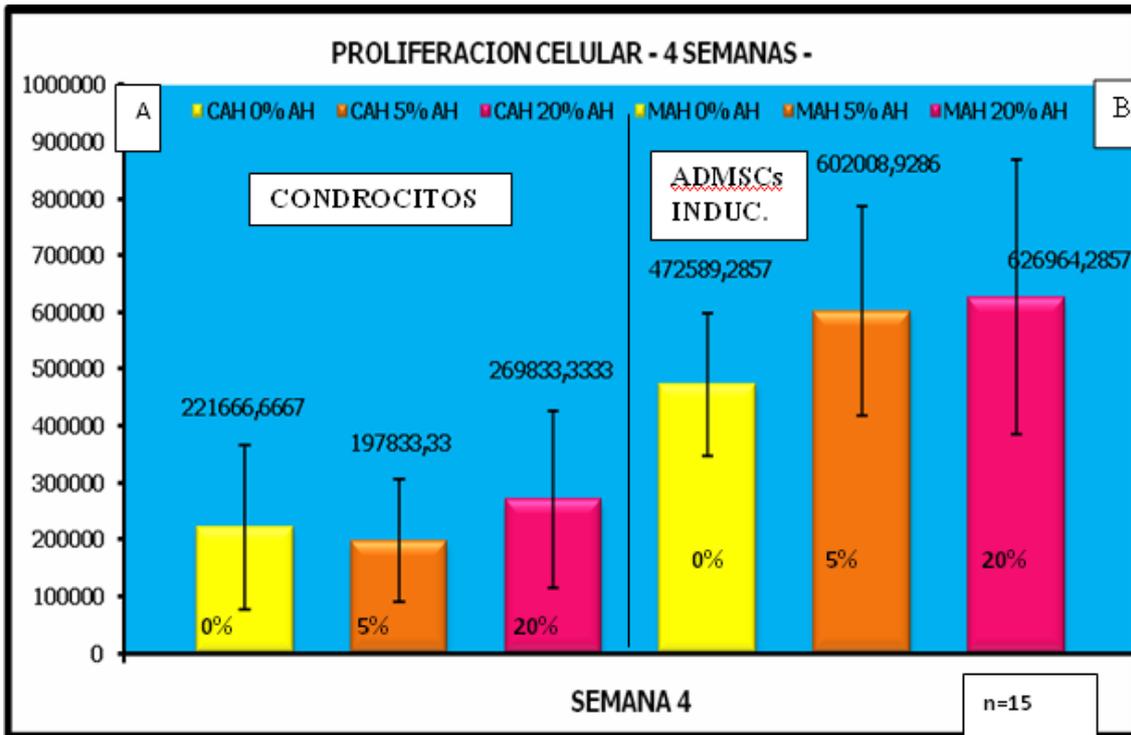


Fig. 73. Proliferación celular a las 4 semanas de estudio de ambos tipos celulares a los tres % de ácido hialurónico de estudio. Se representa el promedio del número de células. Las barras de error representan la desviación estándar (SD).

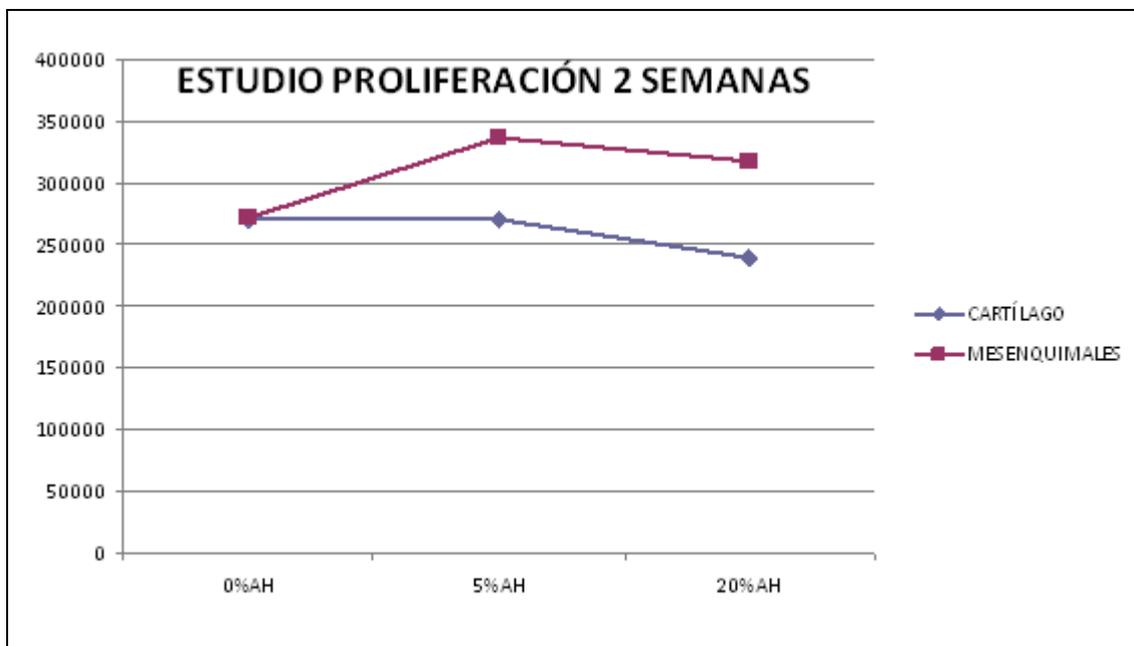


Fig. 74. Diagrama de líneas que compara la proliferación celular de los condrocitos y de las ADMSCs inducidas procedentes de las matrices con diferentes concentraciones de ácido hialurónico a las dos semanas de cultivo.

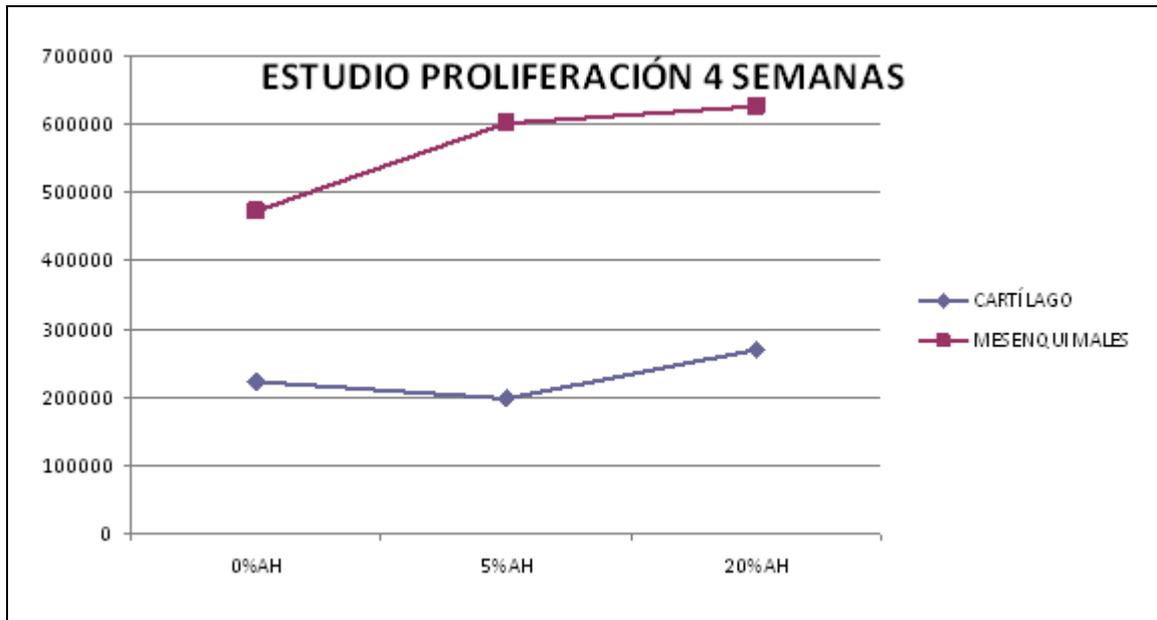


Fig. 75. Diagrama de líneas que compara la proliferación celular de los condrocitos y de las ADMSCs inducidas procedentes de matrices con diferentes concentraciones de ácido hialurónico a las cuatro semanas de cultivo.

3. RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

Se analizaron las secciones histológicas a la semana 4 y 8 de estudio para determinar la adquisición de características condrocíticas mediante la tinción Azul Alcían. Para ello, se compararon los resultados obtenidos con un control positivo (muestra de cartílago sano –Fig. 76-) y un control negativo (muestra de ADMSCs no inducidas en medio base –Fig. 77-).

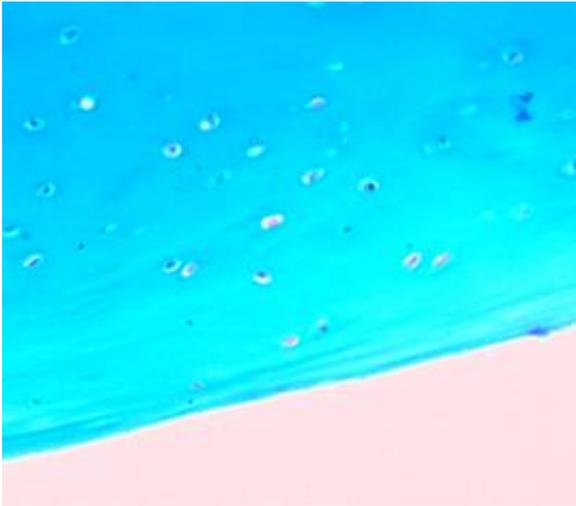


Fig. 76. Sección histológica de cartílago articular sano. Los condrocitos articulares presentan núcleos redondeados y se localizan embebidos en lagunas dentro de la matriz extracelular. Los proteoglicanos de la matriz extracelular presentan coloración azul intensa. Control positivo. (Tinción Azul Alcían 20x).

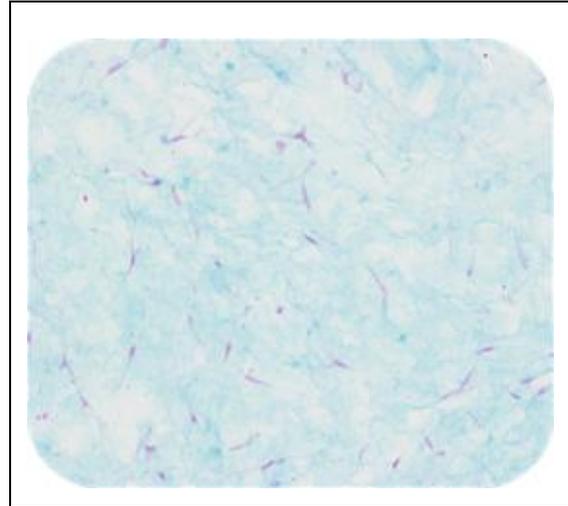


Fig. 77. Sección histológica de ADMSCs en medio de cultivo base. Las células presentan una forma fusiforme con débil tinción de la matriz extracelular. Control negativo. (Tinción Azul Alcían 20x).

A las 4 semanas de estudio (Fig. 78) se apreciaron importantes diferencias en cuanto a la morfología celular; las ADMSCs no inducidas (Figs. 78D, 78E y 78F) son claramente fusiformes, en cambio, los condrocitos y las ADMSCs inducidas presentaban morfología redondeada, independientemente de cuál sea el % de AH que contengan. En cuanto a la tinción de los proteoglicanos ácidos, en las secciones histológicas de ADMSCs inducidas, se podía apreciar una incipiente coloración azul en forma de halo alrededor de las células, siendo ésta más intensa cuanto mayor es el % de AH (Fig. 78I). Si bien es cierto, que esta incipiente coloración aparece también en la sección que no posee AH (Fig. 78G), poniendo de manifiesto que el ambiente tridimensional que proporciona la matriz de fibrina promueve la diferenciación celular hacia fenotipo condrocítico.

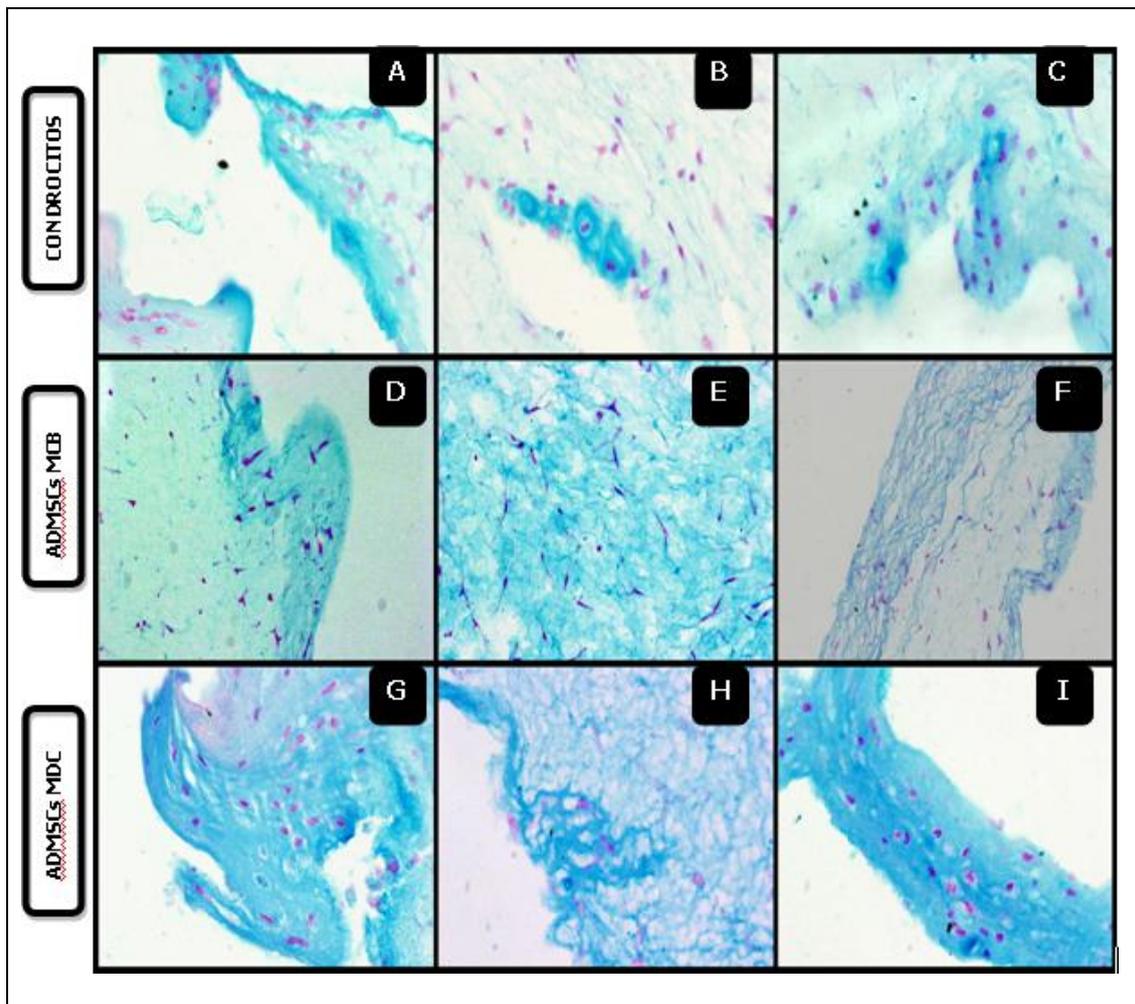


Fig. 78. Resultados histológicos obtenidos en la semana 4 de estudio. Fila superior: matrices de condrocitos articulares. Fila intermedia: matrices de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADMSCs) con medio de cultivo base. Fila inferior: matrices de ADMSCs con medio de diferenciación condrogénico. A, D y G: 0% Ácido Hialurónico; B, E y H: 5% Ácido Hialurónico; C, F y I: 20% Ácido hialurónico. (Tinción Azul Alcían, 40X).

A las 8 semanas de estudio (Fig. 79), las ADMSCs no inducidas seguían manteniendo morfología fibroblástica. Los condrocitos y las ADMSCs inducidas tenían núcleos redondeados y aparecían embebidas en lagunas dentro de una matriz que presentaba una coloración azul intensa (Figs. 79J, 79K, 79P, 79Q). Comparando la figura 79Q con el control positivo, se apreciaron claras similitudes en cuanto a morfología celular y disposición de éstas en la matriz.

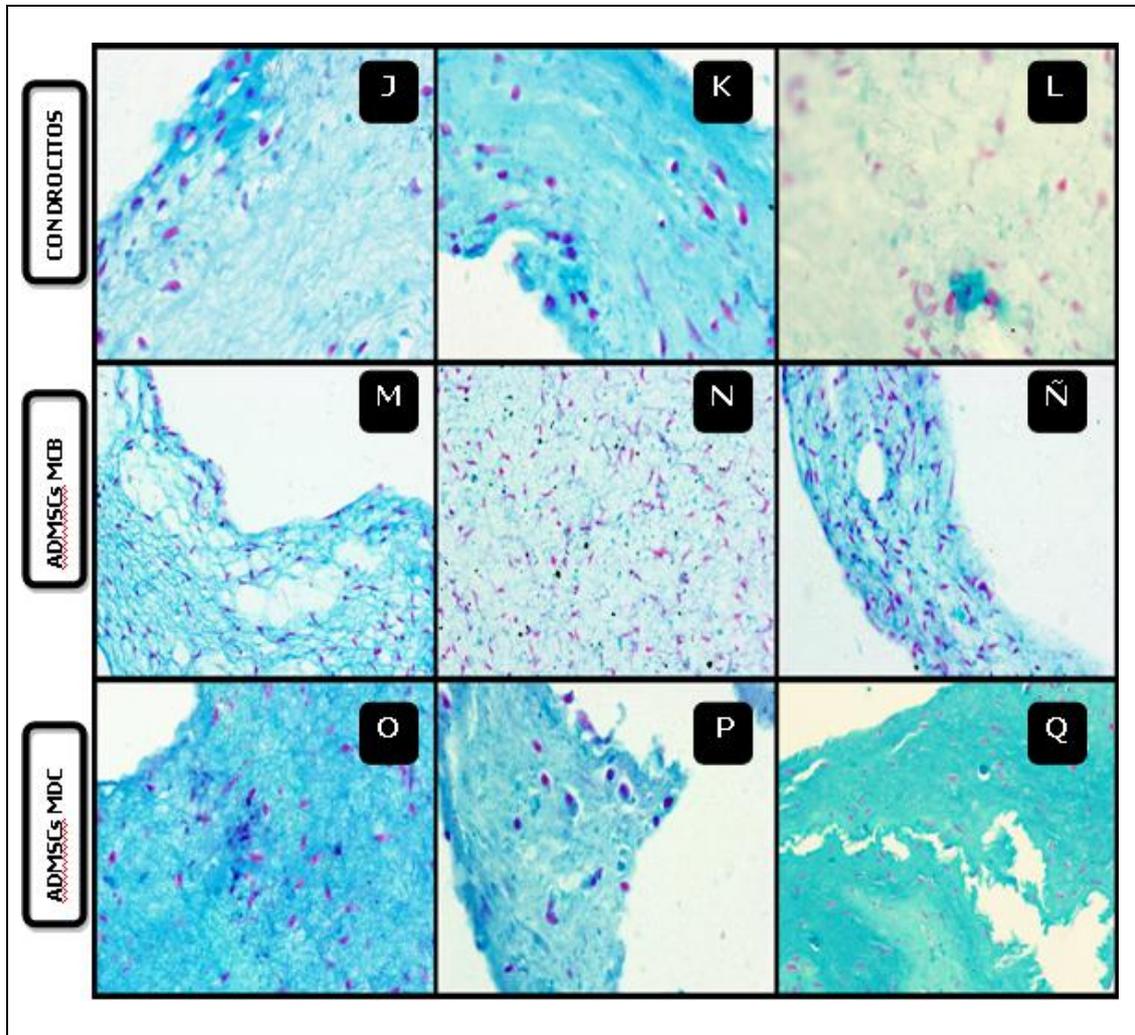


Fig. 79. Resultados histológicos obtenidos en la semana 8 de estudio. Fila superior: matrices de condrocitos articulares. Fila intermedia: matrices de células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADMSCs) con medio de cultivo base. Fila inferior: matrices de ADMSCs con medio de diferenciación condrogénico J, M y O: 0% Ácido Hialurónico; K, N y P: 5% Ácido Hialurónico L, Ñ y K: 20% Ácido hialurónico. (Tinción Azul Alcían, 40X).

DISCUSIÓN

1. LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS ACTUALES PARA EL TRATAMIENTO DE LOS DEFECTOS CONDRALES

Hunter, en 1743 ¹⁵, dijo que “desde Hipócrates hasta nuestros días se ha observado que el cartílago ulcerado es un gran problema y una vez destruido no es reparado”. En 1851, Paget continuó diciendo: “no se han dado casos, pienso yo, en los que una lesión del cartílago se haya reparado o una porción perdida del cartílago se restaure, con un cartílago articular nuevo y correctamente formado”⁴⁶.

El cartílago articular tiene una limitada capacidad para autorepararse. Los defectos que se extienden hasta el hueso subcondral pueden repararse mediante la formación de neocartílago debido a la migración de células madre derivadas de la médula ósea¹⁰. Este neocartílago no tiene las características biomecánicas del cartílago articular hialino y, por lo tanto, degenera con facilidad y lleva a la artrosis. Esta es la enfermedad más prevalente del sistema musculoesquelético, afectando a más del 15% de la población en España², con un gran impacto sobre la capacidad para realizar actividades de la vida diaria. Los costes adicionales que suponen su tratamiento hacen de la enfermedad un gran problema socioeconómico en los países desarrollados con una larga expectativa de vida⁴.

Muchos cirujanos ortopédicos piensan que no es necesario que se regenere el cartílago dañado con cartílago hialino porque consideran que los resultados clínicos son satisfactorios sea cual sea el tipo de tejido nuevo. Sin embargo, los estudios que muestran satisfacción con la reparación mediante fibrocartílago son de corto seguimiento, menor de 10 años. Por ello, actualmente se piensa que la lesión condral debería ser reparada con cartílago hialino y que de otra manera los cambios degenerativos ocurren invariablemente.

Las respuestas de reparación del cartílago son diferentes en los individuos de diferentes edades y para diferentes especies animales, existiendo abundantes referencias bibliográficas sobre el tratamiento quirúrgico de tales defectos¹². Las opciones terapéuticas se pueden dividir en 6 categorías:

1. Reducción anatómica y osteosíntesis en el caso de fracturas osteocondrales y osteocondritis disecante.
2. Tratamiento sintomático para disminuir los síntomas clínicos, como son el lavado y el desbridamiento.
3. Provocación o estímulo de la reparación del defecto por parte del organismo mediante la estimulación del hueso subcondral y la realización de injertos periósticos o de pericondrio.
4. Implantes de condrocitos, células mesenquimales, compuestos de cartílago, aloinjertos osteocondrales, etc.

5. Realización de gestos asociados para favorecer la regeneración, como pueden ser las osteotomías correctoras de ejes, ligamentoplastias, etc.

6. La artroplastia sustitutiva patelofemoral, unicompartmental o total.

Hubbard y Jackson⁵⁴, observaron que los pacientes con artrosis obtenían un alivio significativo del dolor después del lavado artroscópico. El efecto, sin embargo, era sólo temporal y la patología subyacente no se resolvía.

El desbridamiento, por su parte, elimina el cartílago dañado que produce síntomas mecánicos como atrapamientos y bloqueos; y elimina restos liberados del área lesionada. Sin embargo, no actúa sobre el hueso subcondral y, aunque produce alivio de los síntomas a corto plazo, no resuelve la causa subyacente de la lesión.

Las perforaciones múltiples, microfracturas, espongiolización y abrasión son técnicas quirúrgicas que estimulan a las células madre de la médula ósea para que migren desde el hueso subcondral al lugar del defecto. El fibrocartílago que resulta es de diferente estructura, composición y propiedades mecánicas que el hialino. No tiene proteoglicanos ni otras proteínas fundamentales del cartílago hialino y es, por lo tanto, más susceptible a la rotura. Aunque cubra el defecto, fracasa en la distribución de cargas y en la prevención de la degeneración, con resultados clínicos generalmente pobres². El fibrocartílago contiene principalmente colágeno tipo I y relativamente poca cantidad de agrecano¹³. La técnica de la microfractura es un procedimiento mínimamente invasivo y de bajo coste, siendo en la actualidad el método de primera elección en pacientes previamente no tratados¹².

Ritsilä⁶³ utilizó periostio suturado al hueso subcondral abrasionado, con el cambium enfrentado al hueso. También empleó solución de fibrina para ayudar a la permanencia del injerto. Inicialmente se publicaron buenos resultados. Sin embargo, Sandelin⁹⁸ hizo un seguimiento a largo plazo de 14 pacientes intervenidos con esta técnica con un solo resultado positivo. Las biopsias demostraron la presencia de fibrocartílago. Rubak⁶⁴ utilizó periostio para rellenar defectos producidos por osteocondritis disecante en el cóndilo femoral e inicialmente informó de buenos resultados. Sin embargo, Angermann⁶⁵ reexaminó a estos pacientes y solo el 43% de ellos tenían un resultado aceptable. En 1998, Lorentzon y Alfredson⁶⁶ informaron de un 100% de resultados buenos y excelentes en 18 pacientes tratados con injerto perióstico en la rótula, pero no se publicó la evidencia microscópica de presencia de cartílago hialino y el tiempo de seguimiento fue corto.

En 1976 Skoog y Johansson⁶⁷ introdujeron la técnica de sustitución de cartílago articular dañado por pericondrio en las articulaciones del dedo. Homminga y cols⁶⁸ utilizaron pericondrio en la rodilla e inicialmente informaron de buenos resultados. El pericondrio obtenido de las costillas fue trasplantado a varios defectos del cartílago articular, a una superficie de hueso subcondral abrasionada y fijado con solución de fibrina. Desafortunadamente, el injerto de pericondrio dio lugar a la producción de colágeno de tipo X y a osificación encondral en aproximadamente dos tercios de los pacientes, y la deslaminación del injerto constituyó también una complicación frecuente.

Los resultados a largo plazo tampoco estimulan la utilización de pericondrio en pacientes jóvenes o de mediana edad.

Matsusue y cols.¹⁶, en 1993, fueron los primeros que publicaron sobre injertos autólogos osteocondrales múltiples extraídos con forma cilíndrica de la cara lateral del cóndilo del fémur para tratar las lesiones osteocondrales. Posteriormente, Hangody⁸ describió la técnica de la mosaicoplastia para el tratamiento de lesiones focales condrales y osteocondrales en el fémur y la rótula, así como en la osteocondritis disecante de la rodilla y del astrágalo. Desde entonces, la técnica se ha difundido ampliamente para reparar defectos del cartílago articular con cartílago hialino. Sin embargo, algunos problemas todavía no se han resuelto: la dificultad de aplicar la técnica a defectos muy extensos, la morbilidad del sitio donante y la dificultad para obtener una superficie ligeramente redondeada en el lugar del injerto¹⁴.

La ventaja de la técnica de la mosaicoplastia abierta sobre la artroscópica es la posibilidad de conseguir un mayor margen de maniobra para lograr la perpendicularidad tanto en la extracción de los cilindros como en su inserción. Sin embargo, los pacientes que han sido tratados de forma artroscópica presentan tiempos de incorporación a la actividad laboral o deportiva más rápidos que en los tratados con cirugía abierta.

En los casos en los que se han podido realizar segundas artroscopias obteniendo biopsias puntuales de las zonas donante y receptora ha podido apreciarse el relleno de la zona donante con un tipo de tejido similar al fibrocartílago, que también se encontró en la interfase entre los cilindros trasplantados entre sí y en la región entre ellos y el cartílago normal. Por otra parte, la superficie trasplantada permanecía congruente y macroscópicamente mostraba una apariencia en color y consistencia a la palpación similar al cartílago hialino. En estas artroscopias de control no se apreció pérdida de cilindros osteocondrales trasplantados hacia el interior de la articulación⁹. La evaluación histológica de las biopsias ponía de manifiesto que el cartílago trasplantado mantenía sus rasgos hialinos (colágeno tipo II y glucosaminoglicanos) y una integración en profundidad de la matriz condral en los injertos ya maduros. Estas características eran claras con las tinciones normales, mediante el microscopio óptico y de luz polarizada y mediante técnicas enzimáticas¹⁰.

Los trasplantes con aloinjertos osteocondrales están limitados por la disponibilidad de donantes y sólo realizables en pocos centros con resultados variables. La utilización del aloinjerto se remonta a Lexer, en 1908⁶⁹. Sin embargo, Convery y Gross^{70, 71} han presentado resultados importantes del trasplante aloinjertado. Los riesgos de reacciones inmunológicas y las enfermedades de transmisión siguen limitando el tratamiento en pacientes jóvenes con lesiones focales condrales u osteocondrales.

Una desventaja del aloinjerto osteocondral es la viabilidad celular, que supone únicamente entre el 10% y el 30%. Con el tiempo, el cartílago no será capaz de integrarse en el cartílago circundante, y la fijación puede resultar problemática. Es, además, un procedimiento técnicamente exigente. Gross⁷¹ informó de resultados significativos a largo plazo, pero en un grupo de pacientes completamente diferente y con indicaciones totalmente distintas del tema que nos ocupa.

Wakitani y cols.¹⁸ aislaron condrocitos usando la digestión enzimática del cartílago articular en conejos de 4 semanas. Estas células aisladas fueron introducidas en un gel de colágeno (0,27% de colágeno tipo I de la piel del conejo con una concentración final de células de 2×10 millones de células/ml). Este gel fue trasplantado en un defecto del cartílago de 4 mm de diámetro por 4 mm de profundidad realizado en la patela. A las 24 semanas el estudio histológico demostró evidencia de que las células mantenían las características del cartílago hialino. El éxito del trasplante en este estudio fue del 80%, mucho mayor que en publicaciones anteriores. El motivo de ello fue atribuido a dos factores: primero, a que los condrocitos no fueron desplazados de su lugar debido al colágeno que les fijó dentro del defecto; y segundo, a que los condrocitos trasplantados permanecían viables debido a que el gel de colágeno les proporcionaba un ambiente adecuado para la síntesis de las macromoléculas de la matriz. Para determinar si las características diferenciales de los condrocitos se mantenían, el colágeno sintetizado por los condrocitos trasplantados fue analizado bioquímicamente, demostrándose que el colágeno sintetizado mayoritariamente era del tipo II. Como contraste, en el grupo control el colágeno que rellenaba el defecto original era del tipo I.

En otro estudio realizado por el mismo grupo¹⁹, se cultivaron los condrocitos en los geles de colágeno añadiendo vitamina C y trasplantando el compuesto dentro de los defectos de la rodilla del conejo. Este compuesto tenía la elasticidad y consistencia suficiente como para permitir modelarlo e introducirlo en el defecto. La evaluación histológica fue realizada 6 meses después de la cirugía. En el grupo en el que se realizó el trasplante se observó una buena reparación mantenida durante esos seis meses.

La técnica ACI (autotrasplante de condrocitos autólogos) fue publicada por primera vez en modelos animales en 1989^{18, 20}. Su efectividad clínica se publicó por primera vez en 1994¹.

Brittberg y cols.¹, en 1994, revisaron el resultado del trasplante de condrocitos autólogos mediante artroscopias realizadas a los 3 meses del procedimiento, comprobando el aspecto del cartílago mediante palpación con un gancho y considerando como aceptable, biológicamente hablando, al hecho del relleno con tejido condral contactando con el sano al mismo nivel. Posteriormente realizaron una segunda artroscopia y tomaron una muestra de cartílago para su análisis inmunohistoquímico y determinación del colágeno tipo II. En los primeros meses todos los pacientes presentaban un resultado clínico excelente. La primera artroscopia mostró áreas de cartílago regenerado con bordes visibles a la altura del sano que lo rodeaba, con color y textura similares. En la mayoría de los casos, sin embargo, se observaba el típico movimiento de ola u ondulante, demostrando un pobre anclado al hueso subcondral.

En el cóndilo femoral, al cabo de 2 años, 14 de 16 pacientes continuaron mostrando resultados clínicos excelentes o buenos y la artroscopia realizada a los 12 y 46 meses demostró que en 14 el aspecto biológico era aceptable, sin movimientos ondulantes en la superficie. Los autores describieron la pérdida del trasplante en dos casos, con el consiguiente mal resultado. Cuando se realizó la biopsia de 15 pacientes se

observaron restos de periostio, con demostración inmunohistoquímica de presencia de colágeno tipo II en 5 pacientes ¹.

En la patela, los resultados clínicos fueron excelentes o buenos en dos pacientes, regulares en tres y pobres en 2 al cabo de 36 meses de seguimiento. La segunda artroscopia demostró un aspecto macroscópico aceptable en 3 casos y sólo en uno se demostró la presencia de cartílago hialino tras la biopsia. En los seis restantes sólo se identificó tejido fibroso. El resultado de los trasplantes de condrocitos autólogos en defectos patelares fueron malos en la experiencia de Brittberg y cols.¹, que los atribuyeron a la hiperpresión y desalineación. Por este motivo sugirieron la necesidad de corregir las anomalías subyacentes, del mismo modo que en los defectos condrales femorales en rodillas inestables.

Brittberg y cols.¹ concluyen que el cultivo de condrocitos autólogos puede ser usado para reparar defectos condrales en la articulación fémorotibial y que este tratamiento restablece la función al formar predominantemente cartílago similar al hialino.

El implante de condrocitos autólogos (ACI) fue aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) en 1997, habiéndose realizado en más de 20.000 pacientes en todo el mundo ¹⁴. Sin embargo, la efectividad del ACI permanece hoy en día controvertida debido al poco nivel de evidencia de los ensayos, que habitualmente no eran randomizados ni controlados. Desde el año 2000 se han publicado ensayos controlados randomizados ^{21,22} comparando ACI y mosaicoplastia, pero los resultados no permiten llegar a una conclusión sobre cuál de estos procedimientos es más efectivo.

En 2004, Knutsen y cols.²³ publicaron que no había diferencias significativas en los resultados macroscópicos e histológicos de las muestras en pacientes sometidos a ACI y a microfracturas, y que no había asociación entre los hallazgos histológicos y los resultados clínicos en los primeros dos años postratamiento. Se determinó que el coste de un ACI por paciente era de 10000 dólares y que el de la microfractura era muy inferior, concluyéndose que había que reconsiderar el uso del ACI.

La técnica ACI puede ser imposible de realizar en ciertas áreas de la articulación debido a factores anatómicos. La fijación del colgajo perióstico u otro procedimiento similar puede ser inseguro, especialmente en defectos con pérdida de un borde cartilaginoso sano. Otras complicaciones publicadas incluyen la hipertrofia perióstica, la distribución irregular de células y la pérdida de células dentro de la cavidad articular, lo que significa una reintervención en alrededor del 25 al 36% de los pacientes ³³.

La mayor causa de reoperación es la hipertrofia del tejido ^{72, 73, 74}. Usando membranas de colágeno en lugar de periostio se podría reducir la necesidad de reoperación. Varios estudios muestran una incidencia más baja de hipertrofia del injerto con el uso de membranas de colágeno tipo I/III ^{73, 74}.

Otros investigadores ¹⁴ todavía no han podido demostrar que el ACI sea efectivo para la reparación de los defectos del cartílago. Sin embargo, todo esto se aplica a la primera generación ACI que no usa una estructura, andamiaje o vehículo. La segunda

generación que sí usa dichos andamiajes está siendo estudiada y se espera que su efectividad sea mejor que en los de primera generación.

En relación con la evaluación del resultado de los trasplantes de condrocitos, la inmunohistoquímica es la técnica más utilizada para detectar la presencia de fibras de colágeno tipo II¹, que son las más importantes en la trama macromolecular de la matriz extracelular que da al cartílago hialino sus propiedades biomecánicas.

La RM también sirve y es útil para evaluar la morfología del tejido de reparación^{82, 83}. Es un método no invasivo y alternativo a la artroscopia. Las técnicas de resonancia magnética de alta resolución, con o sin uso de gadolinio, han evolucionado significativamente en los últimos años. Se utiliza para evaluar el tejido de reparación tanto con la técnica ACI como con la MACI. Marlovits y cols.⁸⁴ demostraron, usando RM de alta resolución, que la implantación y fijación de condrocitos embebidos en un andamiaje de membrana de colágeno con pegamento de fibrina sin usar fijación quirúrgica presentaba una tasa de anclaje del 88% a los 35 días del implante.

Con la RM se puede estimar la cantidad de defecto reparado, pero no su calidad. La mejor forma es utilizar la artroscopia, si bien, obviamente, es un procedimiento invasivo. La biopsia, mucho más. Para intentar obviar los inconvenientes de ambos se ha investigado el uso de marcadores biológicos de la artrosis. Muchos investigadores han intentado detectar los productos metabólicos de los componentes del cartílago articular (proteoglicanos, colágeno tipo II y proteínas no colágenas) en líquido sinovial o en sangre. Los marcadores de osteoartrosis que se han utilizado han sido el Keratán sulfato, que es el más utilizado¹⁴, el condroitín 6-sulfato, el agrecano CS846, el ácido hialurónico y la proteína oligomérica del cartílago.

El origen de los condrocitos es uno de los problemas más importantes en la técnica ACI. Los condrocitos alógenos son difíciles de obtener en algunos países por trabas burocráticas. Se necesita una técnica que induzca la proliferación de condrocitos in vitro sin que pierdan su expresión fenotípica. Cuando los condrocitos son cultivados en monocapa, proliferan, pero rápidamente pierden sus características. Cuando se cultivan en condiciones tridimensionales, como en gel de colágeno mantienen su expresión fenotípica, pero no proliferan rápidamente. El uso de cultivos tridimensionales utilizando factores de crecimiento podría resolver este problema¹⁴.

El avance de la tecnología está consiguiendo solventar las desventajas de la técnica ACI mediante el uso de injertos de cartílago desarrollados mediante ingeniería tisular dentro de andamiajes o matrices en tres dimensiones³³.

La evidencia es limitada en lo que respecta a la distribución homogénea de las células dentro del andamiaje y en cuanto al mantenimiento del fenotipo de los condrocitos¹². Por otra parte, no se ha publicado ningún estudio a corto o medio plazo de los resultados clínicos e histológicos de la técnica MACI (implante de condrocitos autólogos con matriz), ni de sus ventajas con respecto al ACI¹². Sin embargo, es evidente que la técnica MACI puede reducir el tiempo quirúrgico, la morbilidad y los riesgos de la hipertrofia perióstica y de las adherencias postoperatorias.

Otra mejora potencial con la aplicación de la técnica MACI es la posibilidad de aplicar células condroprogenitoras en lugar de condrocitos articulares, con lo que minimizaríamos la morbilidad en el lugar de donación. En esta línea se encuadra nuestro trabajo. Basándonos en estudios previos ¹²⁵ y en los trabajos publicados por Zuk ^{104, 106}, Wickman ⁹⁴ y Eriksson ⁹³ decidimos utilizar las ADMSCs derivadas de la grasa infrapatelar de las rodillas como células condroprogenitoras. Nos faltaba definir el tipo de andamiaje en el cual vehicular esas células. La elección del compuesto fibrina/ácido hialurónico se decidió por las ventajas de disponer de una proteína autóloga a la cuál se añaden diferentes concentraciones de ácido hialurónico (componente del cartílago articular), pensando que dicho andamiaje favorecería la proliferación y el mantenimiento del fenotipo condrocítico tal como otros autores ya habían publicado ^{118, 119, 120, 121, 122}.

2. TÉCNICA MACI: LA BÚSQUEDA DEL ANDAMIAJE PERFECTO

Se han comercializado varios andamiajes o soportes como son las membranas de colágeno, el ácido hialurónico, la fibrina, el alginato, la azarosa, el quitosan y los copolímeros sintéticos. A pesar de la difusión de este método, la matriz transportadora ideal no se ha identificado¹², continuando sin respuesta muchas preguntas: ¿Las técnicas de ingeniería tisular para el uso MACI aseguran una distribución homogénea de un alto número de condrocitos vivos?, ¿proporcionan una estabilidad biomecánica inicial?, ¿promueven la diferenciación de los condrocitos y la formación de matriz cartilaginosa? y, en definitiva, ¿mejoran los resultados de la técnica ACI?

Los andamiajes deben ser biocompatibles, estables mecánica y estructuralmente, deben poder incorporar las células y que se anclen mediante moléculas bioactivas para promover la diferenciación/maduración y, por último, deben ser biodegradables. Es decir, deben comportarse únicamente como un soporte temporal¹².

Los andamiajes de colágeno se han utilizado ampliamente durante décadas para la regeneración cartilaginosa^{76, 77, 28, 18}. El colágeno se puede fabricar como una membrana, como un gel o como una esponja, y está sujeto a degradación enzimática.

La técnica MACI original fue introducida en 1999 por Cherubino y cols.³⁵ (Matriz-induced ACI®; Veringen, Leverkusen, Germany). En ella, una bicapa de colágeno I-III era utilizada como matriz o andamiaje. Utilizaron células procedentes de pacientes que expandieron *in vitro*. Una vez que crecieron se incluyeron entre dos capas de colágeno en la sala de operaciones previamente a su implantación. La membrana se aseguraba al defecto directamente usando un pegamento de fibrina y sin usar cobertura de periostio.

Otras membranas de colágeno utilizadas han sido la denominada Maix® (Matricel Hezzenrath, Germany) y la Chondro-Guide® (Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland), de origen porcino.

Las membranas se degradan por digestión enzimática y tienen dos superficies diferentes: la externa, con buenas propiedades mecánicas y que hace de barrera, y la interna, porosa y estimulante de las células a producir moléculas específicas de la matriz. Se han usado ampliamente en cirugía dental y maxilofacial.

Diferentes estudios *in vivo* e *in vitro*^{75, 78} han demostrado que la multicapa tridimensional es un excelente medio para el anclaje de células manteniendo el fenotipo de los condrocitos a lo largo del tiempo, así como para limitar la migración de las células y la entrada de proteínas inflamatorias dentro del defecto. Un reciente estudio en ovejas ha demostrado que la técnica MACI con colágeno tiene resultados cuantitativos y cualitativamente mejores que los que se obtienen con la técnica de las microfracturas³⁶.

Gigante y cols.³⁷ analizaron la distribución, viabilidad y expresión fenotípica de condrocitos humanos embebidos en una membrana de colágeno. La parte residual de cada membrana utilizada en 12 pacientes con técnica MACI fue testada por técnicas

colorimétricas, histoquímicas y análisis ultraestructural. En todas las muestras se detectaron un gran número de células viables distribuidas homogéneamente y éstas células expresaron los marcadores de diferenciación de condrocitos del cartílago hialino.

Ochi y cols.³⁸ utilizaron el atelocolágeno como andamiaje (Koken Co Ltd, Tokio, Japan), un colágeno tipo I en el que se han retirado los telopéptidos, ya que los determinantes antigénicos de las cadenas de péptidos residen principalmente en la región telopeptídica. El atelocolágeno se ha utilizado en cirugía plástica y en dermatología. Los resultados de sus estudios apoyan la hipótesis de que el trasplante de condrocitos cultivados en geles de atelocolágeno son efectivos para reparar lesiones del cartílago no sólo en animales, sino también en humanos, debido a que los condrocitos mantienen el fenotipo, se reduce el riesgo de derrame o pérdida de células y existe una uniforme distribución de células en el defecto. La desventaja es que el andamiaje necesita un colgajo de periostio para su cobertura.

El ácido hialurónico es el mayor componente de la matriz del cartílago y sería una molécula ideal para las estrategias de reparación del cartílago en ingeniería tisular debido a su actividad multifuncional en la homeostasis condral. Se ha utilizado el Hyaff-11® (Fidia Advanced Biopolymers Laboratories, Abano Terme, Italy) como derivado del ácido hialurónico con un alto grado de biocompatibilidad, reabsorbiéndose totalmente en 3 meses con azúcares como subproductos.

El Hyalograft C ® (Fidia Advanced Biopolymers Laboratories, Abano Terme, Italy) es un compuesto de condrocitos que crecen en Hyaf-11 y una malla de fibras con intersticios de tamaños variables. El cartílago articular se obtiene del paciente y crece en un cultivo en dos dimensiones *in vitro*. Después, los condrocitos son transportados al andamiaje de ácido hialurónico con una densidad de un millón de células por cm² hasta 4 millones de células por cm². Al cabo de dos semanas el compuesto es implantado en la rodilla sin que, en la mayoría de los casos, se necesite fijación del injerto. Sin embargo, dependiendo del tamaño y de la localización del defecto, en alguna ocasión se ha usado pegamento de fibrina y/o suturas para mantenerlo en su lugar.

Se ha demostrado por estudios *in vitro* que los condrocitos embebidos en esta matriz mantienen su fenotipo y, por lo tanto, su capacidad para secretar proteínas y moléculas características de la matriz del cartílago hialino³⁹.

Estudios *in vivo* en animales han mostrado que los andamiajes de ácido hialurónico embebidos con condrocitos autólogos son útiles para inducir la formación de cartílago hialino con integración en el tejido articular adyacente^{79, 80}. Estudios de biocompatibilidad han demostrado la seguridad de los biomateriales que contienen Hyaff-11 ® y su capacidad para ser reabsorbidos en ausencia de una respuesta inflamatoria. El Hyalograft C ® fue introducido en el uso clínico en 1999⁴⁰. Marcacci y cols. publicaron el uso de dicho andamiaje mediante técnica quirúrgica artroscópica⁴¹.

En un reciente estudio, Ossendorf y cols.³⁴ publicaron buenos resultados con el uso de una modificación de la técnica ACI basada en injerto de condrocitos embebidos en un polímero tridimensional llamado BioSeed-C ® (material compuesto de ácido

pliglicólico, poliláctico y polidioxano). Los condrocitos autólogos cultivados y expandidos, incluidos en fibrina, son luego depositados dentro de esta matriz. BioSeed® es propiedad de Biotissue Technologies (Freiburg, Alemania) y es una matriz tridimensional estable, reabsorbible, desarrollada por ingeniería tisular y utilizada en aplicaciones ortopédicas y orales. En aquel estudio evaluaron los resultados de 40 pacientes con lesiones postraumáticas y degenerativas del cartílago articular, con un seguimiento de 2 años antes de la implantación y revisiones a los 3, 6, 12 y 24 meses después del implante. Se observó una mejoría clínica y funcional significativa y, en los estudios histológicos, la integración del injerto.

Los hallazgos sugieren que la técnica MACI con BioSeed-C® es efectiva para el tratamiento de la rodilla postraumática y degenerativa. Los autores demostraron una serie de ventajas con el uso de esta segunda generación ACI: por el uso de una matriz tridimensional los condrocitos eran retenidos más eficientemente en el lugar del defecto; y el gel de fibrina proporcionaba un ambiente favorable para que se mantuviera el fenotipo de los condrocitos. Sin embargo, los autores no dan datos sobre la densidad celular exacta por volumen ni detallan las técnicas de cultivo para la expansión de los condrocitos. En los estudios histológicos se demostró la presencia de cartílago hialino con algo de fibrocartílago, presencia de condrocitos viables y ausencia de calcificación, apoptosis, necrosis y fibrosis. Sin embargo, existían diferencias en la tinción de la matriz, lo que sugeriría que el neocartílago formado podría no ser homogéneo, con el consiguiente compromiso de sus propiedades mecánicas. El fracaso del tratamiento con esta técnica MACI-BioSeed-C® es del 2,5%, que es considerablemente más bajo que con la técnica ACI de primera generación, donde los fracasos alcanza el 5-13%. Comparadas con el uso de otras matrices como el colágeno y al ácido hialurónico, las células son mejor retenidas y, mecánicamente, más estables. Otra ventaja es que no se usa material de recubrimiento como el periostio, que sí se usaba en la técnica ACI de primera generación. El polímero da estabilidad biomecánica inicial en comparación con el uso de geles y permite la manipulación por parte del cirujano. Además, es biorreabsorbible y tiene buena compatibilidad inmunológica, siendo frecuentemente utilizado en la clínica como material de sutura (polyglactin, vicryl). En cualquier caso, se necesita mejorar en una serie de aspectos, como son los resultados a más largo plazo, tanto clínicos como biológicos; una mejor definición de la cantidad de células que se requieren; y la evaluación de los efectos de la acidosis local causados por la degradación del biomaterial.

La fibrina es una proteína relacionada con la coagulación de la sangre formada por la polimerización del fibrinógeno en presencia de trombina. La fibrina ha sido un biomaterial atractivo porque es biocompatible y biodegradable. Así, se han investigado geles de fibrina o pegamentos para la reparación del cartílago⁸¹. Sin embargo, los estudios en animales in vivo han mostrado que debido a la migración de las células el uso de la fibrina como único andamiaje para la técnica MACI es limitado. Visna y cols.⁴² han publicado el resultado a un año del tratamiento de defectos cartilagosos con el uso de pegamentos de fibrina (Tissucol®, Baxter, Austria) comparado con las técnicas de abrasión.

En nuestro estudio, usamos una combinación que proporciona las ventajas de la fibrina como proteína autóloga y las del ácido hialurónico como componente estructural

del cartílago que participa en su homeostásis. El volumen de la matriz resultante fue de 1 ml, con una densidad de 25000 células/ml. El resultado fue un gel manipulable en el que las células mantuvieron sus características fenotípicas en el tiempo. Previamente, no obstante, tuvimos que determinar las concentraciones óptimas de ácido hialurónico dentro del constructo, observando que con concentraciones de más del 20% de ácido el fenómeno de retracción del constructo resultaba evidente, haciéndole inviable para el estudio.

En el estudio de Cantú ¹¹⁷ se implantaron ADMSCs inducidas a fenotipo condrocítico y condrocitos embebidos en constructos con diferentes concentraciones de ácido hialurónico (Restylan®) y fibrina comercializada (Beriplast®), en el dorso de ratas. El autor no refirió fenómenos de retracción del constructo, ni siquiera al utilizar concentraciones de más del 50% de ácido hialurónico. Al analizar la calidad y cantidad de cartílago obtenido en las diferentes regiones del estudio observó que las células crecieron mejor en las regiones 4 y 5, en donde la concentración de ácido hialurónico era menor y la concentración de fibrina mayor. Este hecho se explicaría, según el autor, porque al añadir más fibrina al andamio de ácido hialurónico se favorece una mejor distribución espacial de las células cultivadas, lo que se traduce en una mayor producción de nichos celulares en el tejido final. En las regiones 1 y 2, donde la concentración de fibrina fue menor y la de ácido hialurónico mayor, el crecimiento de condrocitos se observó sobre la periferia del andamio. A la palpación se encontraron diferencias en la consistencia de los andamios enriquecidos con células en relación a la proporción de ácido hialurónico y fibrina, aumentando la consistencia en relación directa a la proporción de fibrina e indirectamente a la proporción de ácido hialurónico.

Los trabajos publicados en los que se utilizan andamiajes de fibrina y ácido hialurónico ^{118, 119, 120, 121, 122, 123} son muy dispares metodológicamente hablando. Si bien todos abogan como andamiaje de futuro por la composición de fibrina y ácido hialurónico, en ninguno utilizan ADMSCs inducidas. En el trabajo de Pereira y cols. ¹²⁰ se usó el gel para la inyección intraarticular en lesiones experimentales en cartílago articular de bovino. En otros, además de la fibrina y el ácido hialurónico se utilizó colágeno tipo I ^{121, 122}. En el trabajo de Chou y cols. ¹²⁴, a la fibrina y ácido hialurónico se añadió condroitín-6-sulfato.

En un metaanálisis publicado en el año 2009 ¹² se encontraron 14 estudios sobre el resultado del uso de andamiajes para la reparación del cartílago articular. De éstos, ocho incluyeron el ácido hialurónico (Hyalograft C ®) como andamiaje. Tres estudios evaluaron la técnica MACI con el uso de membranas de colágeno y, los restantes tres estudios, con el gel de colágeno tipo I, el pegamento de fibrina y el copolímero sintético.

Se ha publicado un número muy limitado de estudios prospectivos comparativos y, en la mayoría de los casos, sin grupo control. También hay estudios que comparan las diferentes técnicas MACI y otros que comparan éstas con al ACI y con las microfracturas y abrasión. Los resultados son muy dispares. En general, independientemente del tipo de andamiaje utilizado, los estudios basados en la técnica MACI ¹³⁵ no demuestran ventajas frente al ACI convencional, aunque tampoco se ha demostrado que tenga ventajas el uno sobre el otro. La tasa de infección superficial fue

del 0 al 2%, equivalente a la de los pacientes en los que se usó la técnica ACI; y no se refirieron casos de artritis séptica con el MACI, mientras que sí se informaron con la técnica ACI (0-3%). Con la técnica MACI, por otra parte, habría menos casos de artrofibrosis y fracaso del injerto, y la frecuencia de reoperaciones sería menor. Nueve de los 14 artículos presentaron resultados de segunda vista artroscópica e histológicos, informando que del 66-100% de los pacientes tenían un resultado normal o cercano al normal según la escala visual ICRS o la escala de Brittberg. Los hallazgos histológicos mostraron que la frecuencia de reparación con cartílago hialino varía del 0 al 100%. Este amplio espectro se debería a la diferencia en el número de biopsias realizadas y al tiempo en llevarlas a cabo después de la cirugía.

No hay suficiente evidencia de que la técnica MACI proporcione una distribución homogénea de las células en el defecto, que se mantenga el fenotipo condrocítico y que haya más cartílago hialino en comparación con la técnica ACI. Los estudios histológicos llevados a cabo en la técnica ACI demostraron la presencia de cuatro capas de cartílago compuestas por una cobertura perióstica fibrosa remanente, tejido transicional de reparación, tejido profundo parecido al hialino (hyaline-like) y una capa calcificada. En el estudio de Visna⁴², que empleó la técnica MACI con andamiaje de fibrina, se demostró sólo la presencia de dos capas: una de tejido hyaline-like y la capa calcificada. Esto se podría explicar porque las dos primeras capas en la técnica ACI se desarrollan como consecuencia del uso del periostio para la fijación de los condrocitos.

En una cohorte de 56 pacientes con técnica MACI, Zheng y cols.⁴³ examinaron el fenotipo de condrocitos embebidos en andamiaje de membrana de colágeno obtenidos para evaluación histológica a los 6 meses del trasplante. Los condrocitos aparecieron esféricos, bien integrados en la matriz y con fenotipo característico evidenciado por la presencia de agreganos, colágeno tipo II y la expresión de la proteína S-100. La fibrina utilizada como sellante facilitó la maduración de los condrocitos implantados.

La tercera generación ACI consistiría en desarrollar biofactores y agentes genéticos almacenados en la matriz para que, de forma programada, indujeran una respuesta condrogénica favorable e inhibieran procesos locales o sistémicos contra el injerto.

Con todo, y de forma general, el nivel metodológico de las publicaciones específicas es bajo, obligando a una interpretación cauta de los resultados. Se necesitarían más estudios y mejor diseñados para determinar si la técnica MACI es una alternativa a la ACI convencional¹².

En resumen, existe una limitada evidencia sobre la homogénea distribución de células en los diferentes andamiajes; del mismo modo que existen pocos estudios sobre el mantenimiento del fenotipo de los condrocitos en aquéllos. Ninguno de los resultados clínicos e histológicos a corto y medio plazo de estas técnicas de ingeniería tisular con andamiaje han sido mejores que la técnica convencional del trasplante de condrocitos autólogos (ACI). Sin embargo, algunos estudios sugieren que estos métodos pueden reducir el tiempo quirúrgico, la morbilidad y los riesgos de hipertrofia perióstica y de adherencias postoperatorias. No obstante y a modo de conclusión, en el metaanálisis de

Iwasa y cols.¹² no se recomienda actualmente el uso de las técnicas de trasplante de condrocitos con andamiaje para uso clínico, precisándose más estudios randomizados y ensayos clínicos con períodos de seguimiento largos para recomendar el uso de la ingeniería tisular para el tratamiento de los defectos del cartílago.

En nuestro estudio demostramos que la proliferación de ADMSCs inducidas a estirpe condrocítica es estadísticamente significativa a las 4 semanas de cultivo en un andamiaje de fibrina y ácido hialurónico en concentraciones del 0,5 y 20% con respecto a las dos semanas de cultivo y al mismo andamiaje con condrocitos articulares, estos proliferaron menos. Además histológicamente se mantenía el fenotipo condrocítico a las 8 semanas de cultivo. Como en el artículo de Iwasa¹² no podemos recomendar el uso clínico de este compuesto, tampoco es el objetivo de este estudio, pero sí podemos apoyar los resultados de otros autores en cuanto al uso de la fibrina y el ácido hialurónico como andamiaje del futuro^{117, 118, 119, 123}.

Lee y cols.⁹⁶ han investigado la posibilidad de utilizar una inyección articular de células madre mesenquimales suspendidas en ácido hialurónico como alternativa a las técnicas invasivas actuales creando un defecto condral sin afectación del hueso subcondral en el cóndilo femoral medial de cerdos. Se obtuvieron células madres de la médula ósea de cresta iliaca y se embebieron en Synvisc®, inyectándose intraarticularmente. El grupo tratado mostró curación histológica y morfológica del cartilago entre las 6 y las 12 semanas en comparación con el grupo control. Siendo este el primer trabajo publicado sobre la regeneración de defectos condrales graves mediante la inyección intraarticular de células mesenquimales, sus resultados fueron significativos en el sentido de proponer el uso de células madre mesenquimales frente a los condrocitos diferenciados.

Han aparecido estudios sobre el uso de andamiajes aislados, sin células madre mesenquimales, para el tratamiento de los defectos condrales. Kon y cols.⁹⁷ trataron así a un paciente de 46 años con una lesión degenerativa del cartílago grado 4 según la escala ICRS, realizándole una osteotomía valguizante y el implante de un nanocompuesto y un andamiaje previamente al fresado de 9 mm de hueso subcondral. El nanocompuesto era una estructura porosa de 3 capas que simulaba la anatomía osteocondral con una capa cartilaginosa de colágeno tipo I, otra intermedia tide-mark con colágeno tipo I e hidroxiapatita y una tercera capa mineralizada con colágeno tipo I e hidroxiapatita. El paciente quedó libre de dolor y mediante resonancia magnética se apreció la formación de cartílago hialino-like. Considerando que el resultado fue obtenido usando un andamiaje libre de células, es probable que el precursor mesenquimal residente en el hueso subcondral se introdujera en el material, lo que también demostraría la potencialidad de las células madre mesenquimales de la médula ósea.

En el trabajo de Toghraie y cols.⁹⁵ se discutió sobre la necesidad o no de utilizar andamiajes. Utilizaron células madre derivadas de la grasa infrapatelar que inyectaron intraarticularmente sin andamiajes. Previamente seccionaron el ligamento cruzado anterior de la rodilla a conejos demostrando radiográficamente el desarrollo de cambios artrósicos al cabo de 12 semanas. Los conejos que recibieron células mesenquimales procedentes de la grasa infrapatelar inyectadas intraarticularmente mostraron menor

grado de degeneración del cartílago, formación de osteofitos y esclerosis subcondral que en el grupo control a las 20 semanas postcirugía. La calidad del cartílago fue significativamente mejor en el grupo tratado con células que en control. La cantidad de células inyectadas fue de aproximadamente un millón, suspendidas en 1 ml de medio de cultivo.

3. ORIGEN DE LAS CÉLULAS: CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE LA MÉDULA ÓSEA (BMMSCs) FRENTE A CÉLULAS MESENQUIMALES DERIVADAS DE LA GRASA (ADMSCs)

El futuro en el campo que tratamos se basa en el uso de técnicas de ingeniería tisular que produzcan células que, combinadas con factores de crecimiento y terapia génica, se introduzcan en andamiajes. Desafortunadamente este esfuerzo no ha sido apoyado por estudios apropiados o suficientes.

La investigación actual en el campo de la biomedicina pretende el desarrollo de procedimientos cada vez menos invasivos que reduzcan la morbilidad y promuevan una rápida recuperación funcional de los pacientes, lo que podría derivar en una reducción de los costes de los actuales tratamientos médicos. Debido a esto y a las limitaciones asociadas a los tipos de injertos disponibles en la actualidad, en los últimos años la terapia celular y la ingeniería tisular han adquirido una gran importancia en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la resolución de patologías del tejido cartilaginoso.

Una de las alternativas más prometedoras para el tratamiento de las alteraciones del cartílago se centra en la utilización de células de naturaleza mesenquimal, como ya hemos apuntado previamente. Desde que Phemister, en 1947, utilizara la inyección de células madre mesenquimales de médula ósea (BMMSCs) en pacientes con pseudoartrosis⁹⁹ y, en las décadas posteriores, Burwell definiera la capacidad regenerativa de la médula ósea de la cresta iliaca¹⁰⁰, el implante de células mesenquimales para el tratamiento de diferentes tipos de lesiones ha ido adquiriendo cada vez más importancia.

Posteriormente en otras publicaciones se demostraría que las BMMSCs tienen el potencial para diferenciarse a células específicas de tejidos mesenquimales como el hueso y el cartílago cuando son implantadas in vivo^{24, 25} y también a adipocitos, neurocitos y hepatocitos^{26,27}.

Se ha demostrado que las BMMSCs pueden migrar e injertarse en múltiples tejidos musculoesqueléticos, especialmente en los lugares dañados, donde ocurriría la diferenciación específica. El mecanismo exacto que guía a estas células es desconocido. Las células secretan un amplio espectro de moléculas bioactivas que tienen actividad inmunorregulatoria y regenerativa, es decir, una actividad trófica además de la antiinflamatoria e inmunosupresora.

Wakitani y cols.²⁸ realizaron trasplantes de BMMSCs en defectos osteocartilaginosos en conejos esperando que las células pudieran regenerar el hueso y el cartílago. Introdujeron células progenitoras procedentes del periostio de huesos largos y de la médula ósea en un gel de colágeno en grandes defectos osteocondrales (3 x 6 x 3 mm) en la superficie de carga del cóndilo medial de la rodilla de los conejos. En la otra rodilla se creó un defecto de las mismas características, dejándolo vacío o rellenándolo de un gel de colágeno acelular. Los trasplantes se estudiaron hasta los 6 meses después de la cirugía, comprobándose que ya desde las 2 semanas los defectos se

rellenaban de cartílago. A las 4 semanas la zona más profunda estaba reemplazada por hueso y a las 24 semanas el hueso subcondral estaba totalmente reparado.

Realizados estos experimentos en conejos se pensó que la técnica podría ser aplicada en humanos²⁹. El experimento se llevó a cabo en dos pacientes con dolor en la rodilla que no mejoraba con tratamiento conservador, realizándose el trasplante de células mesenquimales de médula ósea procedente de la cresta iliaca. Las células fueron expandidas y embebidas en un gel de colágeno y se trasplantaron al defecto articular en la patela, cubriéndose con periostio autólogo. Seis meses después del trasplante los pacientes habían mejorado clínicamente y la mejoría persistió hasta los 9 años, mostrándose ambos pacientes satisfechos con el tratamiento.

También se han utilizado células mesenquimales de médula ósea en pacientes con artrosis de rodilla³⁰. Se trasplantaron células mesenquimales embebidas en gel de colágeno en defectos condrales en el cóndilo femoral medial. Se realizó abrasión del hueso subcondral y se trasplantó dicho gel cubriéndolo con periostio autólogo de la superficie anteromedial de la tibia. Aunque la mejoría clínica no fue diferente significativamente hablando entre el grupo trasplantado y el control, sí se observó cobertura de los defectos por fibrocartílago y metacromasia. Como a los 64 meses no había mejoría clínica entre ambos grupos, los autores postularon que el trasplante de células mesenquimales de la médula ósea no sería efectivo en la rodilla artrósica debido al ambiente inflamatorio o a la edad elevada de los pacientes.

En general, el uso de células mesenquimales de médula ósea proporciona un tejido de reparación que no es cartílago hialino, aunque la mejoría clínica es evidente. Para regenerar cartílago articular mediante trasplante celular es esencial que las células proliferen sin perder la capacidad de diferenciación¹⁴.

Los problemas potenciales del uso de células mesenquimales de médula ósea son la posibilidad de degeneración tumoral, la de transmitir enfermedades tales como la encefalopatía espongiiforme bovina por el uso de proteínas xenogénicas para los cultivos de las células, y el coste excesivo de las técnicas¹⁴.

Otros investigadores han utilizado otro tipo de células para formar cartílago hialino. Células progenitoras osteocondrales o células mesenquimales pluripotenciales parecen existir en muchas clases de tejidos, como es el sinovial, el muscular o el adiposo¹⁴, y son relativamente fáciles de obtener. Parece ser que las células sinoviales tienen la mejor capacidad para diferenciarse a cartílago³¹. Las mesenquimales derivadas de la grasa son interminables³² puesto que el exceso de grasa de la población hace fácil la obtención de gran cantidad de células mesenquimales derivadas de este tejido. También se han utilizado células mesenquimales derivadas del músculo junto con proteína morfogenética (BMP-2), y células embrionarias para la reparación de defectos cartilaginosos, aunque estas últimas son difíciles de diferenciar exclusivamente a condrocitos¹⁴. En una reciente publicación¹³¹, se comparan células mesenquimales derivadas de la placenta humana (HPMSCs) con las BMMSCs embebidas y cultivadas en matrices tridimensionales de alginato, comprobándose una mayor producción de glucosaminoglicanos y colágeno tipo II con el uso de HPMSCs, lo que las haría más recomendables para su uso.

Eriksson y cols.⁹³ fueron los primeros que demostraron que las células mesenquimales derivadas del tejido adiposo humano (grasa subcutánea) poseían la capacidad para sintetizar proteínas de la matriz del cartílago cuando se cultivaban en ambientes tridimensionales y en presencia de TGF β y dexametasona. También hicieron notar que estas células representaban una población no homogénea conteniendo pequeñas cantidades de pericitos, células endoteliales y pequeñas células musculares. Las células mesenquimales fueron aisladas del tejido adiposo subcutáneo humano obtenido por liposucción y fueron expandidas *in vitro*. Las células mesenquimales sintetizaron abundantes moléculas de la matriz cartilaginosa, como colágeno tipo II, VI y condroitín 4-sulfato. Los autores también implantaron discos de células mesenquimales derivadas de la grasa en el tejido subcutáneo del dorso de ratones observándose tinciones positivas para colágeno tipo II, colágeno tipo VI y 2B6 epítipo del agregano. Concluyeron que el TGF β era un factor clave en la regulación de la proliferación celular y la diferenciación. Este factor se ha encontrado en altas concentraciones en el cartílago embrionario y puede conducir a la diferenciación condrogénica. En nuestro trabajo, la concentración de TGF β utilizada para el cultivo de condrocitos derivados del cartílago articular y para la inducción de ADMSCs fue de 10 ng/ml. También comprobaron que el incremento de concentraciones de proteoglicanos extracelulares causaban una reducción en la tasa de síntesis de proteoglicanos por los condrocitos a través de un mecanismo de feedback en el que estaba implicado el receptor CD44 del ácido hialurónico.

La grasa infrapatelar de la rodilla es una estructura heterogénea y fibrosa que difiere significativamente de los tejidos obtenidos de liposucción. Algunos cirujanos la extirpan durante la prótesis de rodilla tratando de prevenir la artrofibrosis. Otros piensan que es una estructura crucial en la rodilla y que se debe respetar. Sin embargo, no hay evidencia al respecto y todo es experiencia clínica. El estudio histológico con hematoxilina eosina indica que gran cantidad de la grasa es tejido colágeno denso y que también contiene pericitos, células endoteliales y células musculares ligeras. Un análisis de los marcadores de superficie de las células indica un perfil similar a las células multipotenciales aisladas de la médula ósea o del tejido adiposo subcutáneo. En general, la población de estos tejidos comparte las mismas moléculas de adhesión y receptores. Tres de estos marcadores comunes, el CD105, el CD106 y el CD166, se han usado para definir la población de médula ósea llamada células mesenquimales que son capaces de adipogénesis, condrogénesis y osteogénesis. En contraste, no se identificaron marcadores de la línea hematopoyética, como el CD14, el CD34 y el CD45. Sin embargo, el perfil de las proteínas de superficie no es idéntica a la de la grasa subcutánea o de la médula ósea y esta diferencia puede reflejar un significativo número de fibroblastos dada la cantidad de tejido conectivo denso en esta grasa. También se han observado sinoviocitos, que se interpretan porque la grasa se ancla en la membrana sinovial de la rodilla.

En el estudio de Wickham y cols.⁹⁴ se demostró que la grasa infrapatelar de las rodillas adultas contenía células progenitoras con la capacidad para diferenciarse a condrocitos, osteoblastos o adipocitos bajo apropiadas condiciones de cultivo. Usando condiciones de cultivo definidas, las células mesenquimales derivadas de la grasa se diferenciaban a células con fenotipo característico de condrocitos que sintetizaban moléculas de la matriz del cartílago, adipocitos con vacuolas lipídicas y leptina u

osteoblastos formando tejido mineralizado. En su trabajo, obtuvieron grasa procedente de las intervenciones para artroplastia de rodilla y usaron técnicas de citometría de flujo e inmunohistoquímicas. La evidencia de condrogénesis fue evaluada basándose en la detección inmunohistoquímica de proteínas de la matriz cartilaginosa, incluyendo colágeno tipo I, II VI y X y condroitín 4 sulfato.

El uso de células mesenquimales derivadas del tejido graso (ADMSCs), presenta ventajas técnicas con respecto a las de origen de médula ósea. Para obtener células madre en médula ósea se debe realizar una biopsia de médula ósea, que es un proceso doloroso tanto durante la fase quirúrgica como en el postoperatorio, y que puede dar complicaciones de la zona dadora. Además, el número de células que se obtiene es limitado ¹⁰¹. Sin embargo, el tejido adiposo está localizado en zonas superficiales accesibles, con lo que el proceso de obtención es técnicamente sencillo y requiere mínima incisión quirúrgica con anestésico local. Esto nos permite extraer el tejido necesario para obtener un buen número de células madre ^{101, 132, 133}.

Parece que no existen diferencias significativas entre las ADMSCs y las BMMSCs en cuanto a rendimiento de células adherentes, cinética de crecimiento, senescencia celular y capacidad de diferenciación ¹⁰². Sin embargo, existen investigaciones recientes que afirman que a partir del tejido adiposo se obtiene un mayor número de células madre mesenquimales y con mayor capacidad proliferativa que las aisladas de médula ósea ¹⁰³. No obstante, trabajos actuales ¹³⁰ sugieren que ambos tipos celulares tienen un comportamiento similar tanto en presencia como en ausencia de TGF β , por lo que serían igualmente válidas para ser utilizadas en ingeniería tisular.

Se ha demostrado que las ADMSCs son capaces de adquirir fenotipos de hueso, cartílago, grasa o miocardio, además de piel y neuronas. Esta capacidad de diferenciación va a depender de la constitución de determinados microambientes mediante la adición *in vitro* de determinados factores de crecimiento y proteínas. Debido a su potencialidad, ya existen multitud de estudios previos en los que se ha conseguido, *in vitro*, la obtención de células óseas a partir de poblaciones de ADMSCs ^{104, 105}.

En un estudio previo al actual ¹²⁵, realizado por nuestro equipo, en una fase inicial obtuvimos células troncales mesenquimales derivadas de la grasa de la cola de ovejas raza Asaaf. Posteriormente las procesamos e, *in vitro*, las diferenciamos a células con fenotipo osteogénico que finalmente implantamos en un defecto óseo cavitario practicado en el fémur de la oveja. Como osteoinductor utilizamos el plasma rico en plaquetas y como osteoconductor heteroinjerto bovino de hueso liofilizado. Llegamos a la conclusión de que la diferenciación de células troncales derivadas de la grasa (ADMSC) antes de su implante favorece la regeneración ósea de defectos cavitarios en el fémur de la oveja Asaaf. Sin embargo, cuando se implantan conjuntamente con plasma rico en plaquetas (PRP) y heteroinjerto la respuesta no es mayor, pudiendo incluso dificultar la incorporación del heteroinjerto. Con estos precedentes, diseñamos el actual estudio, diferenciando ADMSCs de la grasa infrapatelar de la rodilla humana a condrocitos, cultivándolos *in vitro* en un compuesto de fibrina y ácido hialurónico.

Una segunda fase consistirá en implantar esos constructos en defectos condrales animales y así poder comprobar la cantidad y calidad de cartílago formado.

Nuestro trabajo carece de estudios inmunohistoquímicos, pero aporta estudios histológicos en los que se demuestra la diferenciación condrocítica mantenida durante 8 semanas de ADMSCs inducidas embebidas en matrices de fibrina y ácido hialurónico a diferentes concentraciones. Que estas células madre derivadas de la grasa infrapatelar fueran obtenidas de población envejecida (68+-11) sugiere que la multipotencialidad de las células continúa en estados avanzados de la vida. Los estudios en tejido graso subcutáneo se han hecho en pacientes con una media de 40 años de edad. Nuestro trabajo indica que la grasa infrapatelar de las rodillas adultas es una fuente con potencial multilinaje, similar a aquellas células derivadas de la médula ósea o del tejido adiposo subcutáneo.

4. DISCUSIÓN SOBRE EL MÉTODO Y RESULTADOS

Desde que en el año 2001 los estudios de Zuk y su equipo demostraran la presencia de células madre mesenquimales multipotentes en el tejido adiposo^{106, 104}, éste se ha convertido en el centro de atención de los investigadores y especialistas clínicos que buscan una alternativa a la médula ósea como fuente de células madre para técnicas de ingeniería tisular. Los depósitos subcutáneos de tejido adiposo son abundantes, accesibles y renovables, por lo que suponen una reserva potencial de células madre adultas en cada individuo¹⁰⁷.

Los protocolos de aislamiento, cultivo y diferenciación utilizados por la mayoría de los grupos de investigación que trabajan con ADMSCs se basan en los publicados por Zuk y su equipo en los años 2001¹⁰⁴ y 2002¹⁰⁶. En cada estudio, sin embargo, el protocolo estándar es ligeramente diferente. Se introducen variables como la concentración de colagenasa^{108, 109, 110}, la agitación de las muestras^{110, 111, 112}, su filtración¹¹⁰ o, incluso, se omiten datos fundamentales como la temperatura de transporte o el tiempo transcurrido hasta el procesamiento de la muestra^{108, 109, 110, 111, 112}. Las variaciones pueden llevar a diferentes rendimientos celulares y a alterar los resultados alcanzados por los diferentes equipos, lo que pone en evidencia la necesidad de definir las condiciones óptimas de aislamiento de ADMSCs para poder utilizar protocolos estandarizados cuyos resultados sean comparables.

En cuanto a la temperatura de preservación de las muestras hasta su procesamiento, generalmente se asume que la preservación en frío ralentiza el metabolismo celular y que, por lo tanto, retrasa la muerte de las células tras la extracción de las biopsias. En un estudio realizado por Matsumoto en 2007, esta teoría se vio corroborada mediante la comparación de los rendimientos celulares obtenidos a partir de lipoaspirado humano preservado a 4° C, - 80° C y temperatura ambiente durante periodos de tiempo que iban desde 1 hora hasta 1 mes¹¹³.

En nuestros experimentos, sin embargo, se obtuvieron mayores rendimientos celulares tras la digestión de las muestras preservadas a temperatura ambiente que con las conservadas en condiciones de hipotermia, si bien es cierto que en ningún caso el tiempo que transcurrió desde la toma de la biopsia hasta su procesamiento superó las 8 horas y que, al contrario que en el estudio de Matsumoto¹¹³, las muestras de tejido graso fueron extraídas mediante resección quirúrgica y no por liposucción. La preservación en frío de los fragmentos grasos podría llevar al endurecimiento de los mismos dificultando así la posterior digestión enzimática.

En lo referente a la digestión del tejido adiposo, aunque las condiciones generales para el aislamiento de ADMSCs empleadas en la mayoría de las publicaciones derivan del protocolo original desarrollado por Zuk en 2001¹⁰⁴, diferentes investigadores han introducido pequeñas variables^{108, 109, 110, 111, 112} que, según nuestros resultados, afectan considerablemente al número de ADMSCs aisladas. Entre ellas, la agitación magnética durante la digestión y el filtrado de la solución obtenida, siendo ambos procedimientos contraproducentes a la hora de tratar de obtener mayores rendimientos celulares.

La agitación magnética durante la digestión enzimática resultó ser una técnica agresiva que dañaba las membranas celulares disminuyendo la viabilidad de las células presentes en la muestra. La filtración permitió retirar los restos de tejido sin digerir, pero en el filtro también quedaron atrapadas gran cantidad de células, por lo que en todos los casos se obtuvieron mayores rendimientos celulares a partir de las muestras no filtradas.

Tras el aislamiento de la población de ADMSCs presentes en el tejido graso, el establecimiento del cultivo primario difiere en la bibliografía consultada en lo referente a la densidad de siembra, que puede oscilar desde las $3,5 \times 10^3$ células/cm² ¹¹⁴, hasta las 1×10^6 células/cm² ¹⁰⁴, y el tamaño de la superficie plástica sobre la que ésta se lleva a cabo, que puede oscilar entre los 2 cm² y los 225 cm² ¹¹⁵.

La densidad de siembra del cultivo primario resultó ser un factor clave a la hora de obtener cultivos celulares viables. Densidades de siembra iniciales de 3×10^4 células/cm² en pocillos de 2 cm² fueron lo suficientemente altas como para asegurar el cultivo primario, dado que, según nuestra experiencia, densidades de siembra menores a la citada pueden ser demasiado bajas como para que los cultivos lleguen al estado de preconfluencia en un tiempo menor a 15 días, lo cual puede llevar a la pérdida del cultivo.

Además, esta densidad de siembra inicial permite obtener tasas de expansión medias de 4 veces el número de células original en el cultivo primario, y 20 veces tras el subcultivo de las células a una densidad de 5×10^3 células/cm². Esto permite obtener gran cantidad de células en pases tempranos, lo cual es fundamental a la hora de diseñar nuevas estrategias terapéuticas en el campo de la ingeniería tisular, dado que se requiere un elevado número de células. El subcultivo prolongado de las poblaciones celulares no es recomendable debido a la posibilidad de transformación de las células.

Una de las características que las células deben cumplir para ser consideradas células madre mesenquimales según las recomendaciones de la Sociedad Internacional de Investigación con Células Madre (ISSCR) es que sean capaces de diferenciarse, al menos, hacia células de tipo óseo, cartilaginoso y adipocítico ¹¹⁶. Bajo condiciones de cultivo específicas, las poblaciones celulares aisladas mediante el método descrito son capaces de mostrar características específicas de las células óseas (mineralización de la matriz extracelular), adiposas (acumulación intracelular de lípidos) y cartilaginosa (morfología condrocítica y síntesis de proteoglicanos ácidos). En nuestro trabajo, en todos los casos estudiados las poblaciones celulares mostraron su capacidad de diferenciación hacia diferentes estirpes celulares tras la expansión in vitro y cultivo en medio específico.

Cuantificamos la proliferación celular en los andamiajes con diferentes concentraciones de ácido hialurónico a las 2 y 4 semanas, observando diferencias significativas en cuanto a la proliferación de ADMSCs inducidas entre las 2 y las 4 semanas y entre los andamiajes de condrocitos y ADMSCs inducidas a las 4 semanas. Podemos explicar este fenómeno por la mayor capacidad de diferenciación y crecimiento de las ADMSCs inducidas a lo largo del tiempo en comparación con los condrocitos, perfilándose como población de origen en técnicas de ingeniería tisular a la hora de fabricar andamiajes.

En el trabajo de Cantú ¹¹⁷, el más parecido metodológicamente hablando al nuestro, no se cuantifica la proliferación celular en el constructo. Sin embargo, sí se utilizan técnicas de inmunohistoquímica e histológicas llegando a la conclusión de que el tejido formado tras su implantación en el dorso de las ratas es fibrocartílago debido a la alta presencia de colágeno tipo I. También refiere que a mayor concentración de ácido hialurónico el crecimiento celular era menor tanto para las ADMSCs inducidas como para los condrocitos articulares. En el trabajo de Park y cols. ¹¹⁹, el contenido de glucosaminoglicanos a las 4 semanas fue más elevado en el constructo de fibrina/ácido hialurónico que en los de fibrina sólo.

Según Rampichová y cols. ¹¹⁸, la calidad del tejido de reparación es dependiente de la concentración de condrocitos en el constructo. Nuestros resultados apoyarían la tesis de que un constructo fibrina/ácido hialurónico con concentraciones del 5% al 20% y embebidos con ADMSCs inducidas sería el ideal para los procesos de reparación del cartílago y estaría en consonancia con los trabajos analizados.

En cuanto a nuestros resultados histológicos, a pesar de no utilizar técnicas cuantitativas inmunohistoquímicas, demostramos ausencia de diferenciación condrocítica en los constructos con ADMSCs no inducidas. Las células siguieron manteniendo su aspecto fusiforme original fuera cuál fuera la concentración de ácido hialurónico y el tiempo transcurrido. Sin embargo la matriz extracelular se tiñó, aunque débilmente, de azul. El hecho se explicaría por el ambiente tridimensional que favorecería la producción de glucosaminoglicanos, aunque la célula no esté completamente diferenciada. A las 8 semanas de estudio, las ADMSCs no inducidas siguieron manteniendo morfología fibroblástica. Los condrocitos y las ADMSCs inducidas mostraron núcleos redondeados y aparecieron embebidas en lagunas dentro de una matriz que presentaba una coloración azul intensa. Esta coloración era subjetivamente más intensa cuanto mayor era la concentración de ácido hialurónico, lo que estaría de acuerdo con las conclusiones de Park ¹¹⁹ en cuanto a una relación directa entre la cantidad de glucosaminoglicanos y la concentración de ácido hialurónico.

Los resultados cuantitativos e histológicos de nuestro estudio apuntan a que los constructos de fibrina y ácido hialurónico a concentraciones no superiores al 20% con una población celular de ADMSCs inducidas a diferenciación condrocítica podría tener utilidad en el tratamiento de las lesiones condrales. Estudios experimentales en animales y, posteriormente, clínicos, deberían continuar y complementar este trabajo.

CONCLUSIONES

OBJETIVO ESPECÍFICO 1: Aislar y cultivar el componente celular del cartílago articular.

CONCLUSIÓN 1: Es posible aislar y cultivar condrocitos derivados del cartílago articular mediante técnicas de digestión mecánica y enzimática.

OBJETIVO ESPECÍFICO 2: Aislar y cultivar las células madre mesenquimales del tejido adiposo infrapatelar (grasa de Hoffa).

CONCLUSIÓN 2: Es posible aislar y cultivar células madre mesenquimales derivadas de la grasa de Hoffa mediante técnicas de digestión mecánica y enzimática.

OBJETIVO ESPECÍFICO 3: Definir las condiciones óptimas para el cultivo primario de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo infrapatelar.

CONCLUSIÓN 3: Las condiciones óptimas para el cultivo primario de las células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo son: preservación de las muestras a temperatura ambiente, digestión con colagenasa tipo I a una concentración de 2 mg/ml, sin agitación magnética durante la digestión enzimática y sin filtrado posterior, con una densidad de siembra de 30.000 células/cm², incubación a 37°C y al 5% de CO₂ en una atmósfera con el 95% de humedad.

OBJETIVO ESPECÍFICO 4: Cultivar ambas poblaciones celulares en un hidrogel tridimensional de fibrina y ácido hialurónico a diferentes concentraciones mediante la adición de los suplementos nutricionales específicos, según el caso.

CONCLUSIÓN 4: Es posible cultivar condrocitos derivados del cartílago articular y células madre mesenquimales derivadas de la grasa de Hoffa diferenciadas a fenotipo condrocítico embebidas en una hidrogel tridimensional de fibrina y ácido hialurónico mediante la adición de suplementos nutricionales y factores de crecimiento específicos.

OBJETIVO ESPECÍFICO 5: Evaluar la morfología y las tasas de crecimiento de cada tipo celular durante el cultivo *in vitro*.

CONCLUSIÓN 5: La proliferación de células madre mesenquimales inducidas derivadas de la grasa de Hoffa embebidas en matrices de fibrina autóloga y ácido hialurónico a concentraciones de 0%, 5% y 20% es significativamente mayor en comparación con la de condrocitos derivados del cartílago articular a las 4 semanas de

cultivo. Al cabo de 8 semanas de cultivo ambos grupos celulares mantienen su fenotipo condrocítico.

OBJETIVO PRINCIPAL: Comparar la funcionalidad (proliferación celular y mantenimiento del fenotipo condrocítico) de las poblaciones celulares obtenidas durante el cultivo tridimensional en gel de fibrina y ácido hialurónico de condrocitos articulares y células madre de tejido adiposo diferenciadas a fenotipo condrocítico y deducir de ello un sustitutivo biológico para la estructura del cartílago.

CONCLUSIÓN 6: La buena funcionalidad de los condrocitos derivados del cartílago articular y de las células madre mesenquimales derivadas de la grasa de Hoffa diferenciadas a fenotipo condrocítico cuando son embebidos en matrices de fibrina autóloga y ácido hialurónico a concentraciones de 0%, 5% y 20%, supone que esas combinaciones sean un buen sustitutivo biológico para la estructura del cartílago y merecen ser la base sobre la que continuar nuevas investigaciones clínicas con el fin último de la reparación condral.

CONCLUSIÓN 7: La grasa infrapatelar de las rodillas adultas es una fuente de células madre con potencial de diferenciación a otras estirpes celulares, similar a las células derivadas de la médula ósea o del tejido adiposo subcutáneo. Que estas células madre derivadas de la grasa infrapatelar fueran obtenidas de población envejecida sugiere que su multipotencialidad continúa en estados avanzados de la vida.

ANEXOS



C/ Altos de Nava, s/n – 24071 LEÓN
Tel: 987 23 74 00. Fax: 987 23 33 22



DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA DONACIÓN DE TEJIDOS DESECHADOS DURANTE EL IMPLANTE DE UNA PRÓTESIS ARTICULAR DEL MIEMBRO INFERIOR

FINALIDAD

Obtención de restos tisulares osteo-condrales para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dentro del campo de la Cirugía Ortopédica y Traumatología. Los resultados de esta Investigación Biomédica ayudarán a mejorar el abordaje de determinadas patologías del sistema músculo-esquelético.

DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

Los restos tisulares donados van a ser sometidos a un procesamiento que consistirá en las siguientes fases:

- Dentro del proceso de asistencia hospitalaria se realizará la recogida de los restos tisulares, siempre por profesionales debidamente cualificados, bajo condiciones de asepsia.
- Custodia de las muestras de tejido osteo-condral, a fin de ponerlas a disposición del personal investigador del Establecimiento de Tejidos Humanos de la Fundación Clínica San Francisco de León, para el desarrollo de proyectos amparados bajo los principios éticos y legales definidos por la legislación vigente en cuanto a Investigación Biomédica (Ley 14/2007).

OTRAS CONSIDERACIONES

- Toda la información referente al donante quedará registrada en los ficheros del Establecimiento de Tejidos de la Fundación Clínica San Francisco de León. Esta será debidamente codificada, de tal forma que la identidad del donante quedará protegida tal y como establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 15/1999).
- El donante no recibirá ninguna compensación económica o de otro tipo por las muestras donadas y, éstas a su vez, no tendrán valor comercial. No obstante, la información generada a partir de los estudios realizados sobre las muestras podría ser fuente de beneficios comerciales. En tal caso, están previstos mecanismos para que estos beneficios reviertan en la salud de la población.
- En todo momento el donante se encuentra bajo el derecho de revocar el presente consentimiento, así como también solicitar la exclusión de sus muestras tisulares del presente estudio, procediéndose a la destrucción de las mismas. Dicha revocación no supondrá perjuicio alguno para el donante.



Anexo 1. Anverso del consentimiento informado para la donación de muestras.

C/ Altos de Nava, s/n – 24071 LEÓN
Tel: 987 23 74 00. Fax: 987 23 33 22

DECLARACIONES Y FIRMAS

DON/DOÑA:	
FECHA DE NACIMIENTO	D.N.I.
DOMICILIO	

DON/DOÑA	
FECHA DE NACIMIENTO	D.N.I.
DOMICILIO	
EN CALIDAD DE (representante legal, familia o allegado)	
DE (nombre y apellidos del paciente)	

DECLARO

- Conocer que durante la intervención para el implante de una prótesis articular del miembro inferior, parte de los restos tisulares desechados serán recogidos con fines de investigación biomédica, sin que ello influya en los resultados de la intervención ni el tiempo quirúrgico.
- Conocer el lugar de obtención y depósito de dichos restos tisulares, así como la finalidad a la que van dirigidos.
- Saber que el hecho de la donación de las muestras es un acto totalmente voluntario.
- Estar informado de que tanto las muestras como los datos serán manejados bajo el principio de confidencialidad.
- Conocer que en cualquier momento puedo revocar el presente consentimiento.
- Haber comprendido todas las explicaciones que se han facilitado en un lenguaje claro y sencillo, y que el facultativo que me ha atendido me ha permitido realizar todas las observaciones y ha aclarado todas las dudas que he planteado.

Por ello, manifiesto que estando satisfecho con la información recibida y **CONSIENTO** la donación de parte de los tejidos desechados (cartilago y grasa) con la finalidad de que éstos sean utilizados con fines científicos

EN (lugar):	-	-
FECHA:		

Fdo. (EL MÉDICO)	Fdo. (EL PACIENTE)
------------------	--------------------

*Ingeniería Tisular Aplicada a la Regeneración del Cartílago Articular:
Condrocitos Articulares frente a Células Madre de Tejido Adiposo.*

Fecha		
Información del donante	Espacio reservado para pegatina	
Muestra <input type="checkbox"/> Cartílago Articular	Hora de recogida	
	Condiciones de preservación	
Muestra <input type="checkbox"/> Grasa Hoffa	Hora de recogida	
	Condiciones de preservación	
Observaciones		

Anexo 2. *Formulario empleado para el control de las muestras.*

BIBLIOGRAFÍA

1. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohissson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994;331:889-95.
2. Hunt SA, Jazrawi LM, Sherman OH. Arthroscopic management of osteoarthritis of the knee. *J Am Acad Orthop Surg* 2002;10:356-63.
3. Jackson RW, Gilbert JE, Sharkey PF. Arthroscopic debridement versus arthroplasty in the osteoarthritic knee. *J Arthroplasty* 1997;12:465-70.
4. Proubasta I, Rodríguez A. Artrosis de rodilla. Tratamiento medicoquirúrgico. Publicaciones Permanyer. Barcelona. 2007.
5. Thonar MA, Masuda K, Manicourt DH, Kuettner KE. Structure and function of normal adult cartilage. *Osteoarthritis:clinical and experimental aspects*. Springer-Verlag. Berlín 1999.
6. Chevalier X, Richette, P. Cartílago articular normal: anatomía, fisiología, metabolismo y envejecimiento. EMC (Elsevier SAS), Aparato locomotor. París, 2005.
7. Langman J. Embriología Médica. Editorial médica panamericana. México, 1981.
8. Hangody L, Kish G, Karpaty Z. Mosaicoplasty for the treatment of articular cartilage defects: application in clinical practice, a preliminary report. *J Bone Joint Surg Br* 1997;23(3):53-60.
9. Pérez-Caballer A. Mosaicoplastia. Injertos, sustitutos óseos y materiales en la cirugía reconstructiva del aparato locomotor. Curso básico de la Fundación Secot. 2005.
10. Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1993;75: 532-554.
11. Kock N, Van Susante J, Wymenga A, Buma P. Histological evaluation of mosaicplasty of the femoral condyle-retrieval specimens obtained after total knee arthroplasty- a case report. *Acta Orthop Scand* 2004;75(4):505-508.
12. Iwasa J, Engebretsen L, Shima Y, Ochi M. Clinical application of scaffolds for cartilage tissue engineering. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009; 17:561-577.
13. Poole R, Kojima T, Yasuda R, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage. A template for tissue repair. *Clin Orthop* 2001;391S:26-33.
14. Wakitani S, Kawaguchi A, Tokuhara Y, Takaoka K. Present status of and future direction for articular cartilage repair. *J Bone Miner Metab* 2008;26:15-122.

15. Hunter W. Of the structure and disease of articular cartilages. *Philos Trans Lond* 1743;42:514-521.
16. Matusue Y, Yamamuro T, Hama H. Arthroscopy multiple osteochondral transplantation to the condral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption. *Arthroscopy* 1993;9:318-321.
17. Chesterman P, Smith A. Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes. *J Bone Joint Surg (Br)* 1968;50:184-197.
18. Wakitani S, Kimura T, Hirooka A, Ochi T, Yoneda M, Yasui N, Owaki H, Ono K. Repair of rabbit articular surfaces with allograft chondrocytes embedded in collagen gel. *J Bone Joint Surg (Br)* 1989;71:74-80.
19. Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, Maeda A, Caplan A, Shino K, Ochi T. Articular cartilage repair. Rabbit experiments with collagen gel-biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand* 1998;69:56-62.
20. Grande D, Pitman M, Peterson L, Menche D, Klein M. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res* 1989;7:208-218.
21. 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;85:185-192.
22. Bentley B, Biant L, Carrington R, Akmal M, Goldberg M, William A, Skinner J, Pringle J. A prospective randomized comparison of autologous chondrocyte implantation versus mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg (Br)* 2003;85:223-230.
23. Knutsen G, Engebretsen L, Ludvigsen T, Drogset J, Grontvedt T, Solheim E, Strand T, Roberts S., Isaksen V, Johansen O. Autologous chondrocyte implantation compared with microfracture in the knee. A randomized trial. *J Bone Joint Surg (Am)*;86:455-464.
24. Ashton B, Allen T, Howlett C, Eaglesom C, Hattori A, Owen M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop* 1980;151:294-307.
25. Goshima J, Goldberg, V, Caplan A. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop* 1991;262:298-311.
26. Pittenger M, Mackay A, Beck S, Jaiswal R, Douglas R, Mosca J, Moorman M, Simonetti D, Craig S, Marshak D. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-147.

27. Petersen B, Bowen W, Patrene K, Mars W, Sullivan A, Murase N, Boggs S, Greenberger J, Goff J. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999;284:1168-1170.
28. Wakitani S, Goto T, Pineda S, Young R, Mansour J, Caplan A, Goldberg V. Mesenchymal cell-based repair of large full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg (Am)* 1994;76:579-592.
29. Wakitani S, Mitsuoka T, Nakamura N, toritsuka Y, Nakamura Y, Horibe S. Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant* 2004;13:595-600.
30. 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: 199-206.
31. 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;52:2521-2529.
32. Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya i. Higher chondrogenic potential of fibrous synovium and adipose synovium derived cells compared with subcutaneous fat derived cells: distinguishing properties of mesenchymal stem cells in humans. *Arthritis Rheuma* 2006;54:843-853.
33. Tuan R. A second-generation autologous chondrocyte implantation approach to the treatment of focal articular cartilage defects. *Arthr Res Ther* 2007;9:109.
34. Ossendorf C, Kaps C, Kreuz P, Burmester G, Sittinger M, Erggelet C. Treatment of posttraumatic and focal osteoarthritic cartilage defects of the knee with autologous polymer-based three-dimensional chondrocyte grafts: 2-year clinical results. *Arthr Res Ther* 2007;9:R41.
35. Cherubino P, Grassi F, Bulgheroi P, Ronga M. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *J Orthop Surg* 2003;11:10-15.
36. Dorotka R, Windberger U, Macfelda K, Bindreiter U, Toma C, Nehrer S. Repair of articular cartilage defects treated by microfracture and a three-dimensional collagen matriz. *Biomaterials* 2005;26:3617-3629.
37. Gigante A, Bevilacqua C, Ricevuto A, Mattioli-Belmonte M, Greco F. Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and charcterization at surgery. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2007;15:88-92.

38. Ochi M, Uchio Y, Kawasaki K, Wakitani S, Iwasa J. Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg (Br)* 2002;84:571-578.
39. Marcacci M, Berruto M, Brocchetta D, Delcogliano A, Ghinelli D, Gobbi A, Kon E, Pederzini L, Rosa D, Sacchetti G, Stefani G, Zanasi S. Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3-year clinical results. *Clin Orthop Relat Res* 2005;435:96-105.
40. Pavesio A, Abatangelo G, Borriero A, Brocchetta D, Hollander A, Kon E, torasso F, Zanasi S, Marcacci M. Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings. *Novartis Found Symp* 2003;249:203-217.
41. Marcacci M, Zaffagnini S, Kon E, Visani A, Iacono F, Loreti I. Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: technical note. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2002;10:154-159.
42. 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: 709-714.
43. Zheng M, Willers C, Kirilak L, Yates P, Xu J, Wood D, Shimmin A. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): biological and histological assessment. *Tissue Eng* 2007;13:737-746.
44. Johnson L. Arthroscopic abrasion Arthroplasty. A review. *Clin Orthop* 2001; 391S:S306-S317.
45. Sánchez-Sotelo J: Estado actual de las técnicas reparadoras del cartílago articular. *MC Medical* 2007; Vol 15 nº1. Publicación digital.
46. Paget J. Healing of injuries in various tissues. *Lect Surg Pathol* 1853;T:262.
47. Eyre D. The collagens of articular cartilage. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1991;21 (suppl2):2-11.
48. Salter D. Cartilage. *Current Orthopaedics* 1998;12:251-257.
49. Strangeways T. The nutrition of articular cartilage. *British Med J* 1920;1:661.
50. Pellici P. Do tumor suppressive mechanisms contribute to organism aging by inducing stem cell senescence?. *J Clin Invest* 2004;113:4-7.
51. Martin K, Buckwalter J. The role of chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis and in limiting cartilage repair. *J Bone Joint Surg (Am)* 2003;85:106-110.
52. Weightman B. In vitro fatigue testing of articular cartilage. *Ann Rheum Dis* 1975;34:108.

53. Min B, Kim H, Lim H, Park C, Park S. Effects of ageing and arthritis disease on nitric oxide production by human articular chondrocytes. *Exp Mol Med* 2001;33:299-302.
54. Hubbard M. Articular debridement versus washout for degeneration of medial femoral condyle: A five-year study. *J Bone Joint Surg (Br)* 1996;78:217.
55. Sprague N. Arthroscopic debridement for degenerative knee joint disease. *Clin Orthop* 1981;160:118.
56. Pridie K. A method of resurfacing osteoarthritic knee joints. *J Bone Joint Surg (Br)* 1959;41:618.
57. Insall J. The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop* 1974;101:61-67.
58. Rodrigo J, Steadman R, Fulstone H. Improvement of full-thickness chondral defect healing in the human knee after debridement and microfracture using continuous passive motion. *Am J Knee Surg* 1994;7:109.
59. Johnson L. Arthroscopic abrasión arthroplasty. Historical and pathological perspectiva. Present status. *Arthroscopic* 1986;2:54.
60. Bert J. Abrasion arthroplasty. *Operative Techniques Orthop* 1997;7:294.
61. Ficat R, Ficat C, Gedeon P. Spongialization: A new treatment of diseases patellae. *Clin Orthop* 1979;144:74.
62. O'Driscoll S, Keeley F, Salter R. Durability of regenerated articular cartilage produced by free autogenous periosteal grafts in mayor full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. *J Bone Joint Surg (Am)* 1988;70:595.
63. Ritsilä E, Poussa M, Rubak J. Periosteal and periochondral grafts in reconstruction of the patellar joint surface. *Acta Orthop Scand* 1980;51:704.
64. Rubak J. Reconstruction of articular cartilage defects with free periosteal grafts. *Acta Orthop Scand* 1982;53:1745.
65. Angermann P, Riegel-Nielsen P. Osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation: A preliminary clinical study of 14 cases. *Orthop Int* 1994;2:425.
66. Lorentzon R, Alfredson H. Periosteum transplantation. *Sports Med Arthroscopy Rev* 1998;6:60.
67. Skoog T, Johansson S. The formation of articular cartilage from free perichondrial grafts. *Plast Reconst Surg* 1976;57:1.

68. Homminga G, Bulstra S, Bouwmester P. Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg (Br)* 1990;72:1003.
69. Lexer E. Substitution of whole of half joints from freshly amputated extremities by free plastic operation. *Surg Gynecol Obstet* 1908;6:601.
70. Convery R, Akesson W, Meyers M. The operative technique of fresh osteochondral allografting of the knee. *Operative Techniques Orthop* 1997;7:340.
71. Gross A. Fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects: Surgical technique. *Operative Techniques Orthop* 1997;7:334.
72. Muellner T, Knopp A, Ludvigsen T, Engebretsen L. Failed autologous chondrocyte implantation. Complete atraumatic graft delamination after two years. *Am J Sports Med* 2001;29:516-519.
73. Gooding C, Bartlett W, Bentley G, Skinner J, Carrington R, Flanagan A. A prospective randomised study comparing two techniques of autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects in the knee: Periosteum covered versus type I/III collagen covered. *Knee* 2006;13:203-210.
74. Steinwachs M, Kreuz P. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with type I/III collagen membrane: a prospective study with a 3-year follow-up. *Arthroscopy* 2007;23:381-387.
75. Frenkel S, Toolan B, Menche D, Pitman M, Pachence J. Chondrocyte transplantation using a collagen bilayer matrix for cartilage repair. *J Bone Joint Surg (Br)* 1997;79:831-836.
76. Caplan A, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Doldberg V. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop relat Res* 1997;342:254-269.
77. Chaipinyo K, Oakes B, Van Damme M. The use of debrided human articular cartilage for autologous chondrocyte implantation: maintenance of chondrocyte differentiation and proliferation in type I collagen gels. *J Orthop Res* 2004;22:446-455.
78. Nehrer S, Breinan H, Ramappa A, Young G, Shortkoff S, Young G, Minas T, Sledge C, Yannas I, Spector M. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *J Biomed Mater Res* 1997;38:95-104.
79. Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A., Hammer C, Kastenbauer E, Naumann A. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater Res* 1998;42:172-181.
80. Grigolo B, Lisignoli G, Piacentini A, Fiorini M, Gobbi P, Mazzotti G, Duca M, Pavesio A, Facchini A. Evidence for redifferentiation of human chondrocytes grown on a hyaluronan-based biomaterial (HYAFF 11): molecular,

- inmunohistochemical and ultrastructural analysis. *Biomaterials* 2002;23:1187-1195.
81. Homminga G, Buma P, Koot H, Van der Kraan P, Van der Berg W. Chondrocyte behaviour in fibrin blue in vitro. *Acta Orthop Scand* 1993;64:441-445.
82. Potter H, Linklater J, Alen A, Hannafin J, Haas S. Magnetic resonance imaging of articular cartilage in the knee. An evaluation with use of fase-spin-echo imaging. *J Bone Joint Surg (Am)* 1998;80:1276-1284.
83. Recht M, Bobic V, Burstein D, Disler D, Gold G. Magnetic resonance imaging or articular cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 2001;391:S379-396.
84. Marlovits S, Striessnig G, Kutscha-Lissberg F, Resinger C. Early postoperative adherence of matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the femoral condyle. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2005;13:451-457.
85. Couceiro J, Carpintero P, Silva M, Couceiro R. Cultivo de condrocitos en Injertos, sustitutivos óseos y materiales en la cirugía reconstructiva del aparato locomotor. *Curso Básico Fundación SECOT* 2005.
86. Schwartz E, Kirpatrick P, Thompson R. The effect of environmental pH on glycosaminoglycan metabolism by normal human chondrocytes. *J Lab Clin Med* 1976;87:198-204.
87. Insall J, Scott N. *Rodilla*. Marbán. Madrid. 2004.
88. Pagnano MW, Clarke HD, Jacofsky DJ, Amendola A, Repicci JA. Surgical treatment of the middle-aged patient with arthritic knees. *Instr Course Lect* 2005;54:251-9.
89. Rodríguez-Merchán EC. *Prótesis de rodilla primaria. Estado actual*. Editorial Médica Panamericana. Madrid. 2008
90. Mavrogenis AF, Papagelopoulos PJ, Mitsiokapa EA, Sdrenias CV, Christodoulou NA. High tibial osteotomies: indications and techniques. *J Surg Orthop Advances* 2008;17:239-51.
91. Elattrache N, Harner CH, Mirzayan R, Sekiya J. *Surgical techniques in sports medicine*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia. 2007.
92. Getgood A, Bhullar T, Rushton N. Current concepts in articular cartilage repair. *Orthopaedics and Trauma* 2003;23:189-200.
93. Ericksson G, Gimble J, Franklin D, Rice H, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2002;290:763-769.

94. Wickham Q, Ericksson G, Gimble J, Vail P, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop* 2003;412:196-212.
95. Toghraie F, Chenari N, Gholipour M, Faghieh Z, Torabinejad S, Deghani S, Ghaderi A. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in rabbit. *The Knee*. En prensa.
96. Lee K, Hui J, Chim Song I, Ardany L, Lee E. Injectable mesenchymal stem cell therapy for large cartilage defects. A porcine model. *Stem cells* 2007;25:2964-2971.
97. Kon E, Delcogliano M, Filardo G, Altadonna G, Marcacci M. Novel nano-composite multi-layered biomaterial for the treatment of multifocal degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009;17:1312-1315.
98. Sandelin J. Arthroscopic surgery of lower extremity joints. *Duoecim* 1999;115:1327-35.
99. Phemister B. Treatment of ununited fractures by onlay bone grafts without screw or tie fixation and without breaking down of the fibrous union. *Journal of Bone and Joint Surgery* 1947;29:946-960.
100. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone. VII. The fresh composite homograft-autograft of cancellous bone; an analysis of factors leading to osteogenesis in marrow transplants and in marrow-containing bone grafts. *J Bone Joint Surg Br* 1964;46:110-40.
101. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber R E, Frasser J K, and Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 2005;54:132-141.
102. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, Drago JL, Ashjian P, Thomas B, Benhaim P, Chen I, Fraser J, Hedrick MH. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs* 2003;174:101-109.
103. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter K, Bieback K. Comparative Analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006;24:1294-301.
104. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211-28.
105. Bogaerdt AJ, Van Zuijlen PP, Van Galen M, Lamme EN, Middelkoop E. The suitability of cells from different tissues for use in tissue-engineered skin substitutes. *Arch Dermatol Res* 2002;294:135-42.

106. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H et al.. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 2002;13:4279–4295.
107. Almeida KA, Campa A, Alonso-Vale MC. Fracción vascular estromal de tejido adiposo: cómo obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes: estudio preliminar. *Cir Plást Ibero-latinoam* 2008; 34:71-79.
108. Drago J, Choi J, Lieberman J, Huang J, Zuk P, Zhang J, Hedrick M, Benhaim P. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *Journal of Orthopaedic Research* 2003;21:622-629.
109. Guilak F, Lott D, Awad H, Cao G, Hicok K, Fermor V, Gimble G. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *Journal of Cellular Physiology* 2006;206:229–237.
110. Khan WS, Tew SR, Adesida AB, Hardingham TE. Human infrapatellar fat pad-derived stem cells express the pericyte marker 3G5 and show enhanced chondrogenesis after expansion in fibroblast growth factor-2. *Arthritis Res Ther* 2008;10:R74.
111. Wu L, Wu Y, Lin Y, Jing W, Nie X, Qiao J, Liu L, Tang W, Tian W. Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix. *Mol Cell Biochem* 2007;301:83-92.
112. Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, Lin CS. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev* 2008;17:1053-63.
113. Matsumoto D, Shigeura T et al. Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates. *Plast Reconstr Surg* 2007;120:1510-7.
114. Hae Young S, Eun Su J, Jung Il K, Jin Sup J, Jae Ho K. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007;101:1238–1251.
115. Bradley E, Arthur W, Guilak F. Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6. *Arthritis & Rheumatism* 2006;54:1222–1232.
116. Dominici M, Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 2006;4:315-17.
117. Cantú Martínez, A. Tesis doctoral. Bioingeniería tisular de tejido cartilaginosa usando un andamio de gel ácido hialurónico: un estudio experimental. Tlalpan, México DF, 2009.

118. Rampichová M, Filová E, Varga F et als. Fibrin/hyaluronic acid composite hydrogels as appropriate scaffolds for in vivo artificial cartilage implantation. *Asaio J* 2010;56:563-8.
119. Park S, Cui J, Park R, Min B. Potential of fortified fibrin/hyaluronic acid composite gel as a cell delivery vehicle for chondrocytes. *Artif Organs* 2009;33:439-47.
120. Pereira R, Scaranari M, Castagnola P, Grandizio M et als. Novel injectable gel system as a vehicle for human articular chondrocytes in cartilage tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med* 2009;3:97-106.
121. Filová E, Jelinek F, Handl M et als. Novel composite hyaluronan/type I collagen/fibrin scaffold enhances repair of osteochondral defect in rabbit knee. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2008;87:415-24.
122. Filová E, Rampichová M, Handl M et als. Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol Res* 2007;56 Suppl1:S5-S16.
123. Park S, Park SR, Chung S, Pai K, Min B. Tissue-engineered cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation. *Artif Organs* 2005;29:838-45.
124. Chou C, Cheng W, Kuo T, Sun J, Lin F, Tsai j. Fibrin glue mixed with gelatin/hyaluronic acid/chondroitin-6-sulfate tri-copolymer for articular cartilage tissue engineering: the results of real.time polymerase chain reaction. *J Biomed Mater Res A* 2007;82:757-67.
125. Saldaña Díaz, A. Tesis doctoral. Efecto de la implantación de células mesenquimales de tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos en la reparación de defectos cavitarios del fémur en un modelo experimental ovino. Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria. Universidad de León, 2010.
126. Muschler GF, Nakamoto C, Griffith LG. Engineering principles of clinical cell-based tissue engineering. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A:1541-58.
127. Prosper F. Celulas madra adulta. *Cardiovascular risk factors* 2004;13:11-8.
128. Forriol F, Esperanza R. Ingenieria tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica. *Trauma Fund Mapfre* 2008;19:88-101.
129. Saldaña Díaz A, Ramos Pascua L, López Laguna M, Iglesias Muñoz J, Gonzalo Orden M, Rodríguez Altónaga J, González Celador R. Evolución radiográfica del implante de células mesenquimales de tejido adiposo diferenciadas a osteoblastos en la reparación de defectos óseos. Estudio experimental en ovejas. *Trauma Fund Mapfre* 2010;21:192-98.

130. Havlas V, Kos P, Jendelová P, Lesny P, Trc T, Syková E. Comparison of chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with cultured chondrocytes and bone marrow mesenchymal stem cells. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2011;78:138-144.
131. Hsu S, Huang T, Cheng S et als. Chondrogenesis from human placenta-derived mesenchymal stem cells in three dimensional scaffolds for cartilage tissue engineering. *Tissue Eng Part A* 2011;17:1549-60.
132. Estes B, Guilak F. Three-dimensional culture systems to induce chondrogenesis of adipose-derived stem cells. *Methods Mol Biol* 2011;702:201-17.
133. Guilak F, Estes B, Diekman B, Moutos F, Gimble J. Multipotent adult stem cells from adipose tissue for musculoskeletal tissue engineering. *Clin Orthop Relat Res* 2010;468:2530-40.
134. Jacobi M, Villa V, Magnussen R, Neyret Ph. Maci a new era ?. *Sports Medicine Arthr Rehab Therapy Tech* 2011;3:10.