



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**Facultad de Veterinaria**

**Departamento de Medicina, Cirugía y Anatomía Veterinaria**

**TESIS DOCTORAL**

**REGENERACIÓN DE LESIONES OSTEOCONDRALES  
MEDIANTE EL USO DE ALOINJERTO ÓSEO Y  
POBLACIONES CELULARES CONDRÓGENICAS  
EMBEBIDAS EN UN HIDROGEL PLASMÁTICO**

**MARTA LÓPEZ LAGUNA**

**León, 2014**





universidad  
de león

## INFORME DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

El Dr. Francisco Javier Iglesias Muñoz, el Dr. Luis Rafael Ramos Pascua y el Dr. José Antonio Rodríguez-Altonaga Martínez como directores de la tesis doctoral titulada “Regeneración de lesiones osteocondrales mediante el uso de aloinjerto óseo y poblaciones celulares condrogénicas embebidas en un hidrogel plasmático” realizada por Dña. Marta López Laguna en el programa de doctorado Medicina, cirugía y anatomía veterinaria, informa favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, en León a        de        de

Fdo: Dr. Francisco Javier Iglesias Muñoz        Fdo: Dr. Luis Rafael Ramos Pascua

Fdo: Dr. José Antonio Rodríguez-Altonaga Martínez



Caminando en línea recta no puede uno llegar muy lejos.

Antoine de Saint-Exupéry, *El Principito*, 1943.



## AGRADECIMIENTOS

---

El camino para llegar hasta aquí ha sido largo y sinuoso, es por eso que son muchas, muchísimas las personas a las que tendría que agradecer sus enseñanzas, su ayuda, sus consejos, su ánimo o simplemente su compañía durante este trayecto.

En primer lugar a mis directores, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Al Dr. Francisco Javier Iglesias Muñoz, por su sinceridad y franqueza, por la completa formación recibida durante estos años y por haberme forzado a explorar mis propios límites. Al Dr. Luis Rafael Ramos Pascua, por haber impulsado esta línea de investigación desde el principio, por su buen humor y su apoyo. Al Dr. José Antonio Rodríguez-Altonaga, por su disponibilidad, sus ánimos y sus consejos.

A mi Equipo, con mayúsculas, el que sabe lo que cuesta sacar adelante un proyecto en el que se cree, lo que es pasar noches sin dormir, comer a la hora de cenar, soportar la presión... y todo sin perder las ganas de reír. Gracias a la Dra. Jennifer Ramos Carro, son muchos años ya, y sobre todo muchas horas juntas, no tengo palabras suficientes para agradecer su compañía, su apoyo y su eterna sonrisa. A la futura doctora Ana Fernández González, que también sabe bastante de caminos largos y sinuosos, por su permanente disponibilidad para ayudar y su cooperación en lo laboral, lo personal y lo festivo, ¡ánimo Condro-A!

Gracias a los Dres. José Antonio Pérez Caballer, José Antonio de Pedro Moro y Javier Cervero Suárez, por generar los recursos necesarios para llevar a cabo este proyecto, por solucionar los no pocos inconvenientes que han ido surgiendo en el camino y por hacer un hueco en sus apretadas agendas para intervenir a nuestros “pacientes”.

Al Dr. Francisco Collía Fernández y su equipo del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Salamanca, en especial a Lorena, Javier y Rosa, por todo su trabajo, sus sabios consejos y el apoyo moral.

A la empresa Micros Veterinaria, por permitirme usar sus instalaciones de manera desinteresada en esta última fase del proyecto.

A mi Tribu, por el respeto, el apoyo, las risas, las lágrimas, los cortos, los largos... por caminar contra el viento.

Gracias a mi familia, a toda ella que es fantástica, por ser ejemplo de respeto, unión y cariño. En especial a mis padres, por apoyarme en todas mis decisiones, por sus consejos, su paciencia, su cariño, en definitiva, porque juntos se complementan y representan el mejor de los modelos a seguir.

También a mi otra familia, la que escogí. A Óscar, mi persona favorita, por su apoyo incondicional y por contagiarme algo de su constancia, orden y buen hacer. Gracias a todos los amigos que han “sufrido” mi tesis conmigo y tantas veces sin mí, y en especial a Clara y a Julia... por todo... por tanto...;).

Dicen que cada experiencia te hace más sabio, cada traición más inteligente y cada desilusión más hábil, así que supongo que también debo agradecerse a los que me lo han puesto difícil, porque ellos me han hecho más fuerte y me han dado el impulso final para cerrar esta etapa.

Gracias a todos los que me he encontrado en el camino, porque de una u otra forma han hecho posible que ahora escriba estas líneas.

MUCHAS GRACIAS.

## FINANCIACIÓN

---

El presente trabajo de investigación ha recibido el apoyo económico de las siguientes instituciones:

- Diputación Provincial de León, Fundación Clínica San Francisco y Universidad de León, a través de una beca de Formación de Personal Investigador bajo la Cátedra Extraordinaria Manuel Elkin Patarroyo.
- Laboratorios Inibsa, por su financiación y apoyo logístico para la realización del protocolo experimental.



## DIVULGACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE LOS RESULTADOS

---

### Publicaciones científicas derivadas del presente estudio:

- Cervero-Suarez J, Lopez Laguna M, Pérez-Caballer JA, Robles D, Ramos Carro J, Castiñeiras M. Anatomy of the rabbit knee in orthopaedic surgery investigation. British Journal of Surgery 2011; 98(58): 1–9.

### Participación en congresos:

- 48 Congreso Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología, Oviedo 2011. López Laguna M, Iglesias Muñoz FJ, Cervero Suárez J, Pérez Caballer JA, Robles Rodríguez D, Ramos Carro J, de la Puente P, Castiñeiras M. “Células madre mesenquimales de tejido adiposo ¿importa la localización del depósito graso?”.
- XVII Congreso Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas, Oviedo 2011. Cervero Suárez J, López Laguna M, Pérez Caballer JA, Robles Rodríguez D, Ramos Carro J, Castiñeiras M. “Estudio anatómico experimental de la rodilla del conejo”.
- XIX Congreso de la Sociedad Española de Investigación Ósea y del Metabolismo Mineral, Santiago de Compostela 2014. López Laguna M, Benito L, Pedro JA de, Cervero J, Iglesias Muñoz FJ, Pérez Caballer A, Collía F. “Efecto de la aplicación de una matriz con células diferenciadas a condrocitos sobre lesión traumática osteocondral en conejo”.



## **PREFACIO: la vida es movimiento, el movimiento es vida.**

---

El movimiento es la más evidente manifestación de vida. Para realizar cualquier tipo de movimiento se requiere de un buen funcionamiento de la estructura que sostiene el cuerpo. Si esa estructura se ve alterada, todas las actividades cotidianas, desde las más sencillas hasta las más complejas se ven afectadas.

La capacidad de moverse eficientemente depende, en gran parte, de la salud de las articulaciones; son ellas las que permiten a los huesos distintas posibilidades de movimiento y de su salud depende, en gran medida, la capacidad funcional general del individuo, no solo en el plano físico sino también en el plano laboral, deportivo, social...

Es por eso que, desde el año 2007, en el que empecé mi andadura profesional en el Establecimiento de Tejidos de León, y el Dr. Javier Iglesias me planteó la posibilidad de encargarme de la línea de investigación en el área de Cirugía Ortopédica y Traumatología, se abrió ante mí un mundo de posibilidades difícil de abarcar con un solo proyecto.

En la que, sin saberlo, se convertiría en la primera fase de una dilatada línea de investigación, de la mano del Dr. Luis Ramos y el Dr. Andrés Saldaña, comenzamos estudiando la posibilidad de regenerar lesiones óseas mediante el empleo de células madre mesenquimales de tejido adiposo (ADMSC) y distintos formatos de injerto óseo en un modelo ovino. Tras mucho esfuerzo y superando no pocas dificultades, conseguimos optimizar la técnica de obtención de ADMSC, lo que llevó a la solicitud de una patente (Nº de publicación: ES2372239B2). Además conseguimos entrever, puesto que los resultados de este tipo de proyectos experimentales, y especialmente en sus comienzos, no suelen ser definitivos, que podíamos favorecer la regeneración de lesiones

óseas empleando ADMSC y heteroinjerto óseo, y que el plasma era un buen vector para la aplicación localizada de técnicas de terapia celular. También pudimos apreciar las dificultades añadidas que supone el empleo de grandes animales de experimentación como la oveja.

En el siguiente proyecto, de nuevo colaborando con el Dr. Luis Ramos y con la incorporación al equipo del Dr. Ricardo Mencía y la futura doctora Ana Fernández, volvimos al laboratorio para crear un sustituto cartilaginoso mediante técnicas de ingeniería tisular. Empleando ADMSC embebidas en geles de plasma y ácido hialurónico dimos con un diseño sencillo y adecuado para su empleo en clínica, lo que nosotros denominamos “la receta de la condrogénesis”, que nos llevó a conseguir el premio al mejor póster científico en el 48 Congreso de la Sociedad Española de Cirugía Ortopédica y Traumatología.

En 2011, de nuevo nos embarcamos en un proyecto de experimentación animal, esta vez empleando conejos, que aunque más baratos y manejables que las ovejas utilizadas anteriormente, no por eso menos laborioso resultó su cuidado, como mi compañera la Dra. Jennifer Ramos puede corroborar. Esta vez colaboramos con el Dr. Antonio Pérez-Caballer y el Dr. Javier Cervero en un proyecto que pretendía evaluar la capacidad regeneradora de ADMSC, plasma y ácido hialurónico aplicados mediante inyección intra-articular en rodillas de conejos para regenerar lesiones osteocondrales producidas quirúrgicamente.

La principal conclusión de ese proyecto experimental, que ha sido publicado en la revista *British Journal of Surgery*, fue que la aplicación de terapias inductivas ayudaba a mejorar la capacidad autorreparativa del cartílago articular a corto plazo, pero que para que la regeneración cartilaginosa fuera eficaz y completa se hacía indispensable restablecer correctamente la arquitectura del hueso subcondral.

Con el conocimiento adquirido en estas experiencias, planteamos un proyecto de investigación en el que intentaríamos regenerar lesiones osteocondrales en su totalidad, restituyendo completamente la estructura del tejido lesionado, esto es, su fracción ósea y su componente cartilaginoso. Y éste es, finalmente, el estudio realizado en la presente tesis doctoral, que trata de analizar la eficacia de técnicas de ingeniería tisular aplicadas a la regeneración de lesiones articulares, empleando aloinjerto óseo para la regeneración del hueso subcondral, y ADMSC o condrocitos embebidos en un hidrogel de plasma y ácido hialurónico para la regeneración del tejido cartilaginoso.

Así pues, muchos caminos hemos explorado antes de llegar a plantear este proyecto de tesis doctoral, y de todo lo que en ellos nos hemos encontrado, hemos aprendido, de lo bueno y de lo malo, de lo que nos entusiasmó y de lo que nos decepcionó, moviéndonos por los senderos de la ciencia, porque la ciencia, como la vida, también es movimiento.



## ÍNDICE

---

<b>I- ÍNDICE DE ABREVIATURAS, FIGURAS Y TABLAS.....</b>	<b>23</b>
– ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	25
– ÍNDICE DE FIGURAS.....	27
– ÍNDICE DE TABLAS.....	35
<b>II- RESUMEN/SUMMARY.....</b>	<b>37</b>
RESUMEN .....	39
SUMMARY.....	41
<b>III- INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>43</b>
– ESTRUCTURA DE LA ARTICULACIÓN .....	45
○ El cartílago articular.....	46
▪ Componente celular del cartílago articular .....	46
▪ La matriz cartilaginosa.....	48
▪ Organización del cartílago articular.....	51
▪ Nutrición del cartílago articular.....	54
○ El hueso .....	55
▪ Componente celular .....	55
▪ La matriz ósea.....	57
▪ El hueso subcondral .....	59
– PATOLOGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR .....	61
○ Etiología y epidemiología .....	61
▪ Patología articular debida a traumatismos .....	62

- Patología articular asociada al desgaste .....63
  - Clasificación de las lesiones.....64
    - Grado 0.....64
    - Grado I.....64
    - Grado II.....64
    - Grado III.....65
    - Grado IV .....66
- ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS .....67
  - Métodos reparadores .....68
    - Desbridamiento artroscópico .....68
    - Técnicas de estimulación medular .....69
  - Métodos reconstructivos .....69
    - Autoinjertos.....70
    - Aloinjertos u homoinjertos.....71
    - Cilindros sintéticos .....72
  - Métodos regenerativos.....73
    - ACI 1ª generación.....73
    - ACI 2ª generación .....75
    - ACI 3ª generación .....77
- NUEVAS PERSPECTIVAS .....79
  - Células madre mesenquimales .....79
    - Células madre mesenquimales de médula ósea82
    - Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo .....83
  - Ingeniería tisular y células madre .....85

#### **IV- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....89**

- JUSTIFICACIÓN .....91

– HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	95
– OBJETIVOS.....	95
<b>V- MATERIAL Y MÉTODO .....</b>	<b>97</b>
– DISEÑO DEL ESTUDIO .....	99
– EL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN.....	100
– OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS .....	102
○ Obtención y procesamiento del tejido adiposo.....	102
○ Obtención y procesamiento del cartílago articular ...	105
○ Obtención y procesamiento de la sangre venosa .....	106
○ Obtención y procesamiento del tejido óseo.....	106
– Etapa-0- ESTUDIO PREVIO COMPARATIVO DE ADMSC DERIVADAS DE GRASA ABDOMINAL E INFRAPATELAR DE CONEJO.....	108
○ Rendimiento celular .....	110
○ Unidades formadoras de colonias.....	110
○ Proliferación celular.....	111
○ Multipotencialidad .....	112
– Etapa-1- ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS .....	116
○ Estudio de la proliferación celular.....	117
○ Estudio de la distribución celular.....	118
○ Estudio histológico .....	120

- Etapa-2- ESTUDIO *IN VIVO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS ..... 122
  - o Mantenimiento de los animales de experimentación 123
  - o Lesiones e implantes ..... 124
  - o Eutanasia y recogida de las muestras post-mortem... 129
  - o Análisis macroscópico de las lesiones ..... 129
  - o Procesamiento histológico ..... 131
  - o Valoración microscópica..... 134
- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS ..... 135

## VI- RESULTADOS ..... 140

- Etapa-0- ESTUDIO PREVIO COMPARATIVO DE ADMSC DERIVADAS DE GRASA ABDOMINAL E INFRAPATELAR DE CONEJO..... 140
  - o Rendimiento celular ..... 140
  - o Unidades formadoras de colonias..... 143
  - o Proliferación celular..... 146
  - o Multipotencialidad ..... 148
- Etapa-1- ESTUDIO *IN VITRO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS ..... 154
  - o Estudio de la distribución celular..... 154
  - o Estudio de la proliferación celular..... 162
  - o Estudio histológico ..... 163
- Etapa-2- ESTUDIO *IN VIVO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS ..... 168
  - o Grupo I: hidrogel acelular..... 170

○ Grupo II: hidrogel con condrocitos articulares .....	177
○ Grupo III: hidrogel con ADMSC .....	185
○ Grupo IV: hidrogel con ADMSC diferenciadas condrogénicamente.....	193
<b>VII- DISCUSIÓN.....</b>	<b>201</b>
– Etapa-0- ESTUDIO PREVIO COMPARATIVO DE ADMSC DERIVADAS DE GRASA ABDOMINAL E INFRAPATELAR DE CONEJO.....	205
– Etapa-1- ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS .....	212
– Etapa-2- ESTUDIO <i>IN VIVO</i> DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS .....	219
<b>VIII-CONCLUSIONES .....</b>	<b>233</b>
<b>IX- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>237</b>
<b>X- ANEXOS .....</b>	<b>261</b>
– ANEXO-I- MATERIAL .....	263
– ANEXO-II- PROTOCOLOS.....	267
○ Protocolo anestésico.....	267
○ Protocolo analgésico .....	276
○ Protocolo eutanásico.....	282



I- ÍNDICE DE ABREVIATURAS, FIGURAS Y  
TABLAS

---



**ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

---

- OP .....Cultivo celular primario.
- 1P, 2P.....Subcultivos celulares.
- ACI.....Implante de condrocitos autólogos (*Autologous Chondrocyte Implantation*)
- ACI-C .....Implante de condrocitos autólogos con parche de colágeno (*Autologous Chondrocyte Implantation-Collagen*)
- ACI-P.....Implante de condrocitos autólogos con parche perióstico (*Autologous Chondrocyte Implantation- Periostium*)
- ADMSC .....Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (*Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*)
- ADMSC-C.....ADMSC sometidas a inducción condrogénica
- BMMSC.....Células madre mesenquimales de médula ósea (*Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*)
- BMP.....Proteína morfogenética de hueso (*Bone Morphogenetic Protein*)
- DMEM .....Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)
- EDTA .....Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- GAG.....Glicosaminoglicanos
- ISCR.....Sociedad internacional para la reparación del cartílago (*International Society of Cartilage Repair*)
- ISCT .....Sociedad internacional de terapia celular (*International Society for Cellular Therapy*)
- MACI .....Implante de condrocitos autólogos en membranas (*Membran-assisted Autologous Chondrocyte Implantation*)

MCA .....	Medio de cultivo para ADMSC
MCG .....	Medio de cultivo condrogénico
MCO.....	Medio de cultivo para condrocitos
MSC .....	Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
PBS.....	Suero salino tamponado con fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCL .....	Policaprolactona
PGA .....	Ácido Poliglicólico ( <i>Polyglycolic acid</i> )
PLA .....	ÁcidoPpoliláctico ( <i>Polylactic acid</i> )
SATE .....	Solución Antibiótica para Tejidos
SEA.....	Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca
SEM.....	Microscopía electrónica de barrido ( <i>Scanning Electron Microscopy</i> )
SVF.....	Fracción del estroma vascular ( <i>Stromal Vascular Fraction</i> )
TGF.....	Factor transformante de crecimiento ( <i>Transforming Growth Factor</i> )
UFC .....	Unidades Formadoras de Colonias
USAL.....	Universidad de Salamanca

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura-1- Condrocitos embebidos en la matriz cartilaginosa..... 47

Figura-2- Síntesis e interacción de los componentes de la matriz extracelular del cartílago articular..... 50

Figura-3- Disposición en capas de los principales elementos constituyentes del cartílago articular..... 54

Figura-4- Corte histológico en el que se observan osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Técnica T. Goldner ..... 57

Figura-5- Corte histológico de hueso subcondral teñido con V. Kossa..... 59

Figura-6- Indicaciones generales para el tratamiento de las lesiones condrales.....68

Figura-7- Esquema representativo de la técnica de microfractura ..... 69

Figura-8- Tallado e implante de un aloinjerto osteocondral ..... 72

Figura-9- Dibujo esquemático de un defecto condral tratado con la técnica ACI de primera generación ..... 74

Figura-10- Procedimiento de ACI de segunda generación o MACI ..... 76

Figura-11- Esquema representativo del principio básico de las técnicas de ingeniería tisular ..... 86

Figura-12- Aspecto de las muestras grasas tras la digestión enzimática .....103

Figura-13- Cámara Neubauer.....105

Figura-14- Aspecto de las muestras cartilaginosas antes y después de la disgregación mecánica .....105

Figura-15- Obtención de aloinjerto óseo triturado a partir de las epífisis óseas .....107

Figura-16- Estudios realizados en la Etapa-0- .....109

Figura-17- Estudios realizados para la caracterización de las poblaciones celulares aisladas de cada muestra de tejido graso .....109

Figura-18- Aspecto de una placa de cultivo sembrada para el estudio de la proliferación celular.....	106
Figura-19- Placa de 96 pocillos conteniendo los constructos tridimensionales en cultivo y detalle de un hidrogel.....	114
Figura-20- Estudios realizados en la Etapa-1- .....	117
Figura-21- Microscopio láser confocal y esquema del funcionamiento del marcaje celular Live-Dead .....	119
Figura-22- Microscopio electrónico de barrido y muestras desecadas y recubiertas con oro listas para su visualización .....	120
Figura-23- Campana de extracción de gases en la que se realizaron las tinciones histológicas.....	121
Figura-24- Estudios realizados en la Etapa-2- .....	123
Figura-25-: Instalaciones para la estabulación de los animales de experimentación.....	124
Figura-26-: Fases de la intervención quirúrgica para la creación de las lesiones osteocondrales e implante del constructo desarrollado <i>in vitro</i> .....	127
Figura-27- Rendimientos celulares medios obtenidos a partir de las biopsias grasas .....	141
Figura-28- Aspecto de las células en OP 48 horas tras la siembra antes y después del lavado con PBS y tras 6 días de cultivo <i>in vitro</i> .....	142
Figura-29- Unidades formadoras de colonias, aspecto microscópico y macroscópico tras la tinción con cristal violeta .....	144
Figura-30- Porcentaje de UFC obtenidas en OP.....	145
Figura-31- Número medio de UFC en OP por mg de tejido adiposo digerido.....	145
Figura-32- Número medio de UFC en OP por muestra de tejido adiposo procesada.....	145

Figura-33- Patrones proliferativos *in vitro* de las ADMSC aisladas a partir de grasa abdominal y grasa de Hoffa en OP, 1P y 2P..... 147

Figura-34- ADMSC derivadas de grasa abdominal e infrapatelar tras 7 días de inducción adipogénica ..... 149

Figura-35- ADMSC derivadas de grasa abdominal e infrapatelar tras 7 días de inducción osteogénica..... 150

Figura-36- ADMSC derivadas de grasa abdominal e infrapatelar tras 7 días de inducción condrogénica ..... 152

Figura-37- Aspecto macroscópico de las matrices celulares al cabo de 2, 4 y 6 semanas de cultivo *in vitro* ..... 155

Figura-38- Morfología de los distintos tipos celulares en el interior de los hidrogeles visualizados mediante microscopía confocal y marcaje fluorescente con homodímero de etidio y calceína ..... 156

Figura-39- Imágenes de microscopía confocal de cada tipo celular estudiado en el interior de los hidrogeles ..... 157

Figura-40- Detalle de la matriz tridimensional plasmática mediante microscopía electrónica de barrido..... 158

Figura-41- Detalle de la matriz en el que se aprecia cómo las ADMSCs al cabo de 4 semanas de cultivo *in vitro* se adhieren e interaccionan con el andamiaje de fibrina..... 158

Figura-42- ADMSC diferenciadas condrogénicamente mediante cultivo en hidrogel plasmático tras 2 semanas de inducción ..... 158

Figura-43- Panorámica en la que se observan ADMSC diferenciadas condrogénicamente dispersas por la superficie de la matriz tridimensional al cabo de 6 semanas de cultivo *in vitro*. ..... 159

Figura-44- Semipanorámica de un constructo celular que ilustra la formación de monocapas celulares sobre la matriz fibrilar..... 159

Figura-45- ADMSC al cabo de 8 semanas de cultivo *in vitro* ..... 159

Figura-46- ADMSC sometidas a inducción condrogénica al cabo de 6 semanas de cultivo <i>in vitro</i> .....	159
Figura-47- Detalle de la matriz en el que se advierte la presencia de un condrocito articular inmerso en la red fibrilar formando una laguna en ella	160
Figura-48- Detalle del andamiaje tridimensional en el que se observa la superficie rugosa de un condrocito articular mantenido en cultivo durante 6 semanas.....	160
Figura-49- Imágenes de microscopía electrónica de barrido de cada tipo celular estudiado en el interior de los hidrogeles.....	161
Figura-50- Patrones proliferativos <i>in vitro</i> de las distintas poblaciones celulares en el interior del hidrogel plasmático .....	162
Figura-51- Morfología comparada de los 3 tipos celulares estudiados en el interior de los hidrogeles plasmáticos. Tinción Hematoxilina-eosina .....	164
Figura-52- Presencia de GAG en el interior de las matrices tridimensionales que contienen los 3 tipos celulares estudiados. Tinción azul alcian .....	165
Figura-53- Presencia de colágeno tipo II en el interior los constructos tridimensionales para los 3 tipos celulares estudiados .....	166
Figura-54- Aspecto macroscópico de los cóndilos femorales del animal de referencia tras la eutanasia del mismo a las 12 semanas .....	169
Figura-55- Aspecto macroscópico y radiológico de los hemicóndilos femorales de los animales del Grupo I a las 12 semanas de evolución .....	170
Figura-56- Grupo I (hidrogel acelular). Gráfica índice ICRS modificado .....	170
Figura-57- Grupo I. Panorámica de lesión. Tinción V. Kossa.....	172
Figura-58- Grupo I. Panorámica de lesión. Tinción V. Kossa.....	173
Figura-59- Grupo I. Panorámica y detalle de lesión. Tinción T. Goldner.....	173
Figura-60- Grupo I. Detalle de lesión. Tinción T. Goldner.....	174
Figura-61- Grupo I. Detalle de lesión. Tinción T. Goldner. ....	174

Figura-62- Grupo I. Panorámica de lesión. Tinción T. Goldner.....	174
Figura-63- Grupo I. Semipanorámica de lesión. Tinción T. Goldner.....	174
Figura-64- Grupo I. Panorámica de lesión. Tinción V. Kossa.....	175
Figura-65- Grupo I. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	175
Figura-66- Grupo I. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	175
Figura-67- Grupo I. Detalle de osteoclasto. Tinción V. Kossa.....	175
Figura-68- Grupo I. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con tetraciclina .....	176
Figura-69- Grupo I. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con calceína.....	176
Figura-70- Grupo I. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con alizarina .....	176
Figura-71- Aspecto macroscópico y radiológico de los hemicóndilos femorales de los animales del Grupo II a las 12 semanas de evolución. ....	178
Figura-72- Grupo II (hidrogel con condrocitos). Índice ICRS modificado. ...	178
Figura-73- Grupo II. Panorámica y detalle de la lesión. Tinción T. Goldner.	180
Figura-74- Grupo II. Panorámica de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	181
Figura-75- Grupo II. Panorámica de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	181
Figura-76- Grupo II. Detalle de lesión. Tinción V. Kossa.....	182
Figura-77- Grupo II. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	182
Figura-78- Grupo II. Panorámica de la lesión. Tinción V. Kossa. ....	182
Figura-79- Grupo II. Semipanorámica de lesión. Tinción T. Goldner.....	182
Figura-80- Grupo II. Detalles de lesión. Tinción T. Goldner .....	183
Figura-81- Grupo II. Detalles de lesión. Tinción V. Kossa. ....	183
Figura-82- Grupo II. Detalles de lesión. Tinción T. Goldner.....	183

Figura-83- Grupo II. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con tetraciclina .....	184
Figura-84- Grupo II. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con calceína.....	184
Figura-85- Grupo II. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con alizarina .....	184
Figura-86- Aspecto macroscópico y radiológico de los hemicóndilos femorales de los animales del Grupo III a las 12 semanas de evolución. ....	186
Figura-87- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Gráfico índice ICRS modificado. ....	186
Figura-88- Grupo III. Panorámica de la lesión Tinción T. Goldner. ....	188
Figura-89- Grupo III. Detalle de la lesión. Tinción V. Kossa. ....	189
Figura-90- Grupo III. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	189
Figura-91- Grupo III. Semipanorámica de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	189
Figura-92- Grupo III. Detalle de la porción articular de la lesión. Tinción T. Goldner.....	189
Figura-93- Grupo III. Detalle de la lesión. Tinción V. Kossa. ....	190
Figura-94- Grupo III. Semipanorámica de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	190
Figura-95- Grupo III. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	190
Figura-96- Grupo III. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	191
Figura-97- Grupo III. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	191
Figura-98- Grupo III. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	191
Figura-99- Grupo III. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con tetraciclina .....	192
Figura-100- Grupo III. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con calceína.....	192

Figura-101- Grupo III. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con alizarina .....	192
Figura-102- Aspecto macroscópico y radiológico de los hemicóndilos femorales de los animales del Grupo IV a las 12 semanas de evolución. ....	194
Figura-103- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Índice ICRS modificado. ....	194
Figura-104- Grupo IV. Panorámica de lesión. Tinción T. Goldner. ....	196
Figura-105- Grupo IV. Detalles de lesión. Tinción T. Goldner. ....	196
Figura-106- Grupo IV. Detalles de lesión. Tinción V. Kossa. ....	196
Figura-107- Grupo IV. Panorámica de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	197
Figura-108- Grupo IV. Panorámica de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	197
Figura-109- Grupo IV. Semipanorámica de la lesión. Tinción V. Kossa. ....	197
Figura-110- Grupo IV. Detalle de la lesión. Tinción T. Goldner. ....	197
Figura-111- Grupo IV. Detalles de lesión Tinción V. Kossa .....	198
Figura-112- Grupo IV. Detalles de lesión Tinción V. Kossa .....	198
Figura-113- Grupo IV. Panorámica de la lesión T. Goldner. ....	198
Figura-114- Grupo IV. Semipanorámica de la lesión. Tinción V. Kossa. Tinción V. Kossa. ....	198
Figura-115- Grupo IV. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con tetraciclina .....	199
Figura-116- Grupo IV. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con calceína.....	199
Figura-117- Grupo IV. Detalle de la lesión observándose el marcaje fluorescente con alizarina .....	199



**ÍNDICE DE TABLAS**

---

Tabla-1- Condiciones de estudio de la multipotencialidad de las ADMSC..... 111

Tabla-2- Distribución de los grupos experimentales..... 124

Tabla-3- Fluorocromos administrados al animal de experimentación..... 126

Tabla-4- Modificación de la escala ICRS para la evaluación macroscópica de la reparación de las lesiones..... 128

Tabla-5- Protocolos de tinción empleados sobre los cortes histológicos de los fémures de conejo. .... 130

Tabla-6- Características de visualización de los fluorocromos empleados. .. 132



## II- RESUMEN/SUMMARY

---



**RESUMEN**

La limitada capacidad regenerativa del tejido cartilaginoso junto con la elevada incidencia de las patologías articulares en la población presente y futura, han hecho que en las últimas décadas haya cobrado gran importancia el desarrollo de técnicas de ingeniería tisular aplicadas a la regeneración osteocondral. En este contexto, el presente estudio trata de comprobar la utilidad de aloinjerto óseo y poblaciones celulares de tipo condrocítico derivadas de cartílago articular o tejido adiposo cultivadas en un hidrogel plasmático, para la regeneración de lesiones osteocondrales creadas en cóndilos femorales de conejo.

Para ello, en un estudio preliminar se comparó el comportamiento *in vitro* de las poblaciones celulares obtenidas a partir de dos fuentes de tejido adiposo disponibles en el conejo (grasa abdominal e infrapatelar), con objeto de elegir la fuente óptima para el desarrollo de los sustitutos tisulares a emplear en las etapas posteriores del estudio. A partir de la grasa infrapatelar se obtuvo un mayor número de células madre mesenquimales con capacidad proliferativa y multipotencialidad similares a las derivadas de tejido subcutáneo.

En una primera etapa se analizó el comportamiento *in vitro* de poblaciones celulares condrocíticas derivadas de tejido grasa infrapatelar y de cartílago hialino en el interior de matrices tridimensionales elaboradas con plasma sanguíneo y ácido hialurónico. Se comprobó que dichas matrices o hidrogeles permitían no solo la proliferación de ambas poblaciones celulares en su interior si no también la re-diferenciación de los condrocitos articulares expandidos en monocapa, así como la adquisición de características condroides por

parte de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo *in vitro*.

En la segunda etapa del estudio, se crearon lesiones osteocondrales en los cóndilos femorales de conejos adultos y se emplearon los constructos elaborados *in vitro* en la anterior etapa para la regeneración de la fracción condral de las lesiones, reconstruyendo previamente el lecho óseo con aloinjerto óseo triturado. Los resultados mostraron que la aplicación de condrocitos articulares embebidos en el hidrogel plasmático promovía la formación de cartílago hialino *in vivo*, mientras que las células madre derivadas de tejido adiposo y diferenciadas condrogénicamente producían un tejido cartilaginoso atípico.

Así pues, la metodología empleada en este estudio parece adecuada para el tratamiento de lesiones osteocondrales, aunque sería necesario comprobar la evolución a largo plazo de las lesiones tratadas y profundizar en el comportamiento condrogénico de las células madre de tejido adiposo.

**SUMMARY**

Articular cartilage has low regenerative ability that along with high incidence of articular pathologies in present and future population has caused that in recent decades the development of tissue engineering techniques applied to the osteochondral regeneration has become very important. In this context, this study aims to test usefulness of chondrocyte-like cell populations derived from articular cartilage or adipose tissue, cultured in a plasma hydrogel to regenerate cartilage fraction of osteochondral lesions created in rabbit femoral condyles.

Therefore, in a preliminary study, the *in vitro* behavior of cell populations obtained from two sources of adipose tissue in rabbits (abdominal and infrapatellar fat) were compared in order to choose the optimal source for the development of tissue-substitutes to be used in later stages of the study. A greater number of mesenchymal stem cells were obtained from infrapatellar fat pad, with proliferative capacity and multipotentiality similar to those derived from abdominal tissue.

In a first stage of the study, the *in vitro* behavior of chondrocyte cell populations derived from infrapatellar fat and hyaline cartilage inside three-dimensional scaffolds made up with hyaluronic acid and plasma was analyzed. Those matrices were found to allow proliferation of both cell populations therein, but also promote re-differentiation of articular chondrocytes expanded in monolayer and acquisition of chondroid characteristics by mesenchymal stem cells derived from adipose tissue *in vitro*.

In a second stage of the study, osteochondral lesions were created in femoral condyles of adult rabbits. Constructs processed *in vitro* in the

previous stage were used for regeneration of chondral fraction of the osteochondral lesions. Lesion's bone fractions were previously reconstructed by applying bone allograft. Results showed that application of articular chondrocytes embedded in a plasma-hyaluronic scaffold promoted the formation of hyaline cartilage *in vivo*, while stem cells derived from adipose tissue chondrogenically differentiated produced an atypical cartilage tissue.

Therefore, methodology used in this study seems suitable for the treatment of osteochondral lesions, although it would be necessary to check long-term evolution of treated lesions and deepen the chondrogenic behavior of stem cells from adipose tissue.

### III- INTRODUCCIÓN

---



La ausencia de tratamientos plenamente satisfactorios para la resolución de patologías osteocondrales ha promovido la búsqueda de alternativas terapéuticas que reproduzcan o favorezcan los procesos endógenos de reparación tisular del organismo. El mayor conocimiento de la composición y el funcionamiento de los tejidos implicados, junto con los avances de las técnicas de ingeniería tisular, han motivado el desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas en el campo de las terapias avanzadas.

En la presente Introducción se repasarán las características de los principales tejidos implicados en las patologías articulares, así como de la etiología y clasificación de las lesiones osteocondrales. Finalmente, se abordarán las diferentes opciones terapéuticas disponibles en la actualidad así como las nuevas perspectivas para el tratamiento de las lesiones osteocondrales.

### ESTRUCTURA DE LA ARTICULACIÓN

Las diartrosis o articulaciones móviles constituyen la conexión funcional entre los huesos del esqueleto, permitiendo el desplazamiento de los mismos y haciendo así posible el movimiento. La integridad articular depende del estado de todos los elementos que constituyen la articulación, principalmente el cartílago articular y el hueso subyacente, pero también el líquido sinovial y los tejidos blandos peri-articulares<sup>1</sup>.

El hueso y el cartílago son tejidos conectivos muy especializados con una estructura y composición únicas que garantizan el correcto comportamiento biomecánico de la articulación<sup>2</sup>.

## **EL CARTÍLAGO ARTICULAR**

---

El cartílago articular es una variedad de tejido conectivo altamente especializado. Cada superficie articular está revestida por cartílago hialino, que se adhiere íntimamente al hueso subyacente, fusionándose con él y permitiendo el deslizamiento de los huesos implicados en la articulación de manera fluida, pese a las presiones a las que se ve sometido, y garantizando la capacidad de movimiento del individuo<sup>3</sup>.

A pesar de tratarse de un tejido súper-especializado, su composición es relativamente sencilla. Está compuesto por un único tipo celular, el condrocito, y una matriz extracelular altamente hidratada formada principalmente por colágeno y proteoglicanos. Se trata además de un tejido aneural, avascular y alinfático, cuyas células son prácticamente incapaces de dividirse, por lo tanto, el tejido cartilaginoso presenta una limitada capacidad de regeneración tras sufrir cualquier tipo de alteración y las lesiones destructivas son irreversibles<sup>4</sup>.

### **Componente celular del cartílago articular**

El condrocito y su forma inmadura, el condroblasto, de origen embriológico mesodérmico, son los únicos componentes celulares del cartílago hialino, representando solamente el 1-10% del volumen tisular total. Es la célula encargada de la síntesis de la matriz cartilaginosa, así como de su mantenimiento, mediado por la respuesta a estímulos mecánicos, factores de crecimiento y hormonas<sup>5</sup>.

Durante su desarrollo a partir de las células mesenquimatosas, los condroblastos están estrechamente adosados entre sí, conformando grupos denominados centros de condricación. Realizan una intensa actividad de síntesis, para lo que poseen un núcleo grande con un

nucléolo aparente y un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso muy desarrollados, con abundantes vesículas de secreción<sup>6</sup>.

A medida que los condroblastos quedan rodeados de la matriz extracelular que ellos mismos producen, se van separando, quedando incluidos en el interior de pequeñas lagunas o condroplastos. En su estado natural, las células llenan los condroplastos y se conectan directamente con la matriz cartilaginosa, pero tras procesarse mediante técnicas histológicas habituales, dada la alta hidratación del tejido, se produce una retracción celular que permite la visualización de las lagunas<sup>7</sup> (Figura-1-).

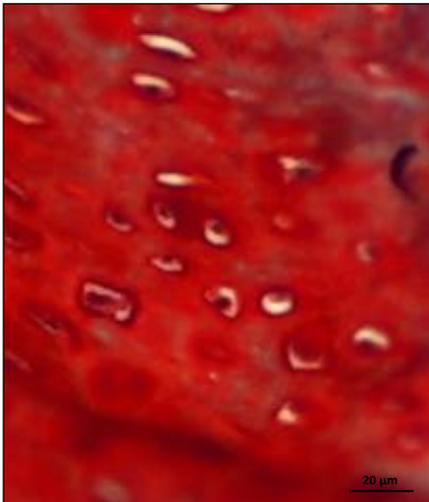


Figura-1- Condrocitos embebidos en la matriz cartilaginosa. Puede observarse el condroplasma o laguna condrocitaria en la que las células están situadas dentro de la matriz extracelular. Tinción safranina-O, microscopía óptica de campo claro.

Cuando madura, la actividad metabólica de la célula disminuye y por lo tanto también lo hace el volumen de su citoplasma. Además, se reduce su capacidad de división, pero no desaparece totalmente. En el cartílago adulto pueden observarse parejas o grupos de condrocitos, denominados grupos isógenos, que provienen de una misma célula que ha sufrido mitosis<sup>7</sup>.

El condrocito maduro presenta comunicaciones directas de su membrana con la matriz extracelular que le rodea. Mediante ese

contacto, la célula detecta estímulos mecánicos y bioquímicos que activan su división y/o su capacidad de síntesis<sup>8</sup>. Los últimos estudios sugieren que, además de comunicarse directamente con la matriz extracelular, los condrocitos se conectan físicamente también entre sí mediante finas prolongaciones del citoplasma, y la comunicación célula-célula se produce a través de canales conexinas (uniones Gap). Estos canales conforman una red de comunicación celular que permite el acoplamiento metabólico y el intercambio de información, favoreciendo la aparición de una respuesta coordinada y uniforme ante cualquier estímulo o daño<sup>9</sup>.

### **La matriz cartilaginosa**

El condrocito es, por tanto, el encargado del mantener la integridad de la matriz extracelular en la que está inmerso y, a su vez, esta matriz es la que lo sustenta, proporcionándole un entorno adecuado, permitiendo la difusión de nutrientes y constituyendo el medio a través del cual llega al condrocito cualquier estímulo químico o mecánico<sup>8,10</sup>.

La matriz cartilaginosa es un tejido altamente hidratado. El agua representa un 60-80% de su peso, y su composición la completan principalmente 2 tipos de moléculas: el colágeno, que representa un 10-30% del peso, y los glicosaminoglicanos (GAG), que constituyen otro 3-10%<sup>10</sup>.

El colágeno es la proteína mayoritaria en el cartílago articular, constituyendo un 40% de su peso seco. Aunque pueden encontrarse pequeñas cantidades de colágeno tipo VI, IX, X y XI, el tipo de colágeno mayoritario del cartílago articular sano es el colágeno tipo II, que representa un 90-95% del colágeno total<sup>11</sup>.

La organización de las fibras de colágeno forma un entramado tridimensional a modo de malla orientado para descargar las fuerzas de tracción y cizallamiento y proporcionar así resistencia a la tensión. En el cartílago articular, las fibras de las zonas más profundas se disponen de forma vertical conformando columnas que se extienden hasta la unión del cartílago con el hueso, mientras que las fibras de la zona más externa están orientadas paralelamente a la superficie<sup>11</sup>.

Los tipos de colágeno IX y X se unen covalentemente al colágeno tipo II, pasando a formar parte de la estructura de esta malla fibrilar, contribuyendo a darle forma y estabilidad y a conectarla con los proteoglicanos. El colágeno tipo VI se localiza principalmente en el espacio pericelular del condrocito, manteniendo unida la célula a la matriz. El colágeno tipo X aparece solamente en la zona cercana a las células de la matriz calcificada, lo que sugiere que participa en la mineralización del cartílago<sup>5</sup>.

En la red fibrilar constituida por colágeno se encuentran atrapadas macromoléculas de glicosaminoglicanos. Los GAG son polisacáridos largos sin ramificaciones constituidos por repeticiones de una unidad de disacáridos. Los GAG presentes en el cartílago articular son el condroitín sulfato y el queratán sulfato (que se unen a proteínas para formar proteoglicanos), y el ácido hialurónico<sup>11,10</sup>.

Los proteoglicanos están compuestos por una proteína central de la que irradian cadenas de disacáridos (GAG como el condroitín sulfato y el queratán sulfato) con una configuración de tipo cepillo. El extremo globular de la molécula de proteoglicano está unido a una larga molécula de ácido hialurónico mediante una proteína de enlace<sup>12</sup> (Figura-2-).

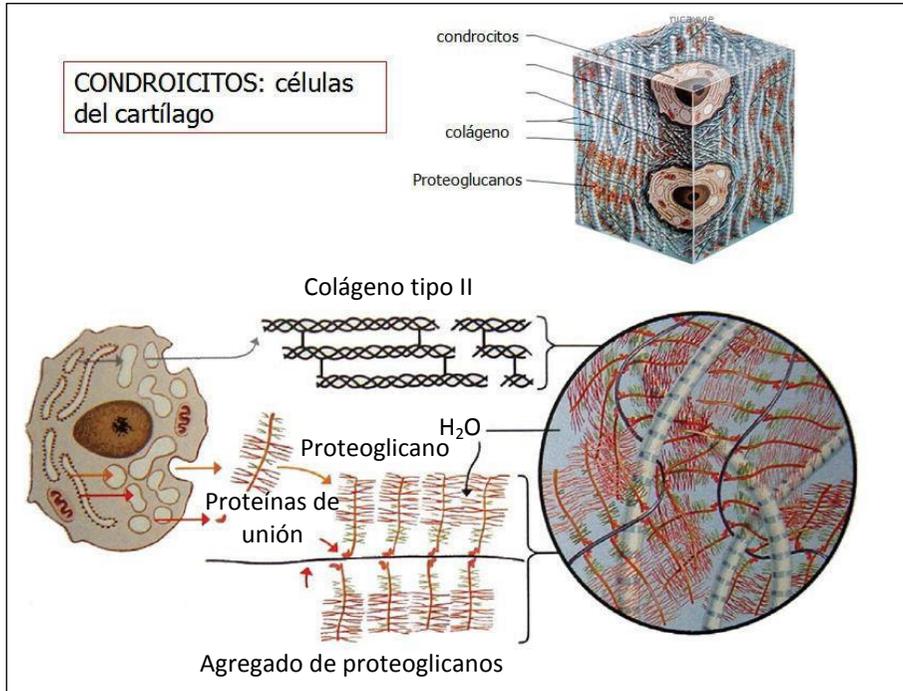


Figura-2- Síntesis e interacción de los componentes de la matriz extracelular del cartílago articular. Tomado y modificado de Buckwalter JA, Martin J. Degenerative joint disease. Clinical symposia (Summit, NJ : 1957). 1995 Jan;47(2):1-32<sup>12</sup>.

El ácido hialurónico es el único GAG no sulfatado y que no se encuentra unido covalentemente a una proteína como un proteoglicano. Los polímeros de ácido hialurónico son de gran tamaño (con pesos moleculares entre  $10^5$  y  $10^7$  daltons), y se asocian a entre 80 y 200 unidades de proteoglicanos por medio de proteínas de enlace, formando agregados lo suficientemente grandes como para quedar atrapados en la trama de fibras de colágeno de la matriz cartilaginosa<sup>5</sup>.

Cada disacárido contiene al menos un grupo carboxilo o sulfato cargado negativamente, por lo que los GAG constituyen largas filas de cargas negativas que repelen otras moléculas cargadas negativamente y atraen cationes, presentando un comportamiento hidrófilo. A través de este mecanismo, los proteoglicanos de la matriz pueden atrapar un gran

volumen de agua, la mayor parte de la cual queda alojada en los intersticios de la trama fibrilar de colágeno<sup>10</sup>.

La capacidad del cartílago para resistir y recuperarse de las fuerzas de compresión está íntimamente relacionada con la disposición del agua en su matriz. Cuando el cartílago articular es sometido a una fuerza compresiva, el agua se desplaza en su matriz alejándose de las regiones con carga eléctrica de los proteoglicanos. Esto hace que las cargas negativas de los grupos carboxilo y sulfato se aproximen y las fuerzas de repulsión de las mismas permiten resistir la compresión. Al desaparecer la presión, el agua retorna a las regiones con carga eléctrica de los proteoglicanos y devuelve el estado de hidratación normal de la matriz, restableciéndose la estructura natural del cartílago<sup>11</sup>.

Así pues, el entramado fibrilar de colágeno mantiene la configuración del tejido y aporta resistencia a las fuerzas de tensión, mientras que los agregados de proteoglicanos embebidos en la matriz colágena proporcionan un gel hidratado y firme que absorbe las fuerzas de compresión<sup>10</sup>.

### **Organización del cartílago articular**

La distribución de los elementos que conforman el cartílago articular no es homogénea y varía de la zona más superficial a la más profunda, distinguiéndose 4 capas o zonas cuyos límites no están perfectamente definidos<sup>10,11</sup> (Figura-3-).

#### **1. Capa superficial o tangencial:**

La capa más superficial, adyacente a la cavidad articular, tiene unos 40  $\mu\text{m}$  de grosor. Está constituida por finas fibras colágenas que se

disponen paralelamente a la superficie para soportar las fuerzas de cizallamiento durante el movimiento articular. La matriz de esta capa superficial es pobre en proteoglicanos respecto a otras zonas del cartílago, y los condrocitos en ella inmersos muestran una morfología ovoide o alargada, dispuestos de forma paralela a la superficie y con escasa actividad metabólica.

## 2. Capa intermedia o de transición:

Con unos 500  $\mu\text{m}$  de grosor, esta zona presenta fibras de colágeno más gruesas dispuestas de manera dispersa, en los tres planos del espacio, y tiene una mayor concentración de proteoglicanos. Los condrocitos presentes en esta capa tienen una morfología redondeada, se disponen irregularmente y presentan una mayor actividad metabólica que los de la capa superficial.

## 3. Capa profunda o radial:

De unos 1000  $\mu\text{m}$  de grosor, esta capa posee fibras colágenas más gruesas, distribuidas radialmente formando arcos perpendiculares a la superficie articular. Posee la mayor concentración de proteoglicanos y menor contenido en agua. Los condrocitos de esta zona son esféricos, con una elevada actividad de síntesis proteica, y adoptan una disposición columnar perpendicular a la superficie, a menudo en grupos de 2 a 8 células.

## 4. Capa calcificada:

Capa adyacente al hueso subcondral, con unos 300  $\mu\text{m}$  de grosor y separada de la capa radial o profunda por una línea basófila de unos 5  $\mu\text{m}$  de grosor denominada línea de calcificación o *tidemark*, por su semejanza a la línea o huella de la marea.

Las fibras colágenas se disponen perpendicularmente a la superficie anclando el cartílago articular al hueso subyacente, aunque no guardan continuidad con las fibras colágenas del hueso subcondral. En esta zona están ausentes los proteoglicanos y existe una escasa celularidad, con unos condrocitos de menor tamaño que los de la zona radial. La matriz está calcificada, presentando depósitos de hidroxapatita entre las fibras colágenas.

La composición, organización y función de la matriz extracelular varía también según la distancia a la célula, siendo posible distinguir tres regiones: la región pericelular, la región territorial y la región interterritorial<sup>10,11</sup>.

Las regiones pericelular y territorial corresponden a la parte de la matriz más cercana a las células. Estas regiones son ricas en proteoglicanos y colágeno tipo VI y se encargan de proteger a los condrocitos del daño durante la carga y la consiguiente deformación del tejido cartilaginoso. Además, regulan el tránsito de moléculas y metabolitos desde la matriz al condrocito y viceversa.

La matriz interterritorial constituye la mayor parte del volumen de la matriz del cartílago y contiene fibras colágenas de mayor diámetro que no se organizan alrededor del condrocito si no que cambian su orientación, de paralela a perpendicular en función de la profundidad, como se ha descrito anteriormente.

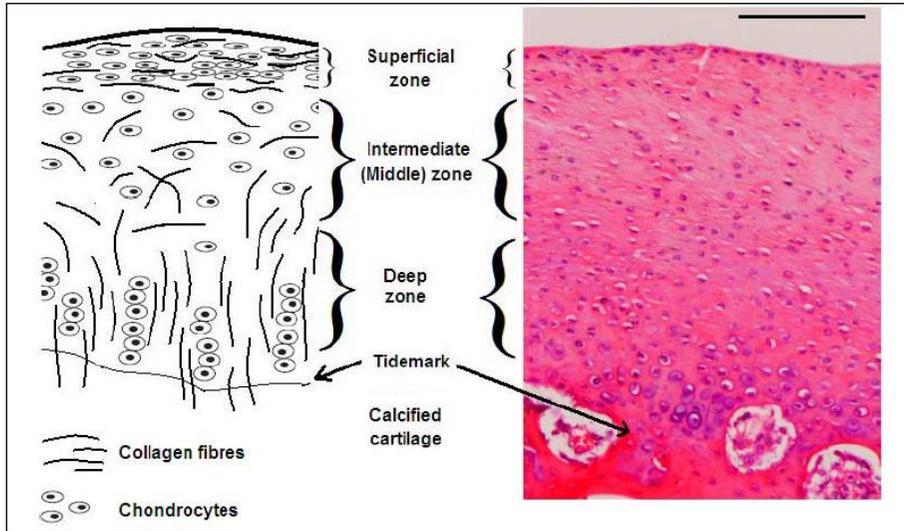


Figura-3- Disposición en capas de los principales elementos constituyentes del cartílago articular. Tomado de Matsiko A, Levingstone T, O'Brien F. *Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair*. Materials. 2013 Feb 22;6(2):637–

### Nutrición del cartílago articular

Dado que el cartílago es un tejido avascular, los nutrientes que necesita provienen principalmente del líquido sinovial y, en menor medida, del hueso subcondral<sup>13,14</sup>. Así pues, los condrocitos obtienen todos sus nutrientes y eliminan sus desechos por mecanismo de difusión a través de la matriz<sup>1</sup>.

El líquido sinovial es un dializado de plasma que se produce por filtración vascular en el tejido sinovial. Contiene pocas células y proteínas, pero es rico en ácido hialurónico, que es segregado por los sinoviocitos de la membrana sinovial y que le confiere una elevada viscosidad. Esa viscosidad es la responsable de la capacidad del líquido sinovial de actuar como lubricante articular y amortiguar impactos<sup>5</sup>.

La superficie del cartílago articular, aparentemente lisa, está en realidad llena de ondulaciones y crestas que atrapan el líquido sinovial. Éste

forma una fina capa sobre el cartílago articular y su infiltración en la matriz cartilaginosa se ve estimulada por las fases de compresión-descompresión durante el movimiento articular<sup>10</sup>. El agua y los solutos de pequeño tamaño (principalmente glucosa) son los únicos capaces de atravesar la matriz. Su transporte se realiza por mecanismo de difusión en el curso de los movimientos articulares.

Una cualidad destacable del cartílago articular es que se trata de uno de los pocos tejidos que funcionan en hipoxia. Hay un gradiente hipóxico que varía del 10% de concentración de oxígeno en la capa superficial (proporcionado por el líquido sinovial), al 1% en la zona más profunda del cartílago. El condrocito articular está, por tanto, expuesto a tensiones muy bajas de oxígeno, haciendo de la glucosa su principal sustrato energético mediante glucólisis anaeróbica<sup>11</sup>.

## EL HUESO

---

Tanto el tejido óseo como el cartilaginoso son tejidos conjuntivos que se caracterizan porque sus células están rodeadas de una matriz intercelular sólida y relativamente rígida. En casi todos los demás aspectos el tejido óseo difiere considerablemente del cartilaginoso.

### **Componente celular: osteoblastos, osteocitos y osteoclastos**

Al contrario que en el cartílago, en el tejido óseo existe una gran actividad celular. Este tejido se renueva continuamente gracias a la actividad coordinada de sus células (Figura-4-).

- Los osteoblastos son las células formadoras de hueso. Son de origen mesenquimal y se encargan de sintetizar matriz ósea. Se sitúan sobre la superficie ósea y secretan la fracción orgánica de la matriz,

- conformando el osteoide. También participan en la mineralización de la sustancia intercelular mediante secreción de vesículas ricas en calcio, fosfato y la enzima fosfatasa alcalina<sup>15,16</sup>. Los osteoblastos son células grandes (20-30  $\mu\text{m}$ ), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplasmático rugoso desarrollados<sup>17</sup>. Depositán hueso por aposición y poco a poco quedan embebidos en la matriz que ellos mismos sintetizan, pasando a formar parte del hueso neoformado y convirtiéndose en osteocitos.
- Los osteocitos se encuentran inmersos en la matriz ósea y constituyen el componente celular mayoritario del hueso. Poseen forma estrellada y un citoplasma pequeño y se sitúan en el interior de lagunas extendiendo prolongaciones citoplasmáticas que se proyectan en la matriz a través de finos canalículos. Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, aunque se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción<sup>17</sup>.
  - Los osteoclastos son las células encargadas de la reabsorción ósea. Se trata de células de origen hematopoyético, grandes (100  $\mu\text{m}$ ), multinucleadas, con citoplasma acidófilo y ricas en mitocondrias y vacuolas. Se adhieren directamente al hueso mediante una zona de ribete en cepillo y secretan ácidos y enzimas proteolíticas solubilizando la matriz ósea para reabsorber el hueso por endocitosis.

La actividad coordinada de estas células permite que el hueso sea uno de los tejidos más dinámicos del organismo, constituyendo una reserva de calcio para el individuo y demostrando una gran capacidad de regeneración tras sufrir una alteración<sup>18</sup>.

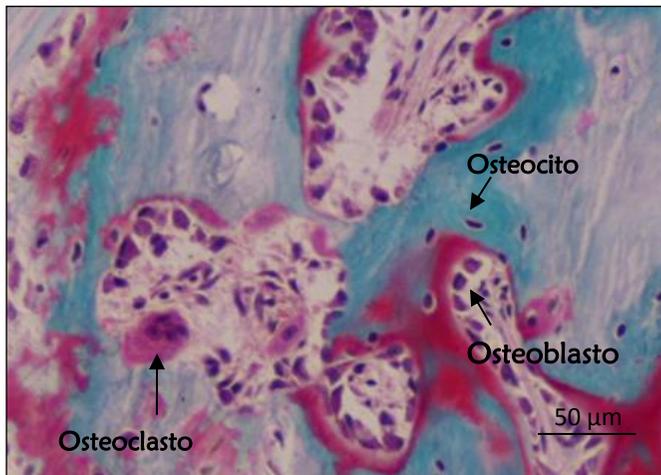


Figura-4- Corte histológico en el que se observan osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. Técnica T. Goldner, microscopía óptica de campo claro.

### La matriz ósea

La matriz ósea es la responsable de las propiedades biomecánicas del tejido óseo. Está constituida por una fase orgánica y una fase inorgánica o mineral<sup>17</sup>.

La matriz orgánica del hueso está formada por colágeno, principalmente de tipo I, además de otras proteínas específicas del hueso como son la osteocalcina, la osteonectina y la osteopontina, relacionadas con la calcificación del componente fibrilar.

Los componentes orgánicos son sintetizados y secretados por los osteoblastos, y constituyen una malla densa denominada osteoide que sirve de base para el depósito del componente mineral. Además, la fracción orgánica dota al hueso de su forma y contribuye a su capacidad de resistencia a la tracción.

La fracción inorgánica o mineral de la matriz ósea está formada principalmente por fosfato cálcico depositado en forma de cristales de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ). La formación de sales minerales está

regulada por la fosfatasa alcalina (enzima de la membrana de los osteoblastos). Estas sales salen de la célula por exocitosis en vesículas que posteriormente liberan los cristales que son fijados sobre las fibras colágenas.

El componente mineral del hueso le otorga su característica dureza, resistencia a la compresión y lo convierte en una reserva natural de calcio para el organismo.

El hueso es un tejido anisótropo en el que la resistencia varía según la orientación de la carga aplicada, porque su estructura no es uniforme. La organización típica de un hueso largo consiste en una estructura cilíndrica de hueso cortical compacto cuyos extremos están cubiertos de cartílago articular y rellenos de un andamiaje interno de hueso esponjoso<sup>19</sup>.

El hueso está cubierto de una membrana de periostio en su superficie externa (excepto en las superficies articulares y las zonas de inserción de tendones y ligamentos), y limitado por el endostio en sus superficies internas (cavidades vasculares, medulares y superficies trabeculares)<sup>20</sup>.

Macroscópicamente, los huesos largos se dividen en 4 regiones principales: epífisis, físis, metáfisis y diáfisis. Las placas de crecimiento o físis se sitúan cerca de los extremos del hueso y separan las epífisis, localizadas bajo la superficie articular, de las metáfisis, que conectan las físis con las diáfisis o zona media del hueso<sup>19</sup>.

A nivel microscópico, el hueso maduro se organiza en estructuras funcionales denominadas osteonas: círculos lamelares concéntricos de tejido óseo alrededor de canales centrales (conductos de Havers), que contienen capilares sanguíneos y fibras nerviosas dispuestas paralelamente al eje longitudinal del hueso<sup>21</sup>.

El hueso esponjoso de las epífisis y metáfisis está compuesto de trabéculas que forman una malla porosa que soporta el hueso cortical y el hueso subcondral bajo el cartílago articular.

En la mayoría de tejido óseo normal, maduro, las fibras de colágeno tienen una orientación lamelar que es paralela al contorno de la superficie ósea. Pero en el hueso inmaduro, recién formado, como el presente en la placa de crecimiento de los huesos jóvenes o en el callo óseo de fracturas o lesiones en fase de remodelado, las fibras de colágeno observadas con luz polarizada están orientadas al azar. Este hueso se forma rápidamente pero no es tan fuerte o resistente como el lamelar.

### El hueso subcondral

El cartílago articular descansa sobre una porción de hueso situada inmediatamente por debajo de él, cuya integridad es fundamental para garantizar la congruencia articular: el hueso subcondral<sup>22</sup> (Figura-5-).



Figura-5- Corte histológico teñido con V. Kossa en el que se observa el hueso subcondral de color negro inmediatamente por debajo del cartílago articular y en contacto con él. Microscopía óptica de campo claro.

El hueso subcondral se define como la placa de hueso que soporta al cartílago, pero con frecuencia se refiere también al hueso trabecular

subyacente<sup>23</sup>. Desempeña un importante papel en la distribución de fuerzas mecánicas que se ejercen en la articulación, de manera que la arquitectura del hueso subcondral responde a los cambios que tienen lugar en el cartílago articular<sup>24</sup>.

Ambas estructuras están íntimamente ligadas histológica y funcionalmente. El hueso subcondral separa el hueso epifisiario esponjoso y rico en médula, del cartílago articular, dando un apoyo estable y resistente al cartílago, y aislando el ambiente sanguíneo y vascular propio del hueso del entorno avascular del cartílago, para evitar su osificación.

En una articulación sana, el hueso subcondral atenúa las cargas recibidas al absorber entre un 30-50% de la carga, mientras que el cartílago únicamente absorbe un 1-3%<sup>25</sup>. Así pues, la salud del hueso subcondral es fundamental para garantizar un óptimo comportamiento biomecánico de la articulación<sup>22</sup>.

Ante una sobrecarga epifisiaria por insuficiente protección del cartílago lesionado, se activa el mecanismo de remodelación ósea subcondral provocando la compactación o esclerosis del hueso esponjoso en las zonas con más exigencia mecánica<sup>25,23</sup>.

Cuando el hueso subcondral se esclerosa, disminuye su capacidad de absorción hasta un 50%, y ello supone un aumento de la energía disipada al resto de la articulación, incluido el cartílago, con el consiguiente deterioro de éste<sup>23</sup>.

Así pues, el hueso subcondral desempeña un importante papel en la progresión de la patología condral, dado que un hueso denso o esclerosado, con un elevado nivel de remodelación y de mineralización, es menos competente mecánicamente<sup>22,25,23</sup>.

**PATOLOGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR**

La carga mecánica es necesaria para mantener la integridad articular. De hecho, el grosor y la calidad de la matriz cartilaginosa se ven reducidos en articulaciones inmovilizadas. Incluso en una articulación normal se observan variaciones entre las zonas de carga y las no sometidas a carga: en las regiones sujetas a carga mecánica el cartílago articular es normalmente más grueso y tiene un contenido más alto en proteoglicanos, siendo más resistente mecánicamente<sup>26,24</sup>. Así pues, la fuerza mecánica que recibe una articulación regula las actividades metabólicas del cartílago articular *in vivo*<sup>27</sup>.

Sin embargo, existen situaciones en las que la capacidad de respuesta del cartílago se ve superada por las sollicitaciones que debe soportar, bien sea por el desgaste que conlleva su uso, por traumatismos articulares, o por patologías que afectan al hueso subcondral. Estas circunstancias conducen hacia un proceso destructivo que el organismo es incapaz de reparar por sí mismo.

**ETIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA**

---

Las patologías del cartílago articular son frecuentes y su etiología es multifactorial. Pueden ocurrir de manera lenta y progresiva o de forma aguda.

Existen factores que predisponen a la degeneración del cartílago articular, como son el proceso de envejecimiento natural de los tejidos vivos, la extirpación quirúrgica del tejido meniscal, alteraciones en la alineación de las extremidades, o daños en el hueso subcondral como la

osteocondritis disecante o la necrosis avascular. Sin embargo, la mayoría de las lesiones del cartílago articular están relacionadas con la sobrecarga mecánica, sea ésta aguda (debida a traumatismos articulares) o crónica (degeneración artrósica)<sup>28</sup>.

Diferentes estudios señalan que entre el 10 y el 20% de la población padece algún trastorno osteoarticular, siendo la artrosis la enfermedad articular más frecuente, con una prevalencia de 16,6% en los mayores de 20 años. De ellos, el 10,3% presenta artrosis de rodilla. Si nos centramos en los pacientes con sintomatología dolorosa de la rodilla, entre el 40 y el 60% presentan lesiones condrales<sup>29</sup>.

Las enfermedades osteoarticulares son la primera causa de bajas laborales permanentes, lo que da una idea de la importancia de esta enfermedad, no sólo a nivel socioeconómico, sino también en lo que se refiere a consumo de recursos del sistema sanitario y gasto farmacéutico. Además, la prevalencia de estas enfermedades va en aumento debido al aumento de la vida media de la población y a las patologías degenerativas asociadas a lesiones por sobrecarga durante el ejercicio, con la correspondiente previsión de aumento del coste humano, social y económico<sup>30</sup>.

### **Patología articular debida a traumatismos**

Las lesiones deportivas o las debidas a accidentes son la causa más frecuente de las lesiones osteocondrales traumáticas. Se producen por un impacto directo o por la aplicación de fuerzas de cizallamiento sobre la superficie articular por un mecanismo de acción indirecto (por ejemplo, la luxación de la rótula o la rotura del ligamento cruzado anterior de la rodilla que ocasiona una contusión ósea). La fuerza del

impacto provoca una fractura a través de la matriz del cartílago y, en ocasiones, a través del hueso subcondral.

Los impactos en el cartílago articular conllevan la pérdida de macromoléculas, la rotura de la matriz cartilaginosa y, finalmente, la rotura de la matriz ósea. La respuesta reparadora que se activa desde el hueso subcondral produce un tejido fibroso que para nada mantiene las propiedades biomecánicas del cartílago hialino y es, por lo tanto, incapaz de soportar las sollicitaciones a las que se ven sometidas las articulaciones de carga. Las lesiones articulares traumáticas no tratadas evolucionan hacia una degeneración de la superficie articular, pudiendo desencadenar un proceso artrósico<sup>31</sup>.

### **Patología articular asociada al desgaste**

La causa de las lesiones degenerativas del cartílago articular es el desgaste por fatiga como resultado de la acumulación de presiones repetidas que se traducen en un daño microscópico (que también pueden ser iniciado por un traumatismo)<sup>10</sup>. Esta fatiga puede aparecer tanto por la aplicación breve de cargas elevadas, como por la aplicación prolongada de cargas ligeras. El proceso degenerativo artrósico altera la integridad estructural de la articulación, provoca daño enzimático y mecánico de la matriz extracelular y puede llevar a la degeneración del cartílago articular, exposición del hueso subcondral, formación de osteofitos e inflamación de la membrana sinovial<sup>11</sup>.

## CLASIFICACIÓN DE LAS LESIONES

---

Para establecer el grado de las lesiones condrales, se considera como criterio básico la profundidad de las mismas. La *International Society of Cartilage Repair* (ISCR) establece 4 grados de daño tisular<sup>32,33</sup>:

- **Grado 0**: cartílago intacto.
  
- **Grado I**: lesión condral superficial (fisuras o grietas).  
A causa de un impacto intenso o de múltiples traumatismos de menor energía se pueden producir microfracturas en la matriz cartilaginosa con la consiguiente muerte celular, lo que repercute de forma negativa en la matriz extracelular. La matriz se degrada en sus constituyentes: se produce un descenso en la concentración de proteoglicanos, un aumento de la hidratación tisular y una alteración de la organización fibrilar del colágeno. Estos cambios conducen a una reducción de la rigidez del cartílago y al aumento de su permeabilidad y pueden aumentar la vulnerabilidad de la matriz extracelular ante nuevas lesiones. Este tipo de lesiones superficiales son a menudo asintomáticas y difíciles de detectar. Se desconoce también el margen reparativo del cartílago en estas situaciones.
  
- **Grado II**: lesión condral de menos de la mitad del espesor del cartílago articular.  
Se trata de lesiones parciales del cartílago articular. En este caso los traumatismos son de mayor energía que en las lesiones microscópicas del cartílago articular. Inmediatamente después de producirse la lesión, los condrocitos próximos a ella comienzan a

necrosarse, con la consiguiente activación del proceso de degradación de la matriz extracelular. Después, las células que aún son viables muestran cierta actividad mitótica y activan la producción de proteínas de la matriz. Pero las tentativas de reparación celular son infructuosas, puesto que el incremento en la actividad metabólica es transitorio e insuficiente para cicatrizar la lesión. Con el tiempo, en las zonas adyacentes a la lesión suele apreciarse fibrilación y fisuras del cartílago.

- **Grado III:** lesión condral de más de la mitad del espesor del cartílago articular que puede llegar a la capa calcificada.

Se trata de lesiones profundas que no llegan a afectar al hueso subcondral. El comportamiento de este tipo de lesiones es similar a las de grado II, aunque en este caso las lesiones muestran algún revestimiento fibroso y un mayor acúmulo celular. No obstante, este proceso reparativo es limitado y no es capaz de rellenar y reparar la lesión. Además, los defectos condrales de mayor entidad pueden conducir a cambios degenerativos del resto de la articulación. La lesión de gran parte del cartílago acaba implicando al hueso subcondral, que se engruesa y calcifica en exceso, con el consiguiente adelgazamiento del cartílago articular, lo cual puede suponer el punto de inicio de un proceso artrósico. Por otra parte, las manifestaciones clínicas de las lesiones condrales (grados II y III) son variables: dolor, crepitación, derrame articular, incluso bloqueo articular u otros signos mecánicos si se liberan fragmentos de cartílago a la articulación.

- **Grado IV:** lesión cartilaginosa con extensión al hueso subcondral (lesión osteocondral)

Se trata de lesiones de espesor total que afectan a la capa condral y al hueso subcondral, de manera que se produce compromiso vascular y la médula ósea subyacente queda expuesta en mayor o menor grado. El hematoma post-traumático activa una respuesta inflamatoria en la que la formación del coágulo de fibrina va seguida de la migración de las células progenitoras de la médula ósea a la zona de la lesión para iniciar el proceso de reparación. El tejido que se produce es de tipo fibrocartilaginoso, que difiere del cartílago hialino en su composición química y en sus propiedades biomecánicas. La remodelación de ese tejido fibroso en el cartílago se produce entre las 6 y las 12 semanas después de la afectación del hueso subcondral. Por encima de los 3 meses el proceso reparador no continúa. Por el contrario, algunas zonas del cartílago con aspecto similar al hialino degeneran, convirtiéndose en tejido fibroso.

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 cual, con el tiempo y la carga, conduce a la artrosis y compromete el futuro de la fisiología articular.

En la parte ósea de la lesión se producen fenómenos de remodelado óseo con gran actividad osteoclástica y osteogénica generando un tejido óseo inmaduro que posteriormente es reemplazado de forma gradual por tejido maduro lamelar.

**ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS**

El tratamiento de las lesiones del cartílago articular sigue hoy día suponiendo un reto para el especialista ya que no existe ninguna técnica ampliamente aceptada para la reparación satisfactoria de las lesiones condrales.

Los procedimientos quirúrgicos están indicados en pacientes en los que, tras un tratamiento previo conservador, no hay una remisión de la clínica dolorosa. De entre ellos, el reemplazo articular es el que mejores resultados proporciona en la población anciana, relativamente sedentaria, aunque con los riesgos y complicaciones que le son propios. En el mejor de los casos, tras una media de 15-20 años se produce el aflojamiento protésico, que obliga al correspondiente recambio, a menudo difícil y con peores resultados que la cirugía primaria. Por todo ello, en general, se acepta que el reemplazo total de la articulación no es una opción de tratamiento realista en pacientes jóvenes<sup>34</sup>.

Existen 3 tipos de procedimientos quirúrgicos para el tratamiento de las lesiones del cartílago articular antes de valorar el implante protésico: los basados en la reparación, los basados en la reconstrucción y los que lo hacen en la regeneración del tejido<sup>35</sup>. La elección del tratamiento depende de la edad del paciente, de su nivel de actividad, de la etiología y del grado de la lesión. Se han propuesto diferentes algoritmos de tratamiento, uno de los más utilizados es el propuesto por Cole<sup>36</sup> (Figura-6-).

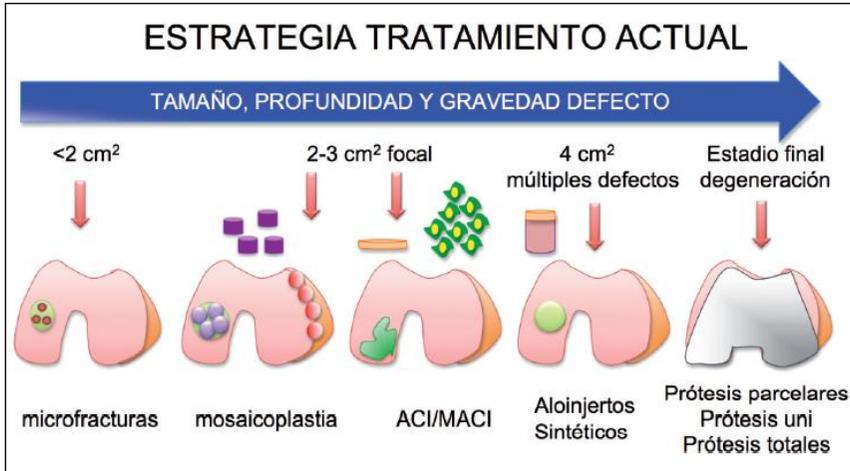


Figura-6- Indicaciones generales para el tratamiento de las lesiones condrales. Tomado de Álvarez, E. Ripoll, P. Restrepo, A. Forriol F. Revisión de la Reparación del Cartílago. Posibilidades y resultados. Trauma Fund MAPFRE. 2010;21(2):117-34<sup>35</sup>.

## MÉTODOS REPARADORES

Estos métodos buscan preservar o restaurar la función articular, aliviar el dolor y frenar la progresión hacia la artrosis.

### Desbridamiento artroscópico

El desbridamiento artroscópico consiste en regularizar las superficies articulares y eliminar cuerpos libres evitando dañar el cartílago sano y exponer el hueso subcondral. Consigue eliminar elementos mecánicamente irritantes de la cavidad articular y obstáculos para la movilidad de la articulación. Está indicado cuando hay síntomas meniscales y lesiones condrales parciales, pero su efecto es paliativo y nunca curativo. El alivio de los síntomas producido por el desbridamiento es inicialmente bueno, con el 80% de mejoría durante el primer año, pero los resultados se deterioran con el tiempo<sup>5</sup>.

### Técnicas de estimulación medular

Se trata de un conjunto de técnicas que incluye perforaciones, artroplastia de abrasión y microfracturas que buscan estimular el hueso subcondral del fondo de la lesión para provocar su activación metabólica y/o sangrado, con la consiguiente formación de un coágulo que ocupa la lesión y le aporta células progenitoras provenientes de la médula ósea<sup>35</sup> (Figura-7-).

El estímulo del hueso subcondral logra generar un tejido cartilaginoso que rápidamente degenera y evoluciona a fibrocartílago. Este tejido reparado no posee las propiedades mecánicas y la durabilidad del cartílago hialino<sup>5</sup>.

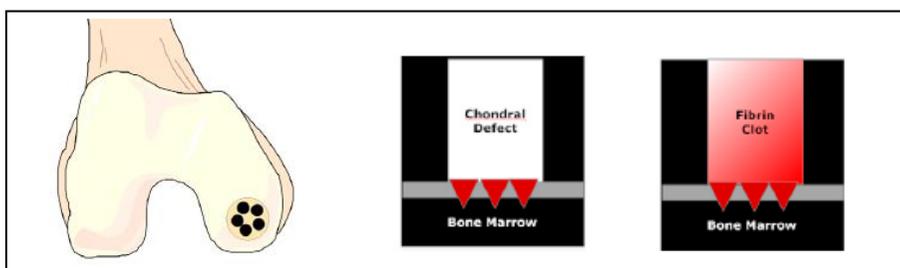


Figura-7- Esquema representativo de la técnica de microfractura. Las múltiples perforaciones en el hueso subcondral hacen accesible el flujo sanguíneo desde la médula ósea, con la correspondiente formación del coágulo de fibrina y el acceso de las células reparadoras de la médula ósea. Tomado de Cole B, Pascual-Garrido C, Grumet R. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. The Journal of Bone & Joint. 2009;91(7):1778–90<sup>36</sup>.

### **MÉTODOS RECONSTRUCTIVOS**

Ante lesiones que afectan al hueso y al cartílago, parece lógico plantear estrategias terapéuticas que traten de reparar ambas estructuras. En este sentido, los métodos reconstructivos tratan de reestablecer la unidad funcional cartílago hialino-hueso subcondral en la zona de la lesión.

Suelen utilizarse uno o varios cilindros de tejido osteocondral que pueden ser de origen autólogo u homólogo, así como cilindros sintéticos.

### **Autoinjertos**

El trasplante osteocondral autólogo es un método eficaz para reconstruir lesiones articulares de espesor completo. La técnica consiste en seccionar cilindros osteocondrales, que incluyen cartílago intacto y hueso subcondral sano y son obtenidos de zonas articulares de no carga, y transferirlos al área afectada de la articulación. La técnica puede realizarse por vía artroscópica, en el caso de lesiones de pequeño tamaño, o a través de artrotomía cuando el defecto es mayor<sup>36</sup>.

Pueden emplearse uno o varios cilindros (mosaicoplastia), según el tamaño de la lesión, siempre teniendo en cuenta que en los espacios que queden entre los diferentes cilindros no se formará cartílago. Así pues, para garantizar un buen resultado, lo ideal es colocar un solo cilindro osteocondral, si el tamaño de la lesión lo permite, incorporado a presión para garantizar el contacto con el tejido circundante y la congruencia articular, sin olvidar que los impactos dañan el cartílago articular y disminuyen la viabilidad de sus células<sup>35</sup>.

Las principales ventajas de esta técnica son su bajo coste, la posibilidad de realizarse en un solo acto quirúrgico y el hecho de que el tejido de reparación es duradero, mostrando resultados histológicos y clínicos satisfactorios<sup>36,37</sup>. Sin embargo, existen importantes limitaciones asociadas a la técnica, como son la morbilidad en el sitio donante<sup>38,37</sup>, y la limitada cantidad de tejido disponible, lo que restringe el tamaño de los defectos que pueden ser tratados a 1-4 cm<sup>2</sup> <sup>39</sup>. Además, la mosaicoplastia está asociada con dificultades técnicas como la pobre

integración tisular, la muerte celular por la impactación y la pérdida de la topografía articular, las cuales pueden limitar la calidad e integridad de la reparación<sup>35</sup>.

### **Aloinjertos u homoinjertos**

El trasplante de aloinjertos osteocondrales constituye una alternativa terapéutica para el tratamiento de grandes defectos condrales. La disponibilidad de tejido de origen cadavérico en los bancos de tejidos hace posible obtener cartílago articular y hueso subcondral sanos, óptimos para su uso en clínica.

Las principales ventajas del aloinjerto con respecto al autoinjerto son su disponibilidad y su adaptabilidad, dado que se pueden diseñar injertos adecuados para el tamaño y curvatura específicos de la lesión a tratar, obtenidos de zonas de carga y en ausencia de morbilidad del sitio donante<sup>35</sup> (Figura-8-). Además, los resultados clínicos muestran buenos resultados a medio plazo<sup>40,34</sup>.

Una de las principales limitaciones de la técnica, además de la dificultad del procedimiento y la posibilidad de reacciones inmunológicas o transmisión de enfermedades, es la muerte celular que ocurre durante la criopreservación del injerto. Al tratarse de un tejido avascular, el cartílago homólogo implantado no recuperará su viabilidad<sup>35</sup>. Para favorecer la supervivencia de las células cartilaginosas y promover así la recuperación de la integridad articular, el aloinjerto puede ser preservado durante cortos periodos de tiempo (unos 20 días) a 4°C o mantenido en condiciones de cultivo a 37°C<sup>40,36</sup>. Esto aumenta la viabilidad de las células presentes en el cartílago, pero también la dificultad técnica del procedimiento al tener que coordinar el proceso de donación-preservación-implante.



Figura-8- Tallado (A, B) e implantación (C) de un aloinjerto osteocondral. Tomado de Cole B, Pascual-Garrido C, Grumet R. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *The Journal of Bone & Joint*. 2009;91(7):1778–90<sup>36</sup>.

### Cilindros sintéticos

El empleo de cilindros osteocondrales sintéticos constituye una atractiva alternativa a los sustitutivos biológicos, puesto que permite obtener un injerto perfectamente adaptado a la lesión en grosor y longitud, de manera logísticamente sencilla (por su disponibilidad inmediata en quirófano y el acortamiento del tiempo quirúrgico), y biológicamente segura (sin riesgo de transmisión de enfermedades ni rechazo inmunológico)<sup>35,41</sup>.

Los cilindros están compuestos por fibras de ácido poli-láctico, ácido poli-glicólico y copolímeros de estos ácidos. Presentan un diseño bicapa y una configuración porosa que permite la invasión por parte de las células nativas, ejerciendo así un papel osteoconductor en la recuperación de la lesión. Se insertan en la lesión y proporcionan una matriz estable teóricamente capaz de favorecer la regeneración del hueso subcondral y el cartílago articular. Además, pueden combinarse con células o factores de crecimiento<sup>42</sup>.

Sin embargo, su eficacia clínica no está totalmente demostrada y son necesarios estudios controlados a largo plazo para confirmar el potencial de estas técnicas. De momento, no parece que puedan sustituir a los auto o aloinjertos<sup>41,35</sup>.

---

## MÉTODOS REGENERATIVOS

---

Los métodos regenerativos pretenden aplicar técnicas de cultivo celular e ingeniería tisular para promover la formación de cartílago hialino en el defecto condral. Los procedimientos más utilizados se basan en el empleo de condrocitos autólogos expandidos *in vitro* aplicados, bien en forma de solución directamente en el defecto (ACI- *Autologous Chondrocyte Implantation*- 1ª generación), bien fijados en membranas colágenas (ACI 2ª generación o MACI), o bien incluidos en matrices tridimensionales (ACI 3ª generación)<sup>43,44</sup>.

El trasplante autólogo de condrocitos viene utilizándose desde 1987 para tratar lesiones articulares y ya son miles de pacientes los que han recibido este tipo de terapia en todo el mundo. Está indicado en pacientes jóvenes, activos, con lesiones femorales localizadas de tamaño superior a 2 cm<sup>2</sup> que no afectan al hueso subcondral y que no han respondido bien a tratamientos reparadores o reconstructivos previos. La salud del hueso subcondral es importante en este tratamiento, puesto que sólo trata el cartílago articular. En el caso de defectos que afecten de manera importante al hueso subcondral es importante tratar previamente la lesión ósea, por ejemplo con aloinjerto óseo, antes de aplicar la técnica ACI<sup>45</sup>.

### ACI 1ª generación

Esta 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. Una vez conseguida la cantidad adecuada de células, mediante artrotomía, se limpia la zona de la lesión dejando márgenes de cartílago sano y respetando el hueso subcondral. A continuación, la población celular obtenida en el laboratorio es

implantada en el defecto condral y éste se recubre con una membrana de periostio que se sutura al cartílago sano y se sella con fibrina (ACI-P)<sup>45</sup> (Figura-9-).

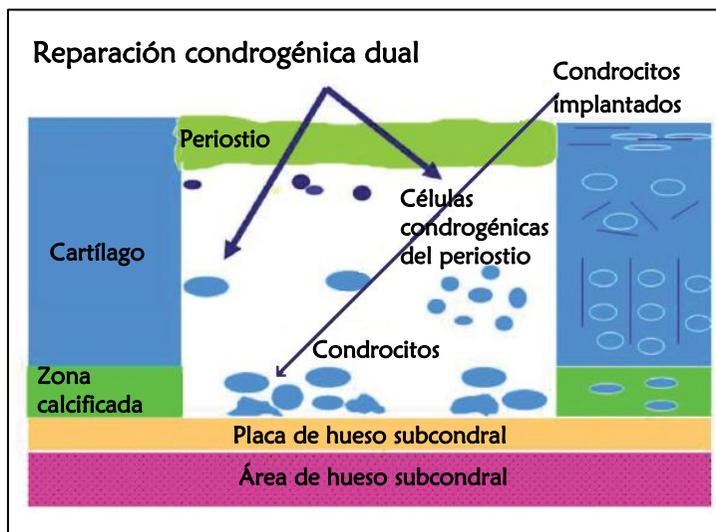


Figura-9- Dibujo esquemático de un defecto condral tratado con la técnica ACI de primera generación. Tomado y modificado de Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation. Technique and long-term follow-up. *Injury*. 2008 Apr;39(1):40–9<sup>44</sup>.

El uso del parche perióstico, además de contribuir a aumentar la complejidad intrínseca de la técnica, puede provocar hipertrofia del injerto. Para sellar el implante se pueden utilizar también membranas de colágeno tipo I/III (ACI-C), que han demostrado reducir la incidencia de hipertrofia asociada al parche de periostio con resultados similares a nivel de regeneración de la lesión<sup>46,47,48</sup>.

Diversos estudios han demostrado la seguridad y eficacia clínica del trasplante de condrocitos autólogos<sup>45</sup>. La técnica ofrece buenos resultados a nivel de recuperación de la funcionalidad de la articulación a corto y medio plazo cuando se aplica en los pacientes adecuados: sintomatología inferior a 3 años, con lesiones condrales de espesor

completo en el cóndilo femoral, con bordes de cartílago sano, sin afectación de hueso subcondral y sin otras afectaciones articulares<sup>49</sup>. Sin embargo, la lesión ideal es casi una excepción en la práctica clínica. La mayoría de las lesiones de rodilla se dan con patología concomitante, lo que dificulta la técnica y reduce las probabilidades de éxito.

Otro 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 expansión *in vitro* durante la cual las células sufren un proceso denominado desdiferenciación, por el que los condrocitos en cultivo adoptan una morfología fibroblástica y su capacidad para sintetizar colágeno tipo II y proteoglicanos se ve disminuida, lo que podría favorecer la formación de fibrocartílago en el defecto en vez de cartílago hialino<sup>50</sup>. Esto podría explicar la naturaleza fibrocartilaginosa del relleno del defecto observada en algunos estudios<sup>51</sup>.

Además, diversos estudios han puesto de manifiesto que esta técnica no produce mejores resultados a largo plazo que otras técnicas de menor coste, como la microfractura o la mosaicoplastia<sup>52</sup>.

Para tratar de minimizar las limitaciones de la técnica ACI, se ha desarrollado una variante del procedimiento que emplea membranas colágenas para cultivo y aplicación de los condrocitos, tratando así de minimizar la dificultad de la técnica y el proceso de desdiferenciación celular durante la expansión *in vitro* (MACI o ACI 2ª generación).

### **ACI 2ª generación**

El ACI de segunda generación o MACI se basa en el cultivo de los condrocitos articulares sobre una membrana, generalmente colágena, que permite su adherencia y proliferación. La expansión celular sobre la

membrana pretende preservar el potencial metabólico y la estabilidad fenotípica de los condrocitos, limitando su desdiferenciación y preservando así su capacidad para sintetizar cartílago hialino<sup>53</sup>.

Para su implante, la membrana que contiene las células, puede ser recortada y adaptada a la forma y tamaño del defecto. Posteriormente se deposita sobre el lecho subcondral y se fija mediante pegamento de fibrina (Figura-10-). Esta técnica garantiza la retención del implante, evitando la fuga de la suspensión celular. Además, permite su aplicación artroscópica<sup>54</sup> y evita el tener que utilizar un parche<sup>55</sup>, por lo que se reduce la morbilidad de la técnica y la posibilidad de reacción hipertrófica asociada al parche de periostio<sup>56,57</sup>, con resultados similares a nivel de recuperación funcional y regeneración de la lesión<sup>58,59</sup>.

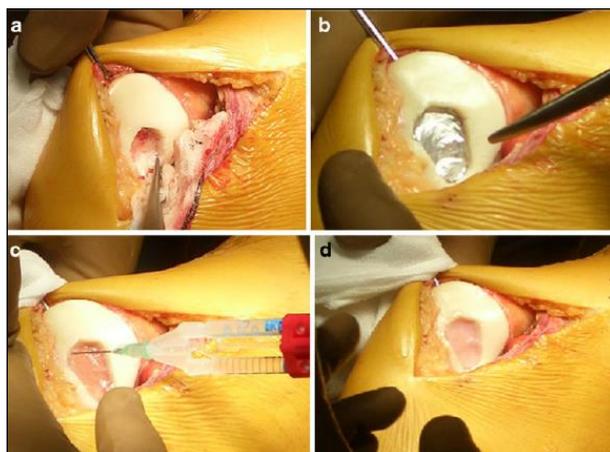


Figura-10- Procedimiento de ACI de segunda generación o MACI: preparación de la lesión (a) estimación del tamaño y forma del defecto (b), preparación del lecho con pegamento de fibrina (c) y colocación de la matriz celular (d).

Tomado de Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *International orthopaedics*. 2010 Jun;34(5): 621–30<sup>39</sup>.

La técnica MACI, por tanto, reduce la complejidad y el tiempo quirúrgico respecto a la primera generación de ACI<sup>60</sup>. Además, acelera la recuperación tras la intervención<sup>61</sup>. Sin embargo, no existen estudios a largo plazo con un número suficiente de pacientes tratados y grupos control que permitan defender con rotundidad la superioridad de esta técnica en cuanto a la calidad del tejido reparado<sup>62</sup> y que justifiquen su elevado coste<sup>57</sup>.

### **ACI 3ª generación**

Durante los últimos años se ha trabajado mucho en el desarrollo de andamiajes tridimensionales que puedan suponer una mejora en la técnica ACI y sus resultados. Estos andamiajes o matrices tratan de proporcionar un ambiente tridimensional que reproduzca, en la medida de lo posible, las condiciones y estímulos a los que los condrocitos se ven expuestos en el organismo vivo, promoviendo así su capacidad de sintetizar la matriz cartilaginosa durante su expansión *in vitro*. Además, el empleo de estos constructos evitaría el uso de parches para sellar la lesión, permitiría su aplicación artroscópica y disminuiría considerablemente el tiempo y la complejidad de la técnica ACI<sup>48</sup>.

Los andamiajes diseñados para este fin deben ser biocompatibles, biodegradables, no inmunogénicos, estables mecánica y estructuralmente y deben promover la proliferación y maduración de los condrocitos articulares *in vitro*, así como garantizar la distribución homogénea de las células en el defecto condral. Las matrices empleadas pueden ser naturales (colágeno, ácido hialurónico, fibrina, alginato, agarosa, quitosano) o sintéticas (ácido poliláctico o poliglicólico)<sup>63-65</sup>. En la práctica clínica se han empleado principalmente matrices de colágeno, ácido hialurónico y fibrina con similares resultados.

Sin embargo, el uso de condrocitos cultivados en matrices tridimensionales es todavía escaso y la evidencia clínica a su favor es relativa. A pesar de favorecer el mantenimiento del fenotipo condrocítico de las células en cultivo y facilitar el implante celular, no se han demostrado ventajas significativas con respecto al ACI<sup>66</sup>.

## NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES OSTEOCONDRALES

En cualquiera de sus versiones (1ª, 2ª o 3ª generación), el implante autólogo de condrocitos presenta 3 inconvenientes principales:

- 1- Son necesarias un mínimo de dos intervenciones quirúrgicas: una para obtener la biopsia cartilaginosa y otra para el implante de las células cultivadas.
- 2- El número de células obtenidas es limitado, lo que obliga a su expansión *in vitro*, con el consiguiente fenómeno de dediferenciación celular.
- 3- El número, la capacidad proliferativa y la actividad metabólica de los condrocitos disminuye con la edad.

Todo ello ha hecho que durante los últimos años hayan aparecido numerosas líneas de investigación centradas en encontrar tratamientos basados en la ingeniería tisular empleando MSC como alternativa a los condrocitos articulares.

## CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

---

Las MSC constituyen una atractiva alternativa al empleo de condrocitos en el tratamiento de lesiones articulares dado que se trata de células autorrenovables y multipotenciales, siendo capaces, por tanto, de dar lugar a poblaciones celulares de tipo condroblástico aptas para reparar adecuadamente las lesiones osteocondrales<sup>67,68</sup>. Además, presentan una baja expresión del complejo de histocompatibilidad, lo que las hace

inmunogénicamente inactivas y, por tanto, las candidatas idóneas para el desarrollo de terapias alogénicas.

A pesar de su potencial, la aplicación clínica de estas células se ve en parte frenada precisamente por la falta de conocimiento que todavía hoy, más de medio siglo después de su descubrimiento, tenemos sobre la propia identidad de las MSC. Es decir, por la ausencia de marcadores específicos que permitan aislar poblaciones homogéneas de MSC y hacer así comparables los resultados de los diversos estudios clínicos y preclínicos que se están llevando a cabo. Por este motivo, la sociedad internacional de terapia celular (ISCT -*Internacional Society for Cellular Therapy*-) propone unos criterios mínimos para definir una población de MSC humanas<sup>69</sup>. Estos criterios son:

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

Estas células pueden ser aisladas de diferentes tejidos en el individuo adulto (médula ósea, tejido adiposo, hueso, músculo, dermis,...)<sup>70-72</sup>, siendo la médula ósea la fuente de referencia, puesto que fue el primer tejido en el que se descubrió la presencia de MSC y, por lo tanto, en el

que más experiencia se tiene. El tejido adiposo constituye la alternativa más interesante por su gran disponibilidad, fácil obtención y el elevado número de MSC que pueden obtenerse de él.

Las MSC pueden ser obtenidas y aplicadas en un solo acto quirúrgico<sup>73,74</sup>, mediante la inyección de un concentrado celular, o pueden ser extraídas del tejido fuente, aisladas y cultivadas *in vitro*, e implantadas en un segundo acto quirúrgico. Ambos procedimientos difieren considerablemente. Mediante su expansión *in vitro* se puede conseguir un número mucho más elevado de células para el implante. Además, las MSC pueden ser cultivadas en andamiajes tridimensionales en presencia de factores de crecimiento que induzcan la diferenciación condrogénica de las células previamente al implante. Sin embargo, el cultivo celular no está exento de riesgos, como la posibilidad de contaminación bacteriana, transformación celular o diferenciación terminal prematura que puede conducir a la hipertrofia del injerto una vez implantado. Además, las células cultivadas en el laboratorio son legalmente consideradas un producto farmacéutico, lo que encarece y hace complejo su uso.

La mayoría de las investigaciones llevadas a cabo han tratado de utilizar las MSC para diseñar cartílago articular *in vitro* y analizar los resultados de la aplicación directa de estas células sobre defectos condrales en modelos animales, aunque también existen en la literatura diversos ensayos clínicos. Cuando las células son implantadas en lesiones osteocondrales, parecen ser capaces de diferenciarse y promover la regeneración tanto del cartílago articular como del hueso subcondral<sup>75</sup>.

### **Células madre mesenquimales de médula ósea**

Desde que las células madre mesenquimales de médula ósea (BMMSC) fueran descubiertas por Friedenstein en 1966, y en 1970 Caplan fuera capaz de inducir condrogénesis mediante su cultivo *in vitro*, el interés por estas células para la regeneración de lesiones osteocondrales ha ido creciendo notablemente.

Las BMMSC son obtenidas a partir de aspirado medular, preferiblemente de cresta iliaca<sup>76</sup>. Las muestras de aspirado son recogidas en tubos heparinizados y posteriormente centrifugadas en gradiente de densidad para aislar la fracción de células mononucleadas, entre las que están las BMMSC en una proporción de 1/10.000 a 1/100.000<sup>77</sup>. Este concentrado celular puede ser aplicado directamente en la lesión, o colocado sobre superficie plástica de cultivo, lo que permite el aislamiento de las BMMSC mediante su adherencia y posterior proliferación *in vitro*.

Recientemente, Giuseppe *et al.*<sup>78</sup> publicaron una revisión bibliográfica muy completa en torno al uso de MSC tanto en estudios preclínicos como en la práctica clínica.

Son más de 50 los estudios preclínicos llevados a cabo hasta la fecha empleando BMMSC para el tratamiento de lesiones osteocondrales. Estas células han sido aplicadas en diversos modelos animales (conejo, caballo, oveja), mediante inyección intrarticular o embebidas en geles de colágeno, solas o combinadas con ácido hialurónico, con buenos resultados a corto plazo<sup>79-81</sup>.

Aunque no existen ensayos clínicos aleatorizados que aporten evidencia científica sobre la eficacia de la técnica, se han publicado diversos estudios clínicos en los que se han aplicado terapias basadas en el empleo de BMMSC. A pesar de la heterogeneidad de los

procedimientos empleados (aplicación de concentrado medular o de BMMSC cultivadas *in vitro*, inyección intrarticular o implante quirúrgico, células aplicadas en forma de suspensión o embebidas en matrices de colágeno<sup>82,83</sup>, ácido hialurónico<sup>84</sup> o fibrina<sup>85</sup>), los resultados son bastante congruentes en lo que se refiere a disminución del dolor, mejora de la funcionalidad articular, integración del injerto, regeneración del hueso subcondral y recuperación de la homogeneidad macroscópica en la superficie del cartílago articular<sup>86-88</sup>, siendo comparables a los obtenidos con el implante autólogo de condrocitos<sup>31</sup>. Sin embargo, a nivel histológico no está claro que las lesiones sean reparadas con cartílago hialino duradero y no degeneren en un tejido mixto fibroso<sup>89</sup>.

Por otra parte, la utilización de la médula ósea como fuente de células madre mesenquimales presenta limitaciones, principalmente derivadas de la dificultad y morbilidad asociada al procedimiento de obtención del aspirado medular y la pequeña cantidad de muestra disponible. Por eso, durante los últimos años se han buscado fuentes de células madre alternativas que no presenten los inconvenientes de la médula ósea, esto es, abundantes y de fácil extracción.

### **Células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo**

El tejido adiposo es un tipo de tejido conectivo especializado muy vascularizado cuyas funciones principales son las de actuar como aislante térmico, amortiguar golpes y almacenar energía en forma de lípidos. Es uno de los más abundantes y representa alrededor del 15-20% del peso corporal en los hombres y del 20-25% en las mujeres. Está compuesto por una matriz de fibras de colágeno tipo I en la que se encuentra inmerso el componente celular, formado por adipocitos

maduros y la fracción del estroma vascular (SVF), compuesta a su vez por pre-adipocitos, células endoteliales, células musculares, pericitos, fibroblastos, monocitos, macrófagos, linfocitos y las llamadas células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo (*ADMSC-Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells*)<sup>90</sup>.

Las ADMSC fueron descritas por primera vez por Zuk en el año 2001<sup>71</sup>. Desde entonces, numerosos estudios han comprobado su capacidad proliferativa, así como su potencialidad, similar a la de las BMMSC, siendo capaces de regenerar diversos tejidos, incluyendo hueso, músculo, nervio, tendón y cartílago<sup>91</sup>.

El tejido adiposo representa una buena alternativa a la médula ósea como fuente de células madre adultas puesto que se trata de un tejido muy abundante, su obtención es sencilla, sólo requiere anestesia local y presenta una baja morbilidad.

Las muestras de tejido graso para la obtención de ADMSC pueden ser extraídas mediante lipoaspirado o resección quirúrgica, no existiendo importantes diferencias entre los distintos depósitos grasos presentes en el organismo en lo que se refiere a la cantidad de células obtenidas y a su capacidad proliferativa y multipotencialidad<sup>92</sup>.

Para su aplicación clínica, de forma análoga a lo que ocurre con las BMMSC, las ADMSC pueden emplearse en forma de concentrado, mediante una rápida digestión con colagenasa seguida de una centrifugación que permite aislar la SVF y aplicarla en el mismo acto quirúrgico; o bien pueden ser expandidas *in vitro* y diferenciadas hacia células maduras previamente a su implante.

Las condiciones óptimas de cultivo para la diferenciación condrogénica de las ADMSC están siendo actualmente investigadas, aunque parece que un ambiente tridimensional y la presencia de determinados factores

de crecimiento, como los pertenecientes a la familia TGF- $\beta$ , son requisitos imprescindibles<sup>93</sup>.

Diversos ensayos en animales, principalmente en conejo, han demostrado la utilidad de estas células en la reparación de lesiones osteocondrales mediante técnicas de ingeniería tisular<sup>75,94-100</sup>. También han sido empleadas en algunos casos de osteoartritis con resultados prometedores<sup>101-103</sup>.

Sin embargo, numerosos interrogantes permanecen abiertos en torno al uso de ADMSC para la regeneración de lesiones condrales, dada la ausencia de ensayos clínicos randomizados y la variedad de las metodologías utilizadas.

### **INGENIERÍA TISULAR Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES**

---

La ingeniería tisular se puede definir como la aplicación de principios y métodos de la ingeniería y las ciencias biológicas para el desarrollo de sustitutos que permitan restaurar, mejorar o mantener la función de dichos tejidos<sup>104</sup>.

Para asegurar la eficacia de las terapias basadas la ingeniería de tejidos, es necesario la utilización combinada de grandes poblaciones celulares, andamiajes que actúen como vector para las células y factores de crecimiento que promuevan la adquisición del fenotipo adecuado durante su cultivo *in vitro*, y la permanencia, supervivencia y funcionalidad celular en la lesión *in vivo* (Figura-11-).

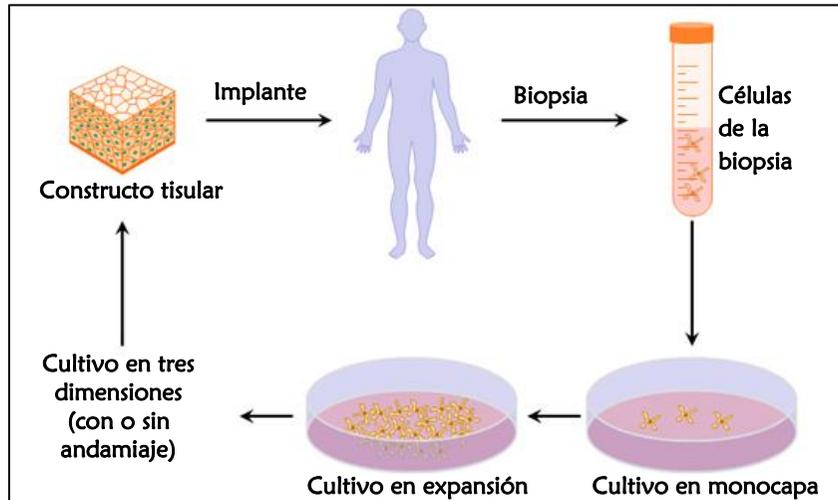


Figura-11- Esquema representativo del principio básico de las técnicas de ingeniería. Tomado y modificado de Bartis D, Pongrácz J. Three dimensional tissue cultures and tissue engineering. Univesrty of Pécs. Manifestation of novel social challenges of the European Union in the teaching material of medical biotechnology:1-133:1-133<sup>204</sup>.

Además de un componente celular adecuado, las técnicas de ingeniería tisular aplicadas a la reparación del cartílago articular requieren el empleo de andamiajes o matrices tridimensionales en las que las células puedan propagarse, diferenciarse y ser aplicadas fácilmente en la lesión. El andamiaje ideal, que hasta la fecha aún no ha sido desarrollado, debería ser biocompatible y reabsorbible con una tasa de degradación controlada, promover la viabilidad y proliferación celular así como la producción de componentes de la matriz extracelular cartilaginosa, permitir la difusión de nutrientes y productos de desecho, adaptarse a la forma y tamaño de la lesión articular integrándose con el cartílago sano adyacente y proporcionar una adecuada estabilidad mecánica hasta la reparación completa de la lesión<sup>105,106</sup>.

Los hidrogeles son redes poliméricas tridimensionales de consistencia blanda y elástica con gran capacidad para retener líquido en su estructura. Presentan características óptimas para el desarrollo de

técnicas de ingeniería tisular, puesto que mimetizan el microambiente en el que las células se encuentran en el tejido vivo, garantizando la libre circulación de nutrientes y productos metabólicos, y permitiendo la supervivencia, proliferación y mantenimiento de la función celular. Los hidrogeles son además capaces de transmitir cargas mecánicas para someter a las células en su interior a fuerzas controladas, de manera similar a lo que ocurre con el cartílago en condiciones fisiológicas. La única limitación de los hidrogeles es su escasa firmeza, que puede comprometer la absorción de fuerzas de carga en el tejido durante las primeras fases de reparación, hasta que las células producen una matriz extracelular madura.

De manera fisiológica, la reparación de tejidos dañados comienza precisamente con la formación de hidrogeles proteicos a base de fibrina en la zona lesionada<sup>36,107</sup>. El coágulo sanguíneo que se forma tras la agresión tisular contiene fibrinógeno, que mediante acción de la trombina y el factor XIII forma un coágulo de fibrina. Esta secuencia de acontecimientos puede reproducirse *in vitro* para crear un andamiaje tridimensional natural en el que embeber el componente celular. Estudios en diversas áreas han demostrado la utilidad de la fibrina para promover la regeneración tisular.

Además la fibrina puede polimerizarse con componentes de la matriz del cartílago articular para completar la reconstrucción del ambiente fisiológico al que las células se ven expuestas *in vivo*. El ácido hialurónico es el mayor componente de la matriz del cartílago y en gran medida responsable de su homeostasis y también de su funcionalidad, puesto que interactúa con los condrocitos articulares a través del receptor CD44 promoviendo la producción de factores de crecimiento de la familia TGF- $\beta$ <sup>108</sup>. Es capaz de unirse específicamente

con la fibrina<sup>109</sup> conformando un andamiaje que promueve el mantenimiento del fenotipo condrocítico *in vitro* e *in vivo*<sup>110,111</sup>.

Así pues, la elaboración de matrices a partir de ácido hialurónico y fibrina puede constituir el andamiaje ideal que soporte el crecimiento de las células en cultivo, promoviendo el mantenimiento y/o adquisición del fenotipo condrocítico y proporcionando el microambiente adecuado en el tratamiento de las lesiones articulares.

### III- JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## JUSTIFICACIÓN

El cartílago articular es un tejido altamente especializado que proporciona una interfaz dinámica a las articulaciones permitiéndolas resistir, distribuir y transmitir las fuerzas de compresión y de cizallamiento a las que se ven sometidas durante la vida diaria o el deporte<sup>2</sup>. Sin embargo, dado su carácter avascular, las características únicas de su matriz extracelular y la escasa actividad mitótica de las células que lo componen, el cartílago presenta una limitada capacidad de reparación ante una lesión traumática o degenerativa, lo que predispone a la articulación afectada a desarrollar un fenómeno degenerativo artrósico cuyas consecuencias finales son el dolor y la pérdida de función articular<sup>3,4</sup>.

Entre el 10 y el 20% de la población padece algún trastorno osteoarticular, siendo la artrosis la enfermedad articular más frecuente. Además, las enfermedades osteoarticulares son la primera causa de bajas laborales permanentes, y su prevalencia va en aumento, lo que da una idea de la importancia de esta enfermedad y su tratamiento, tanto a nivel sanitario como socioeconómico<sup>29,30</sup>.

Por todo esto, en las últimas décadas, las técnicas de reparación de lesiones condrales se han convertido en un tópico central en la investigación ortopédica. Pero el concepto de reparación ha cambiado, se busca conseguir un tejido estructural, histoquímica y funcionalmente idéntico al tejido nativo<sup>112</sup>.

Más allá de las técnicas de terapia celular basadas en el implante autólogo de condrocitos (ACI), con sus inconvenientes en cuanto a disponibilidad de zona donante y desdiferenciación celular *in vitro*<sup>113,114</sup>,

las nuevas técnicas de ingeniería tisular permiten el uso combinado de poblaciones celulares y matrices tridimensionales y su manipulación, lo que hace posible la construcción de sustitutivos tisulares *in vitro* aptos para su uso en clínica humana<sup>104</sup>.

Así pues, la técnica ACI ha sido mejorada en los últimos años mediante la inclusión de las matrices tridimensionales en las técnicas de cultivo tradicionales. Esto contribuye a la producción de un tejido de reparación apropiado, pero implica la escisión de cartílago sano para obtener una elevada cantidad de condrocitos<sup>59,64,38</sup>.

Las células madre mesenquimales (MSC) constituyen una atractiva alternativa al empleo de condrocitos en el tratamiento de lesiones articulares mediante técnicas de terapia celular<sup>115,116</sup>. Además de gran capacidad de autorenovación y multipotencialidad, presentan una baja expresión del complejo de histocompatibilidad, lo que las hace inmunogénicamente inactivas y, por tanto, unas buenas candidatas para el desarrollo de terapias alogénicas<sup>69</sup>.

Como fuente de células madre mesenquimales, la médula ósea ha sido la más estudiada<sup>117,68</sup>, sin embargo en los últimos años se han localizado nichos de células madre mesenquimales en otros tejidos cuya obtención presenta ventajas sobre la médula ósea. De entre ellos, probablemente el más atractivo es el tejido adiposo, por su fácil obtención, la gran cantidad de tejido disponible en el adulto y la gran cantidad de células madre mesenquimales en él contenidas<sup>71,91</sup>. Las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ADMSC) han sido empleadas para la regeneración de defectos articulares en diversos modelos experimentales mostrando un potencial condrogénico muy prometedor<sup>75,103,102,118</sup>.

Para asegurar la eficacia de las terapias basadas en el empleo de células, cualquiera que sea su origen, es necesario proporcionar un microambiente apropiado que garantice la adquisición y/o mantenimiento del fenotipo adecuado durante su cultivo *in vitro*, y la permanencia, supervivencia y funcionalidad celular en la lesión *in vivo*. En este sentido diversos son los andamiajes estudiados para el cultivo e implante de células con capacidad condrogénica: colágeno, agarosa, fibrina, alginato, quitosano, polímeros sintéticos..., cada uno de ellos con sus ventajas e inconvenientes<sup>96,119-124</sup>. La búsqueda del andamiaje ideal trata de encontrar un material biocompatible, reabsorbible y no inmunogénico que sea capaz de sostener el crecimiento y diferenciación de las células *in vitro* y promover la supervivencia celular *in vivo*.

Pese a los numerosos esfuerzos realizados durante los últimos años, la resolución satisfactoria de las lesiones osteocondrales continúa hoy día suponiendo un gran reto para el especialista. Las técnicas basadas en ingeniería tisular para la reparación de lesiones osteocondrales, se encuentran todavía en fase experimental. Aún 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?... Así pues es necesario el desarrollo de estudios *in vitro* y en modelos animales experimentales que permitan optimizar la técnica y proporcionar una herramienta segura y eficaz antes de generalizar su uso en la práctica clínica, y en este contexto planteamos nuestro trabajo.



## HIPÓTESIS DE TRABAJO

Es posible favorecer la regeneración de lesiones osteocondrales mediante el empleo de poblaciones celulares de tipo condrocítico derivadas de cartílago articular o tejido adiposo y cultivadas en hidrogel plasmático.

## OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

---

Comprobar la utilidad de poblaciones celulares de tipo condrocítico derivadas de cartílago articular o tejido adiposo y cultivadas en hidrogel plasmático para regenerar la fracción cartilaginosa de lesiones osteocondrales creadas en cóndilos femorales de conejo.

### 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

---

- 2.1. Comparar el comportamiento *in vitro* de las poblaciones celulares obtenidas a partir de dos fuentes de tejido adiposo disponibles en el conejo (grasa abdominal e infrapatelar) y elegir la fuente óptima para el desarrollo de sustitutos tisulares.

- 2.2.** Analizar el comportamiento *in vitro* de poblaciones celulares condrocíticas derivadas de tejido graso y cartilaginoso en el interior de hidrogeles elaborados con plasma sanguíneo y ácido hialurónico. Evaluar su proliferación, distribución y capacidad de diferenciación condrogénica.
  
- 2.3.** Emplear dichos constructos en la regeneración de defectos osteocondrales realizados en cóndilos femorales de conejos adultos. Evaluar y comparar la efectividad de los implantes en la formación de nuevo tejido funcional mediante estudios anatomopatológicos.

## V- MATERIAL Y MÉTODO

---



## DISEÑO DEL ESTUDIO

El material empleado para la realización del presente estudio aparece detallado en el Anexo I, mientras que los protocolos aplicados están descritos en el Anexo II.

Se realizó un estudio experimental prospectivo dividido en tres etapas:

- **Etapa -0-** Estudio comparativo de dos fuentes de ADMSC en conejo: el objetivo de esta etapa era elegir la fuente de ADMSC óptima para los estudios posteriores. Para ello se analizaron las poblaciones celulares obtenidas a partir de grasa abdominal y grasa infrapatelar (también llamada grasa de Hoffa) en términos de rendimiento, proliferación y multipotencialidad.
- **Etapa -1-** Estudio *in vitro* de los sustitutos cartilagosos: el objetivo de esta etapa era estudiar la distribución, proliferación y capacidad de diferenciación condrogénica de ADMSC, obtenidas a partir de la localización grasa elegida en la etapa anterior, en el interior de hidrogeles de plasma sanguíneo y ácido hialurónico. El comportamiento *in vitro* de las ADMSC se comparó con el mostrado por poblaciones de condrocitos articulares mantenidos en las mismas condiciones.
- **Etapa -2-** Estudio *in vivo* de los sustitutos cartilagosos: el objetivo de esta etapa era realizar una valoración de la capacidad regenerativa de los constructos tridimensionales *in vivo*. Para ello se crearon lesiones osteocondrales experimentales en los cóndilos femorales de conejos sanos que fueron tratadas con aloinjerto óseo y los sustitutos cartilagosos creados *in vitro*.

## EL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

Para la realización de los estudios se emplearon un total de 25 conejos de raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad y 3,5kg de peso medio, distribuidos de la siguiente manera:

- Etapa 0: 10 conejos empleados en otro proyecto experimental que no interfería con el presente estudio, fueron sometidos a cirugía abierta para la obtención de muestras de tejido graso abdominal e infrapatelar.
- Etapa 1: 3 conejos sacrificados por motivos de estabulación fueron empleados para la obtención de muestras de grasa infrapatelar, sangre y cartílago articular.
- Etapa 2: 12 conejos fueron empleados para los estudios *in vivo*. Uno de los animales, denominado conejo donante, fue eutanasiado para la obtención de muestras de grasa infrapatelar, sangre, cartílago articular y epífisis óseas. Otro de los animales no fue sometido a intervención quirúrgica constituyendo el individuo control. Los otros 10 conejos se emplearon para el implante de los constructos celulares objeto de estudio.

La obtención de muestras tisulares para las Etapas 0 y 1 se realizó en los quirófanos del Hospital Veterinario de la Universidad de León, mientras que para la Etapa 2 los animales de experimentación fueron alojados y manipulados en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Aspectos éticos

El protocolo experimental de la Etapa 2 (el único en el que los animales fueron expresamente manipulados para la realización del estudio), ha sido aprobado por el Comité Bioético de la Universidad de Salamanca en base a la Declaración de Helsinki (2000) de la Asociación Médica Mundial, la Directiva 2010/63/UE de la Unión Europea y la Ley 32/2007 sobre la investigación con animales para fines biomédicos, garantizando una adecuada atención a los animales de experimentación durante todo el proceso por parte de personal veterinario experimentado.

## OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Todas las muestras biológicas fueron obtenidas de manera aséptica y, salvo las muestras sanguíneas, sumergidas en DMEM con solución antibiótica para tejidos (SATE) conteniendo vancomicina (50 mg/ml), tobramicina (50 mg/ml), sulfametoxazol-trimetoprima (160 mg/ml-32 mg/ml), colistimetato sódico (8 mg/ml) y anfotericina B (10 mg/ml), y transportadas al Laboratorio de Cultivos Celulares para su procesamiento.

### OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ADIPOSO

---

Se obtuvieron un total de 24 muestras de tejido adiposo: 10 de origen abdominal para la realización de estudios en la Etapa 1 y 14 de origen infrapatelar, de ellas, 10 muestras se emplearon en la Etapa 0 del estudio, 3 muestras se emplearon en la Etapa 1 y 1 muestra en la Etapa 2.

Todas las biopsias de tejido graso fueron procesadas según el siguiente protocolo previamente optimizado<sup>125</sup>:

En campana de flujo laminar (modelo V-100, Teslar), las muestras de tejido graso fueron lavadas con suero fisiológico, pesadas y sometidas a una breve disgregación mecánica (troceado en fragmentos de no más de 0,5 cm<sup>2</sup> sobre una placa Petri, con pinzas y bisturí estériles), seguida de una digestión enzimática con colagenasa tipo I en DMEM a una concentración de 2 mg/ml a 37°C durante 24 horas. La solución resultante fue centrifugada a 2.000 rpm (720g), (centrífuga modelo 5804, Eppendorf), con el fin de separar los adipocitos maduros y los

restos lipídicos y recoger la fracción precipitada del estroma vascular (SVF- *Stromal Vascular Fraction*-) que contiene, entre otras, las ADMSC (Figura-12-).

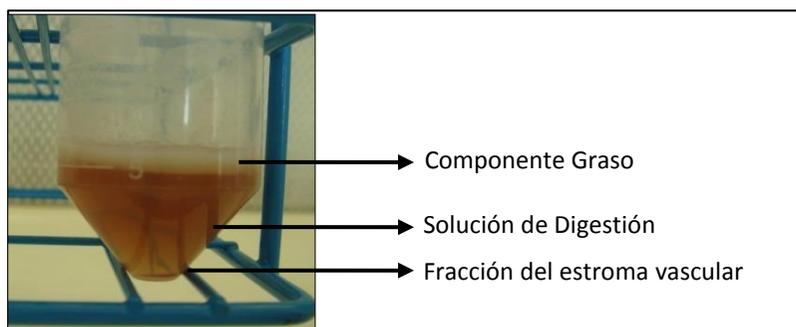


Figura-12- Aspecto de las muestras grasas tras la digestión enzimática.

El pellet de SVF así obtenido fue resuspendido en medio de cultivo estándar para MSC (DMEM, 10% suero bovino fetal y 1% penicilina-estreptomicina), y la población celular aislada cuantificada mediante método azul tripán. Brevemente, una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular fue diluida en 20  $\mu\text{l}$  del colorante vital azul tripán, y 20  $\mu\text{l}$  de esa solución fueron utilizados para el recuento celular por duplicado en cámara Neubauer (Figura-13-). Bajo microscópio óptico invertido (Leica DMIL) a 10 aumentos se realizó el recuento celular en los 8 campos de la cámara distinguiendo las células vivas como las estructuras fácilmente visibles redondeadas y refringentes. Para la estimación del número de células presentes en la muestra original se utilizó la siguiente fórmula:  $N^{\circ}$  de células = (recuento celular  $\times$  FD/N)  $\times$  volumen de resuspensión  $\times$   $10^4$ , siendo FD el factor de dilución de la muestra y N el número de campos de la cámara en los que se realiza el recuento celular.



Figura-13- Cámara de conteo celular Neubauer.

Para el establecimiento del cultivo primario (OP) y su expansión *in vitro*, las células obtenidas fueron sembradas sobre superficie plástica a una densidad de 30.000 células/cm<sup>2</sup> y mantenidas en incubador (Forma 311, *Thermo Fisher Scientific*) en condiciones de cultivo estándar (37°C, 95% humedad y 5% CO<sub>2</sub>), con medio de cultivo estándar para MSC. Transcurridas 48 horas, los cultivos fueron sometidos a un lavado con PBS quedando en los pocillos únicamente las células capaces de adherirse a ellos (ADMSC). El medio de cultivo fue renovado cada 48-72 horas hasta que las células alcanzaron un estado de pre-confluencia ocupando 80-90% de la superficie de cultivo, momento en el que se procedió a la recuperación de las mismas y su subcultivo.

Brevemente, las células fueron despegadas de la superficie plástica e individualizadas mediante adición de solución tripsina/EDTA (0,05/0,02) a 37°C durante 3-5 minutos. Cuando las células se hubieron separado, se recuperó la solución, se neutralizó la acción de la tripsina/EDTA mediante adición de medio de cultivo estándar para MSC en proporción 1:1 y se centrifugó la muestra a 1.400rpm (353g). Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se resuspendió el pellet en medio de cultivo estándar y se cuantificó la población celular obtenida mediante método azul tripán. Los cultivos secundarios en monocapa (1P y 2P) se establecieron a una densidad de siembra de 5.000 células/cm<sup>2</sup>.

---

## OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

---

Se recogieron un total de 4 muestras de cartílago articular a partir de conejos ya eutanasiados: 3 muestras para la realización de los estudios de la Etapa 2 y 1 muestra para la Etapa 3. Las muestras cartilaginosas fueron extraídas en finas láminas del cartílago articular de los cóndilos y cabezas femorales de los conejos con ayuda de pinza y bisturí.

Una vez en el laboratorio de cultivos celulares, las muestras se lavaron con suero fisiológico y se sometieron a una minuciosa disgregación mecánica, para favorecer la posterior digestión enzimática con Colagenasa tipo I en medio Hams-F12 durante 24-48 horas (hasta que el tejido estuvo totalmente digerido) (Figura-14-). La solución obtenida fue centrifugada a 1.400 rpm (353g), se resuspendió en medio de cultivo de condrocitos (Hams-F12, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina-estreptomicina y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ácido ascórbico) y se cuantificó la población celular aislada mediante método azul tripán.



Figura-14- Aspecto de las muestras cartilaginosas antes y después de la disgregación mecánica.

Las células obtenidas fueron sembradas sobre superficie plástica a una densidad de 20.000 células/cm<sup>2</sup> para el establecimiento del cultivo primario (OP) y mantenidas en condiciones de cultivo estándar. El primer cambio de medio se realizó a los 4-5 días, para garantizar la fijación de las células a la superficie de cultivo, y posteriormente fue renovado cada 2-3 días hasta alcanzar un estado de pre-confluencia del 80-90% de la superficie de cultivo. Los cultivos secundarios (1P y 2P) se establecieron a una densidad de siembra de 5.000 células/cm<sup>2</sup>.

### **OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE SANGRE VENOSA**

---

Se obtuvieron un total de 4 muestras de sangre de conejo: 3 para la Etapa 1, y 1 para la Etapa 2. Previamente a la eutanasia del animal, se extrajeron 50cc de sangre total a partir de vías periféricas que fueron recogidos en tubos conteniendo citrato sódico como anticoagulante a una concentración 0,129M (BD, Vacutainer). Una vez en el laboratorio, las muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 1.800rpm (583g), obteniéndose la fracción plasmática, que fue fraccionada en alícuotas de 3 ml en criotubos y congelada a -40°C hasta su uso en la elaboración de los hidrogles plasmáticos.

### **OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DEL TEJIDO ÓSEO**

---

En la Etapa 3 del estudio, a partir del conejo donante (n=1), una vez eutanasiado, se extrajeron ambos fémures y húmeros en condiciones de esterilidad. Tras recoger las muestras de cartílago articular descritas anteriormente, los huesos fueron sumergidos en SATE para su traslado al laboratorio de cultivos celulares donde fueron procesados para la obtención de hueso triturado como se describe a continuación:

Las epífisis óseas fueron lavadas y, una vez retirados los restos de tejidos blandos, se trituraron con ayuda de gubia y martillo estériles, hasta obtener unos 5cc de fragmentos de hueso cortico-esponjoso (principalmente esponjoso) de tamaño 1-3 mm (chip de aloinjerto óseo) (Figura-15-).



Figura-15- Obtención de aloinjerto óseo triturado a partir de las epífisis óseas.

Este chip se mantuvo 24 horas en suero fisiológico con solución antibiótica SATE a 4°C y posteriormente fue lavado 3 veces con suero fisiológico y congelado a -40°C en criotubos estériles a razón de 1cc/criotubo. Los criotubos con aloinjerto óseo se mantuvieron a -40°C hasta su utilización en la cirugía de implante.

**Etapas 0: ESTUDIO PREVIO COMPARATIVO DE ADMSC DERIVADAS DE GRASA ABDOMINAL E INFRAPATELAR DE CONEJO**

El objetivo de este estudio previo era elegir la fuente de tejido adiposo óptima para obtener ADMSC en las etapas posteriores del proyecto. Para ello se obtuvieron muestras de grasa abdominal e infrapatelar de 10 conejos que fueron procesadas para el aislamiento y cultivo de ADMSC como se describe en el apartado “Obtención y procesamiento de tejido adiposo”.

Las ADMSC de ambas localizaciones se aislaron, cultivaron y caracterizaron siguiendo los criterios de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) de adherencia a superficies plásticas y multipotencialidad. Además, ambas poblaciones celulares fueron comparadas en términos de rendimiento celular, unidades formadoras de colonias (UFC) y capacidad proliferativa, (Figura-16-).

Ninguno de los animales utilizados en esta fase fue expresamente manipulado o eutanasiado para la recogida de los tejidos, sino que todos los sujetos empleados para la obtención de muestras, formaban parte de otros proyectos de investigación ajenos al presente no habiendo sido sometidos a tratamiento alguno que pudiese haber alterado la calidad del presente estudio.

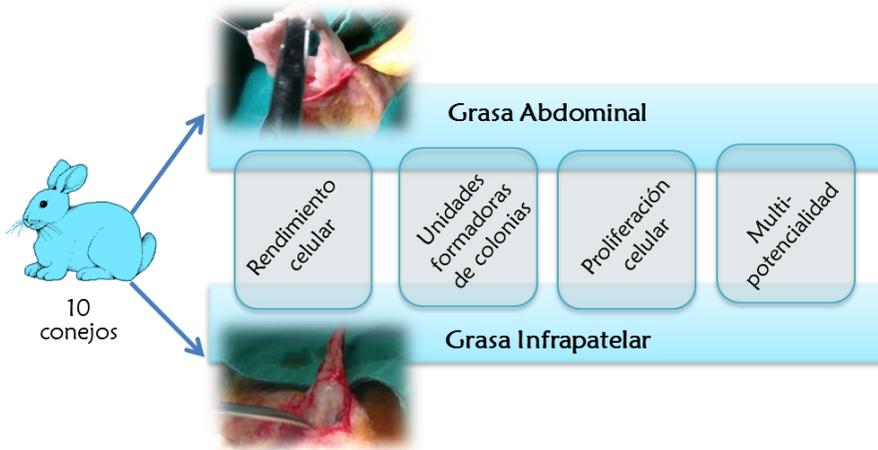


Figura-16- Estudios realizados en la Etapa-0-

A partir de las 20 muestras de tejido adiposo obtenidas (10 de origen abdominal y 10 de origen infrapatelar), se obtuvieron poblaciones de ADMSC con las que se realizaron estudios comparativos de rendimiento celular y UFC en la población celular aislada, análisis del patrón proliferativo en el cultivo primario (OP) y los dos primeros subcultivos (1P y 2P) y mantenimiento de la multipotencialidad tras la expansión *in vitro* en los pases 1P y 2P (Figura-17-).

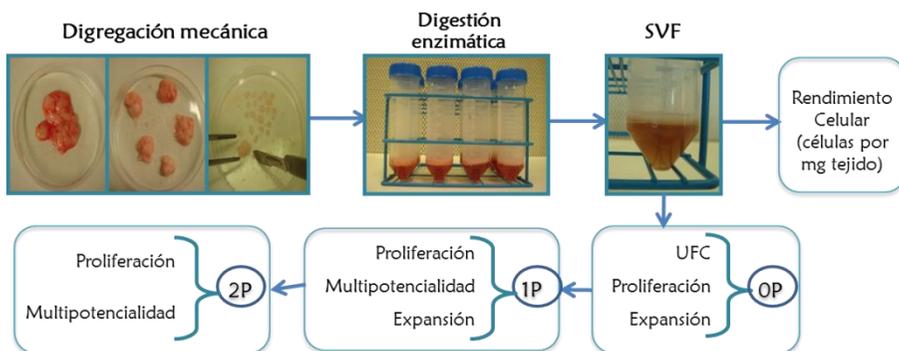


Figura -17- Esquema demostrativo de los estudios realizados para la caracterización de las poblaciones celulares aisladas de cada muestra de tejido graso.

## RENDIMIENTO CELULAR

---

A partir del recuento celular de la SVF se obtuvieron los valores de rendimiento celular (células obtenidas/mg de tejido digerido) para cada una de las muestras de tejido adiposo abdominal (n=10) e infrapatelar (n=10).

## UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

---

De cada una de las 20 poblaciones celulares obtenidas, 3.000 células fueron empleadas para la cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC) en cultivo primario (OP). Para ello se sembraron 3 pocillos de 9,6 cm<sup>2</sup> a razón de 1.000 células por pocillo, haciendo un total de 60 pocillos, con intención de aislar células capaces de adherirse y proliferar formando colonias. Las células sobrantes fueron sembradas sobre superficie plástica a una densidad de 30.000 células/cm<sup>2</sup> para su expansión *in vitro* y posterior subcultivo y establecimientos de los pases 1P y 2P.

En el caso del cultivo de UFC, al cabo de 8-10 días cuando el análisis visual mediante microscopio de contraste de fases mostró colonias independientes, con un tamaño suficiente para ser visualizadas macroscópicamente (más de 50 células), se procedió a la fijación con para-formaldehído 4% durante 5 minutos, tinción de los cultivos con colorante cristal violeta durante 3 minutos y posterior lavado con agua corriente para retirar el exceso de colorante. A continuación se realizó el recuento del número de UFC obtenido en cada muestra en cultivo primario (UFC-OP).

Así mismo, cuando los cultivos en expansión en OP alcanzaron un estado de preconfluencia de entre 80-90% de la superficie de cultivo,

se procedió a la recuperación de las mismas mediante tripsinización. De las células obtenidas, 120.000 células fueron empleadas para los estudios de proliferación y 480.000 para los estudios de multipotencialidad en 1P, y el resto fueron expandidas *in vitro* para repetir estos mismos estudios en el segundo subcultivo (2P).

### PROLIFERACIÓN CELULAR

Para el estudio de la capacidad proliferativa de las poblaciones celulares en cultivo en OP, 1P y 2P, por cada una de las 20 muestras a analizar en cada pase se sembraron 12 pocillos de 2 cm<sup>2</sup> a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup>, realizándose tripsinización de 2 pocillos y cuantificación celular mediante método Azul Tripán cada 48 horas durante 12 días para determinar el patrón proliferativo de las células en cada pase (Figura-18-).



Figura -18- Aspecto de una placa de cultivo sembrada para el estudio de la proliferación celular.

## MULTIPOTENCIALIDAD

---

Para el estudio de la multipotencialidad (capacidad de las ADMSC obtenidas para dar lugar a células maduras de diferentes linajes), se indujo la diferenciación de las células troncales obtenidas de cada muestra (n=20) en los pases 1P y 2P hacia células de tipo adiposo, óseo y condrocítico mediante su cultivo en medios específicos.

Para la diferenciación adipogénica de las ADMSC se sembraron en monocapa 4 pocillos de 0,75 cm<sup>2</sup> a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup> por cada muestra y pase (haciendo un total de 160 pocillos). Dos de los pocillos fueron mantenidos con medio de cultivo estándar para MSC y otros dos con medio de inducción adipogénica (DMEM, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina, 1 μM dexametasona, 10 μM insulina, 0,5 mM isobutilmetilxantina, 200 μM indometacina). Al cabo de 7 días los cultivos fueron sometidos al protocolo de tinción “Oil Red O” para la tinción de depósitos lipídicos en el interior de las células (Tabla-1-), cuya presencia fue confirmada mediante observación con microscopio óptico invertido (Leica DMIL).

Para la diferenciación osteogénica de las ADMSC se establecieron cultivos en monocapa en 4 pocillos de 0,75 cm<sup>2</sup> a una densidad de 5.000 células/cm<sup>2</sup>, por cada muestra y pase (160 pocillos en total). Dos de los pocillos fueron alimentados con medio de cultivo estándar para MSC y otros dos con medio de inducción osteogénica (DMEM, 10% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina, 150 mM ácido ascórbico, 10 μM dexametasona, 10 mM β-glicerolfosfato y 10 ng/ml BMP-2). Al cabo de 7 días los cultivos fueron sometidos al protocolo de tinción “Rojo Alizarina” para la visualización de depósitos de calcio en el cultivo (Tabla-1-) mediante microscopio óptico invertido (Leica DMIL).

En el caso de la diferenciación condrogénica, se empleó el cultivo en tres dimensiones mediante la elaboración de un hidrogel plasmático, según se indica a continuación: en pocillos de 0,32 cm<sup>2</sup> se elaboraron 4 hidrogeles o matrices por cada muestra y pase (haciendo un total de 160 matrices), dos matrices se mantuvieron con medio de cultivo condrogénico, y otras dos sirvieron como control negativo y se alimentaron con medio de cultivo estándar para MSC. El medio de cultivo condrogénico consistió en DMEM, 1% suero bovino fetal, 1% penicilina/estreptomicina, 1% L-glutamina, 50 nM ácido ascórbico, 6,25 µg/ml insulina, 10 ng/ml TGF-β1.

Tipo de inducción	ADIPOGÉNESIS	OSTEOGÉNESIS	CONDROGÉNESIS
Condiciones de cultivo	Monocapa	Monocapa	Hidrogel plasmático
Tiempo de inducción	7 días	7 días	21 días
Técnica de revelado	<u>T. Oil Red O</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijación: PFA 4%</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Propilenglicol 100% 2'</li> <li>• Oil Red O 0,35% 30'</li> <li>• Propilenglicol 60% 1'</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Hematoxilina Gill n°3 10'</li> <li>• Agua destilada</li> </ul>	<u>T. Rojo Alizarina</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijación: Metanol</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Rojo Alizarina 1% pH =4.0 1h</li> <li>• PBS 3 lavados</li> </ul>	<u>T. Azul Alcían</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Fijación: PFA 4%</li> <li>• Rehidratación</li> <li>• Ácido acético 3% 3'</li> <li>• Azul Alcían pH=2,5 30'</li> <li>• Agua corriente 1'</li> <li>• Nuclear Fast Red 5'</li> <li>• Agua corriente 1'</li> <li>• Deshidratación y montaje</li> </ul>

Tabla-1-. Condiciones de estudio de la multipotencialidad de las ADMSC.

Por cada matriz a elaborar,  $1 \cdot 10^5$  células fueron resuspendidas en  $47 \mu\text{l}$  del medio de cultivo correspondiente, al que se le adicionaron  $40 \mu\text{l}$  de plasma de conejo previamente descongelado, ácido hialurónico ( $5 \mu\text{l}$ ) cloruro cálcico ( $4 \mu\text{l}$ ) y ácido tranexámico ( $4 \mu\text{l}$ ), haciendo un volumen final de  $100 \mu\text{l}$  por constructo y manteniéndose a  $37^\circ\text{C}$  hasta su polimerización. Se dejaron transcurrir 2 horas hasta la adición de medio de cultivo correspondiente para asegurar la total polimerización del constructo (Figura-19-A-).

Tras 21 días de cultivo los hidrogeles fueron extraídos de los pocillos plásticos con ayuda de pinzas estériles (Figura-19-B-), colocadas en cassetes de histología previamente rotulados con la identificación de cada muestra y fijadas en paraformaldehído al 4% durante, al menos, 72 horas previamente al proceso de inclusión en parafina.



Figura -19- A: placa de 96 pocillos conteniendo los constructos tridimensionales en cultivo. B: detalle de un hidrogel plasmático.

Se utilizó un procesador automático de tejidos (Shandon-Excelsior™, Thermo Scientific), en el que las muestras se deshidrataron a través de una serie de soluciones con concentraciones crecientes de alcohol y finalmente xileno (alcohol de  $70^\circ$ , alcohol de  $90^\circ$ , alcohol de  $96^\circ$ ,

alcohol absoluto y xileno) durante 1 hora cada uno a temperatura ambiente, hasta su inmersión final en parafina (3 ciclos de 1 hora a 61°C).

A continuación, se recuperaron las muestras del procesador y se embebieron en parafina líquida, en moldes metálicos específicos, en el inclusor (Leica EG1150M, Leica Microsystems). Posteriormente, se enfriaron los bloques en una placa refrigerada (Microm CP60, Mikron Instruments, Inc.), y se realizaron secciones de 5  $\mu\text{m}$  de grosor en un microtomo de rotación monitorizado (Leica RM2255, Leica Microsystems).

Los cortes obtenidos se introdujeron en un baño termostático de flotación (Termofin, Selecta) a 37°C, recuperándose en un portaobjetos previamente rotulado.

Las secciones obtenidas se tiñeron con protocolos estándar de Azul Alcían (Tabla-1-), y posteriormente se visualizaron con un microscopio óptico directo de campo claro (BX61, Olympus). Las fotografías se realizaron con una cámara anclada al microscopio (Ec3, Leica) y se procesaron con un software específico (LAS V3.0, Leica).

## **Etapa 1: ESTUDIO *IN VITRO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS**

En esta fase, se comparó el comportamiento *in vitro* de tres poblaciones celulares embebidas en el hidrogel plasmático: condrocitos articulares, ADMSC mantenidas en con medio de cultivo estándar para MSC y ADMSC sometidas a inducción condrogénica (ADMSC-C). Se analizó el comportamiento celular en términos de proliferación y distribución así como su perfil histológico. La fuente de ADMSC fue seleccionada a partir de los resultados de la Etapa 0: la grasa de Hoffa o infrapatelar.

A partir de 3 conejos se recogieron, de manera aséptica, muestras de sangre, tejido adiposo infrapatelar y cartílago articular que fueron procesadas para la obtención de plasma sanguíneo, ADMSC y condrocitos respectivamente, tal y como se describe en el apartado “Obtención y procesamiento de muestras biológicas”. Cuando se alcanzó un número suficiente de células en cultivo (pases 2P-3P), éstas fueron incluidas en hidrogeles plasmáticos siguiendo la metodología descrita en la Etapa 0.

En placas de cultivo celular de 0,32 cm<sup>2</sup> se elaboraron un total de 180 matrices: 20 matrices por cada muestra de cartílago, que se mantuvieron con medio de cultivo para condrocitos (MCO), y 40 matrices por cada muestra de tejido adiposo: 20 se mantuvieron con medio de cultivo condrogénico (MCG) y otras 20 sirvieron como control negativo y se mantendrían con medio de cultivo para MSC (MCA).

Los constructos tridimensionales fueron conservados en condiciones estándar de cultivo, renovando el medio cada 2-3 días con sumo

cuidado para no dañar el hidrogel. A las 2, 4, 6 y 8 semanas de cultivo *in vitro*, dos hidrogeles de cada tipo (MCO, MCG Y MCA) se utilizaron para los estudios de proliferación mediante digestión enzimática, otro para la visualización de la distribución celular por microscopía confocal, otro para microscopía electrónica de barrido (SEM) y otro para la realización de estudios histológicos, (Figura-20-).

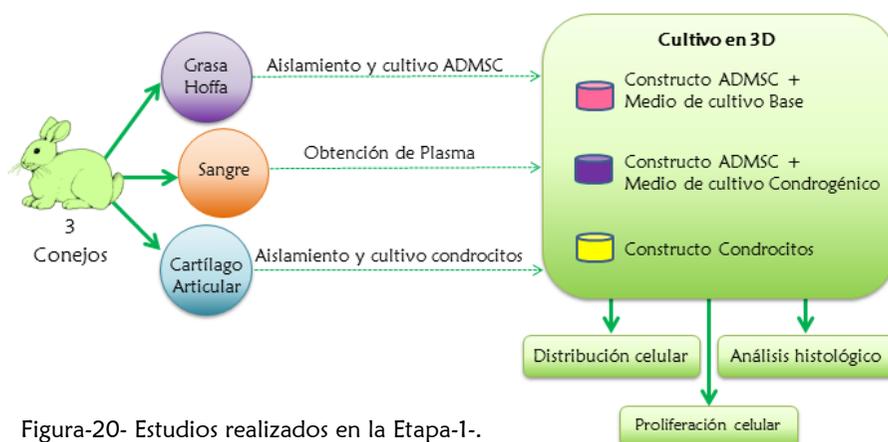


Figura-20- Estudios realizados en la Etapa-1-

## ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

Para el estudio del patrón proliferativo de las células en el interior de los hidrogeles, un total de 36 matrices, dos de cada tipo (MCO, MCG y MCA) y en cada tiempo de estudio (2, 4, 6 y 8 semanas), fueron digeridas enzimáticamente con colagenasa tipo I a una concentración de 2 mg/ml en DMEM durante 24 horas a 37°C. La solución resultante fue centrifugada a 1.400rpm (353g) y la población celular obtenida fue cuantificada mediante la técnica Azul Tripán descrita anteriormente.

## ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN CELULAR

---

Para comprobar la distribución de las células en las matrices tridimensionales se emplearon dos técnicas: microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido.

Mediante microscopía confocal se realizaron reconstrucciones tridimensionales de la señal obtenida de las células presentes en el interior de las matrices en cultivo. Para poder visualizar las células, se empleó el marcaje fluorescente Live-Dead®, basado en el empleo de calceína AM (sustancia que atraviesa la membrana celular y es convertida en calceína mediante la actividad esterasa intracelular emitiendo una fuerte fluorescencia de color verde), y homodímero de etidio (capaz de atravesar únicamente las membranas celulares dañadas y unirse a los ácidos nucleicos emitiendo fluorescencia roja), como marcadores de células vivas y muertas respectivamente.

Un total de 36 matrices, una de cada tipo (MCO, MCG y MCA) y en cada tiempo de estudio (2, 4, 6 y 8 semanas) fueron marcadas siguiendo instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras, previamente lavadas con PBS fueron incubadas con una solución de calceína AM 2 mM y homodímero de etidio 4 mM en PBS durante 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente fueron lavadas con PBS para retirar el exceso de marcaje y se obtuvieron imágenes seriadas mediante microscopio láser confocal (Radiance 2000 de BioRad )(Figura-21-).

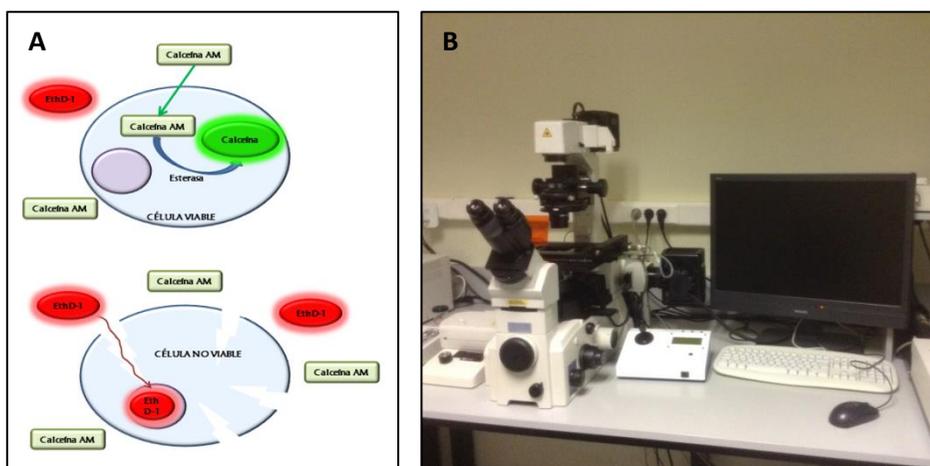


Figura -21- A: esquema del funcionamiento del marcaje celular Live-Dead. B: Microscopio láser confocal Radiance 2000 (Biorad).

Como complemento a esta técnica y para poder observar no solo la distribución de las células en la matriz, sino también su integración en interacción con la misma, se empleó la técnica de microscopía electrónica de barrido.

Un total de 36 matrices, una de cada tipo (MCO, MCG y MCA) y en cada tiempo de estudio (2, 4, 6 y 8 semanas) fueron observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Brevemente, las muestras fueron lavadas con PBS, fijadas en glutaraldehído 2,5% en oscuridad a 4°C durante, al menos, 24 horas y deshidratadas mediante inmersión en soluciones de alcohol de gradación creciente hasta llegar a etanol absoluto. Posteriormente las muestras fueron introducidas en un desecador de punto crítico (CPD Balzers) y recubiertas con oro en atmósfera de argón (Sputter coater SCD 004, Balzers) para poder ser visualizadas y fotografiadas mediante microscopio electrónico de barrido (JEOL 6100) (Figura-22-).

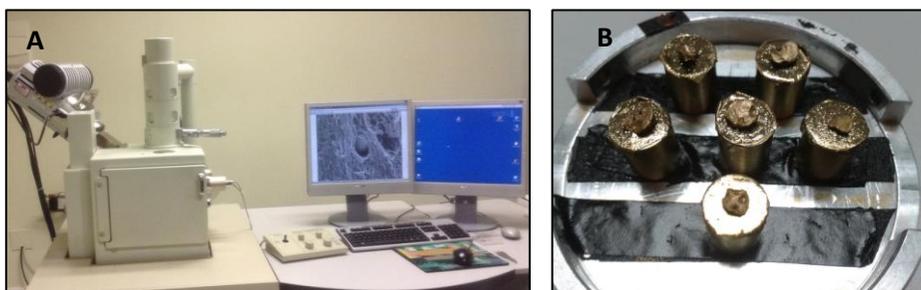


Figura-22- A: Microscopio electrónico de barrido. B: muestras desecadas y recubiertas con oro listas para su visualización mediante microscopía electrónica de barrido.

## ESTUDIO HISTOLÓGICO

---

Un total de 36 matrices, una de cada tipo (MCO, MCG y MCA) y en cada tiempo de estudio (2, 4, 6 y 8 semanas) fueron empleadas para el estudio histológico. Las muestras fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, deshidratadas e incluidas en parafina y posteriormente se realizaron cortes histológicos de 5  $\mu\text{m}$  que, previo desparafinado, fueron sometidos a las tinciones Hematoxilina-Eosina, Azul Alcian (siguiendo los protocolos descritos anteriormente), y detección inmunohistoquímica de colágeno tipo II (Figura-23-).

Para la detección inmunohistoquímica del colágeno tipo II se sometió a los cortes histológicos a un protocolo inmunohistoquímico que incluyó incubación con anticuerpo monoclonal frente a colágeno tipo II (mouse mAb II-4C11, Calbiochem) y revelado con el kit Vectastain siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, los cortes histológicos fueron sometidos a un tratamiento con buffer de citrato 10 mM durante 10 minutos para la recuperación antigénica y posteriormente expuestos a la acción de peróxido de hidrógeno al 3% durante 10 minutos para el bloqueo de la peroxidasa endógena. Tras lavar con PBS e incubar con suero bloqueante se procedió al marcaje

con el anticuerpo primario mediante incubación a 4°C *overnight*. Posteriormente se añadieron, secuencialmente y previo lavado con PBS, el anticuerpo secundario biotinilado durante 10 minutos, el complejo estreptavidina/HRP durante 5 minutos y el cromógeno diaminobenzidina durante 5 minutos más. Los núcleos fueron contrastados con hematoxilina de Gills.

Tras lavar, deshidratar y montar las preparaciones histológicas con medio de montaje DPX, la presencia de colágeno tipo II se detectó por la presencia de depósitos de color marrón mediante observación directa con microscopio óptico.



Figura-23- Campana de extracción de gases en la que se realizaron las tinciones histológicas.

## **Etapa 2: ESTUDIO *IN VIVO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS**

Esta fase del estudio se centró en la evaluación *in vivo* de la capacidad regenerativa de los hidrogeles desarrollados en la fase anterior como terapia alogénica mediante su implante en defectos osteocondrales realizados en la región medial de los cóndilos femorales de conejos sanos.

Tal y como se recoge en la descripción de “Obtención de muestras biológicas”, a partir del cadáver del conejo donante se obtuvieron muestras de grasa de infrapatelar, cartílago articular y sangre completa para la obtención de ADMSC, condrocitos articulares y plasma sanguíneo respectivamente, con los que se elaborarían los sustitutos cartilagosos *in vitro*. Además se extrajeron ambos fémures y húmeros para la obtención de aloinjerto óseo triturado que sería congelado y empleado posteriormente como relleno de la fracción ósea del defecto osteocondral creado en los animales receptores.

Las poblaciones celulares obtenidas a partir de las muestras de tejido adiposo y cartilaginoso fueron expandidas *in vitro* y en fase 2P, fueron incluidas en los hidrogeles de fibrina-hialurónico empleando la metodología descrita anteriormente en este documento. Se elaboraron, para esta fase del estudio, 40 constructos tridimensionales: 10 acelulares, 10 conteniendo condrocitos articulares y 20 conteniendo ADMSC (10 de ellas se alimentaron con medio de cultivo base para MSC y otras 10 con medio de inducción condrogénica). Las matrices fueron mantenidas en condiciones estándar de cultivo durante 3 semanas antes de su implante en el animal de experimentación.

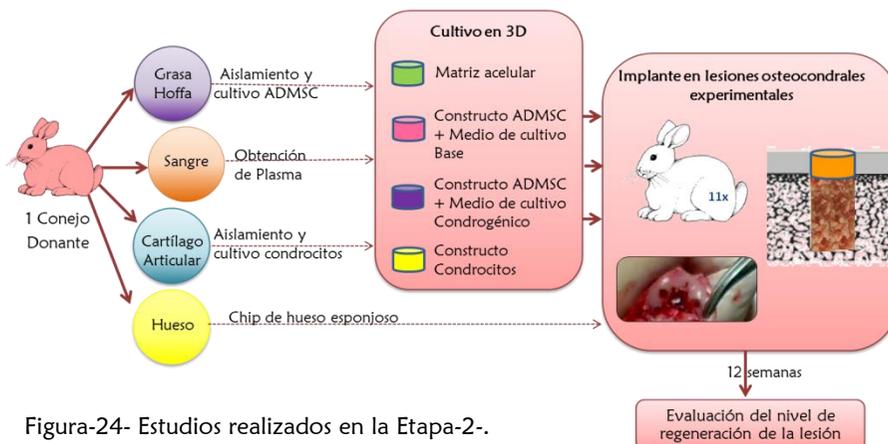


Figura-24- Estudios realizados en la Etapa-2-.

## MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon 12 conejos machos de raza Nueva Zelanda de 12 semanas de edad y un peso medio de 3,5kg; uno fue el animal “donante” a partir del cual se obtuvieron las muestras tisulares para la elaboración de los constructos celulares *in vitro*, otro de ellos sirvió como animal control y no fue sometido a intervención quirúrgica alguna y los otros 10 conejos se emplearon para el estudio de la capacidad regenerativa de los constructos celulares *in vivo*.

Los animales se mantuvieron en jaulas individualizadas con comida y agua *ad libitum*, en una habitación tipo P2 climatizada a 22°C y con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (Figura-25-). Desde el traslado de los animales a las instalaciones del Animalario Departamental de la Universidad de Salamanca hasta la realización de las intervenciones quirúrgicas en los quirófanos de la misma universidad, transcurrieron 2 semanas, tiempo durante el que los animales se mantuvieron en periodo de aclimatación. Tras las intervenciones quirúrgicas, los animales permanecieron estabulados 3 meses hasta el momento de la eutanasia.



Figura-25- Instalaciones para la estabulación de los animales de experimentación.

## **LESIONES E IMPLANTES**

---

En el momento de la cirugía de implante, con el animal sedado y anestesiado según los Protocolos Normalizados de Trabajo del Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la USAL, Anexo-II-, y previamente a la intervención, se realizaron tres lavados seriados de la zona quirúrgica alternando solución jabonosa yodada y alcohol de uso biosanitario. Por último, se pintó la zona quirúrgica con povidona yodada y se preparó el campo estéril con paños quirúrgicos desechables.

### **Creación de las lesiones osteocondrales**

La incisión quirúrgica se realizó en la cara anterior de la rodilla del conejo, centrada sobre la rótula, prolongándola 2 cm distal y proximalmente (Figura-26-). Mediante disección suave, se despegó el plano músculo-tendinoso del tejido celular subcutáneo, localizándose el músculo cuádriceps, el tendón cuadriceps y el tendón rotuliano. Para acceder a la articulación, se realizó una artrotomía parapatelar

externa, luxándose la rótula en dirección medial para así exponer los cóndilos femorales.

Bajo visión directa, se crearon dos defectos osteocondrales en la zona de carga de cada uno de los dos hemicóndilos femorales de ambas extremidades inferiores (n=40) utilizando el punch de biopsia y profundizando hasta el plano óseo subcondral. El tamaño final del defecto fue el de un cilindro de 4 mm de diámetro x 3 mm de profundidad (Figura-26B-).

### **Implante de los sustitutos biológicos**

Una vez creados ambos defectos, se procedió a rellenar la fracción ósea de la lesión con el chip de aloinjerto óseo previamente descongelado (Figura-26C-), compactando el material con un compactador de acero inoxidable estéril de 3 mm de diámetro diseñado para este procedimiento. Cuando el lecho óseo estuvo reconstruido, se colocó sobre el mismo la matriz tridimensional correspondiente (Figura-26D-), según el grupo de estudio. Se aplicaron 4 tipos de tratamiento: hidrogel acelular (Grupo I, n=10), hidrogel con condrocitos articulares (Grupo II, n=10), hidrogel con ADMSC (Grupo III, n=10) e hidrogel con ADMSC-C (inducidas a diferenciación condrogénica) (Grupo IV, n=10) (Tabla-2-).

ANIMAL	Cóndilo Lateral Derecho	Cóndilo Medial Derecho	Cóndilo Medial Izquierdo	Cóndilo Lateral Izquierdo
1	Conejo DONANTE			
2	Animal DE REFERENCIA (sin operar)			
3	H. Acelular	H. Acelular	H. Condrocitos	H. Condrocitos
4	H. ADMSC	H. ADMSC	M. ADMSC-C	M. ADMSC-C
5	H. Acelular	H. Acelular	H. Condrocitos	H. Condrocitos
6	H. ADMSC	H. ADMSC	M. ADMSC-C	M. ADMSC-C
7	H. Acelular	H. Acelular	H. Condrocitos	H. Condrocitos
8	H. ADMSC	H. ADMSC	M. ADMSC-C	M. ADMSC-C
9	M. ADMSC-C	M. ADMSC-C	H. ADMSC	H. ADMSC
10	H. Condrocitos	H. Condrocitos	H. Acelular	H. Acelular
11	M. ADMSC-C	M. ADMSC-C	H. ADMSC	H. ADMSC
12	H. Condrocitos	H. Condrocitos	H. Acelular	H. Acelular

Tabla-2- Distribución de los grupos experimentales.

Rápidamente, el implante fue sellado con pegamento de fibrina comercial (Figura-26E), y se procedió a la recolocación de la rótula y el cierre por planos de la articulación.

Para el cierre de la cápsula articular se empleó un hilo reabsorbible Dexon 0, para aproximar el tejido subcutáneo se utilizó hilo reabsorbible Dexon 2/0 y en el caso de la piel se usaron grapas (Figura-

26F-). Posteriormente se aplicó povidona yodada en la herida como medida de asepsia.



Figura-26- Fases de la intervención quirúrgica. A: Incisión. B: muestra de las lesiones osteocondrales y detalle del punch quirúrgico y la biopsia ósea extraída. C: chip de aloinjerto óseo. D: implante del constructo cartilaginoso. E: sellado con pegamento de fibrina. F: aspecto tras la cirugía.

Durante el postoperatorio inmediato el animal se mantuvo controlado y bajo observación en un área al efecto con manta eléctrica para prevenir la hipotermia.

Durante los 5 primeros días se administró profilaxis antibiótica y fármacos antiinflamatorios según los Protocolos Normalizados de Trabajo del SEA de la USAL, anexo-II-.

### Aplicación de fluorocromos óseos

Con objeto de hacer también un seguimiento del proceso reparador en el lecho óseo de la lesión, se realizó un estudio de la dinámica ósea mediante marcaje con fluorocromos con afinidad por el calcio y visibles con luz ultravioleta o azul.

Se emplearon, secuencialmente, 4 fluorocromos para marcar el frente de mineralización del hueso: hidrocloreuro de demeclociclina, calceína, alizarina y naranja de xilenol. Todos los animales recibieron una dosis del fluorocromo correspondiente por vía intramuscular a los 3 días de la intervención, a las 4 semanas, 8 semanas y 12 semanas (3 días antes del sacrificio) de manera secuencial como se indica en la tabla-3-.

FLUOROCROMO	DÍA	DISOLUCIÓN	DOSIS
DEMECLOCICLINA HIDROCLORURO	3	25 mg/ml en suero salino fisiológico Ajustar pH=6-6.5	25 mg/kg
CALCEÍNA	28	20 mg/ml en NaHCO <sub>3</sub> 1.4%	10 mg/kg
ALIZARINA	56	25 mg/ml en NaHCO <sub>3</sub> 1.4%	30 mg/kg
NARANJA DE XILENOL	81	90 mg/ml en NaHCO <sub>3</sub> 1.4%	90 mg/kg

Tabla-3- Fluorocromos administrados al animal de experimentación.

---

## EUTANASIA Y RECOGIDA DE LAS MUESTRAS POST-MORTEM

---

12 semanas tras la intervención quirúrgica los animales fueron sacrificados en las instalaciones del SEA mediante la administración de Dotethal intravenoso (100 mg/kg), siguiendo las indicaciones del protocolo correspondiente, anexo-II-.

Tras comprobar la muerte del animal, con ayuda de bisturí, se procedió a la disección de la rodilla y liberación de tejidos blandos hasta dejar al descubierto la articulación. Posteriormente, con una sierra metálica se cortó el fémur a nivel de la zona metafisaria y se seccionaron los ligamentos articulares liberando así el extremo distal del fémur. Los bloques obtenidos fueron fotografiados y radiografiados e introducidos individualmente en frascos de plástico conteniendo alcohol 70° debidamente identificados con el código del animal y la lateralidad de la pieza. Las piezas articulares fueron enviadas al Departamento de Anatomía e Histología de la Universidad de Salamanca para su posterior procesamiento.

---

## ANÁLISIS MACROSCÓPICO DE LAS LESIONES

---

Se realizó un análisis visual de la reparación de las lesiones osteocondrales a nivel macroscópico tras 12 semanas de evolución. Para ello se siguieron las recomendaciones de la ICRS evaluando 3 características principales: la profundidad del defecto en comparación con el cartílago sano adyacente, la integración del tejido reparado con el tejido circundante y la apariencia macroscópica de la superficie del tejido de reparación. La modificación de la escala ICRS empleada en este estudio se muestra en la tabla-4-.

CRITERIO	DESCRIPCIÓN	PUNTUACIÓN	
Grado de reparación del defecto	Recuperación del nivel articular	2	
	Ligeramente hundido	1	
	Muy hundido	0	
Integración de los bordes del defecto	Total	2	
	Parcial	1	
	Nula	0	
Apariencia macroscópica del tejido de reparación	Hialina	2	
	Blanca opaca	1	
	Muy alterada	0	
Evaluación general de la reparación	<b>Grado I</b>	<b>Normal</b>	<b>6</b>
	<b>Grado II</b>	<b>Casi normal</b>	<b>5</b>
		<b>Anormal</b>	<b>4</b>
	<b>Grado III</b>	<b>Dañado</b>	<b>3</b>
		<b>Muy dañado</b>	<b>2</b>
	<b>Grado IV</b>	<b>Alteración severa</b>	<b>1-0</b>

Tabla-4- Modificación de la escala ICRS para la evaluación macroscópica de la reparación de las lesiones.

---

## PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

---

### Inclusión y corte de las muestras

Para el procesamiento de las muestras no descalcificadas, los fémures distales fueron lavados con agua y serrados longitudinalmente (Sierra Woodworker band saw 9" modelo MJ3924) separando ambos hemicóndilos femorales y delimitando la zonas de la lesión, incluyendo siempre zonas adyacentes de tejido sano. Cada una de las piezas resultantes fue introducida en casetes plásticos debidamente rotulados y posteriormente deshidratadas mediante inmersión en soluciones de etanol de gradación creciente (70°, 80°, 90° y 95°), estando embebidas durante 24 horas en cada una de las disoluciones, hasta llegar a etanol absoluto, donde permanecieron 2 días.

A continuación, las muestras fueron incluidas en metilmetacrilato líquido durante 15 días a 4°C en agitación. De forma paralela, se prepararon los cilindros de vidrio con base de metilmetacrilato polimerizado que se usaron como soporte para la posterior inclusión de las muestras óseas. Para ello, tras los 15 días de inclusión, las piezas óseas fueron transferidas a los cilindros de vidrio recubriéndolas con metilmetacrilato líquido. Los tubos fueron sellados con parafilm y mantenidos en estufa a 32°C durante 5-6 días hasta su polimerización y se incluyó una etiqueta con la identificación de la pieza escrita a lápiz para garantizar la trazabilidad de las muestras.

Posteriormente, el bloque polimerizado con la muestra ósea fue cortado con la sierra de cinta para desbastar la muestra antes de realizar los cortes definitivos con el micrótopo (Microm HM 350S). Los primeros cortes se realizaron con un grosor de 30  $\mu\text{m}$  hasta llegar a la zona de la lesión, donde se realizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  que fueron

colocados sobre portaobjetos gelatinizados, recubiertos con film de polietileno y prensados y secados a 60°C durante 24 horas. Se realizaron 3 cortes por cada una de las muestras, uno para cada una de las técnicas aplicadas: Von Kossa, Tricrómico de Goldner y observación de fluorocromos.

Se empleó microscopio óptico de campo claro (BX61, Olympus) y se tomaron fotografías con cámara acoplada al microscopio (EC3, Leica) que fueron procesadas mediante el software LAS V3.0, Leica.

### Técnicas histológicas convencionales

Para la realización de las tinciones histológicas, los cortes fueron desplastificados mediante inmersión en metil-acetato durante 55 minutos. Posteriormente, se lavaron en soluciones decrecientes de alcohol hasta agua destilada. Los protocolos de tinción empleados fueron Tricrómico de Goldner y Von Kossa, tabla-5-. Todos los cortes histológicos una vez teñidos fueron valorados mediante observación directa con microscopio óptico.

TINCIÓN	PROTOCOLO	INTERPRETACIÓN
TRICRÓMICO DE GOLDNER	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hematoxilina férrica Weigert 5'</li> <li>• Agua corriente 10'</li> <li>• Ponceau de xilidina 40'</li> <li>• Agua corriente</li> <li>• Ác. Acético 1%</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Ác. Fosfotungstico-Orange G 10'</li> <li>• Ác. Acético 1%</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Verde luz 20'</li> <li>• Ác. Acético 1%</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Deshidratar y montar</li> </ul>	<p>Hueso mineralizado.....verde</p> <p>Tejido mineralizado...rojo <span style="float: right;">no</span></p>

TINCIÓN	PROTOCOLO	INTERPRETACIÓN
VON KOSSA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nitrato de plata 3% 5'</li> <li>• Agua destilada 5'</li> <li>• Agua corriente 10'</li> <li>• Sulfato de sodio 5% 5'</li> <li>• Agua corriente 10'</li> <li>• Ponceau de xilidina 45'</li> <li>• Ác. Acético 1%</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Ác. Fosfotungstico-Orange G 15'</li> <li>• Ác. Acético 1%</li> <li>• Agua destilada</li> <li>• Deshidratar y montar</li> </ul>	Hueso mineralizado.....negro

Tabla-5- Protocolos de tinción empleados sobre los cortes histológicos de los fémures de conejo.

### Visualización de fluorocromos en el hueso subcondral

Para el análisis de la dinámica ósea en la región subcondral de la lesión, se seleccionaron cortes histológicos que fueron guardados en oscuridad a 4°C. Posteriormente fueron fijados en etanol, cubiertos con glicerina y observados con microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i). Mediante el uso combinado de los filtros FITC, B-2A y G-2A se detectó la presencia de los fluorocromos inyectados al animal de experimentación y su incorporación al tejido óseo neoformado a lo largo del experimento según se muestra en la tabla-6-.

FLUOROCROMO	MAX. EXC. (nm)	MAX. EM. (nm)	FILTRO	COLOR
TETRACICLINA	390	520	B-2A	Amarillo
CALCEÍNA	495	540	FITC	Verde
			G-2A	Rojo
			B-2A	Verde
ALIZARINA	580	625	G-2A	Rojo
			B-2A	
NARANJA XILENOL	377	615	G-2A	Rojo
			B-2A	Naranja

Tabla-6- Características de visualización de los fluorocromos empleados.

## VALORACIÓN MICROSCÓPICA

En cada grupo experimental se realizó una valoración descriptiva de los cortes histológicos de las lesiones sometidos a tinción Von Kossa y Tricrómico de Goldner en base a los siguientes parámetros:

- Valoración de la superficie articular:
  - o Existencia y morfología de la estructura superficial articular.
  - o Presencia de tejido conectivo o cartilaginoso, y si éste era de tipo fibroso o hialino.
  - o Nivel de celularidad y existencia de condronas hiperplásicas.
  
- Valoración del hueso subcondral:
  - o Existencia y tipo de tejido de relleno de la lesión.
  - o Presencia y disposición de la *tidemark*, la línea de cimentación, la placa de hueso subcondral y el hueso esponjoso subarticular.
  - o Descripción de la dinámica de la actividad ósea a lo largo de la experiencia.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (E.E.M.). Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico R<sup>126</sup>, con los paquetes estadísticos *car*, *gvlma* y *multcomp*.

Para el tratamiento estadístico de los datos se aplicó un modelo lineal generalizado y se comprobó la distribución normal de los residuos. Las medias de los diversos procedimientos experimentales se compararon utilizando el análisis de varianza factorial (ANOVA) y se aplicó un ajuste *white adjust* para asegurar la homocedasticidad en los residuos dada la variabilidad y heterogeneidad propias de los datos obtenidos a partir de muestras biológicas. Posteriormente se realizó el test de Tukey para evaluar el grado de significación al realizar una comparación entre las clases del factor. Los valores de  $p \leq 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.



## VI- RESULTADOS

---



La exposición de los resultados de las diferentes etapas del estudio se realizará por separado contemplando las características específicas de cada fase:

- **Etapla 0:** se describirán las diferencias encontradas entre las dos fuentes de ADMSC comparadas (grasa abdominal e infrapatelar), en términos de rendimiento celular, unidades formadoras de colonias, capacidad de proliferación y multipotencialidad celular. A partir de los resultados de este estudio previo se elegirá la fuente de ADMSC óptima para las fases posteriores.
- **Etapla 1:** se comparará el comportamiento *in vitro* de los tipos celulares estudiados (ADMSC, ADMSC-C y condrocitos articulares) en el interior de los hidrogeles plasmáticos, en base a su distribución, proliferación y análisis histológico.
- **Etapla 2:** se describirá el nivel de regeneración alcanzado *in vivo* con cada tratamiento (hidrogel acelular, hidrogel + condrocitos articulares, hidrogel + ADMSC e hidrogel + ADMSC-C) mediante la valoración cualitativa y cuantitativa del estado histológico de las lesiones osteocondrales tras 3 meses de evolución.

**Resultados Etapa 0: ESTUDIO PREVIO COMPARATIVO DE ADMSC DERIVADAS DE GRASA ABDOMINAL E INFRAPATELAR DE CONEJO**

Todas las muestras de tejido adiposo abdominal (n=10) e infrapatelar (n=10) de conejo fueron procesadas satisfactoriamente para el aislamiento y estudio de las ADMSC sin sufrir problemas de contaminación bacteriana o fúngica durante su obtención, transporte y procesamiento. A continuación se describen los resultados obtenidos del estudio comparativo de ambas poblaciones celulares (ADMSC derivadas de grasa abdominal y ADMSC derivadas de grasa de Hoffa) en términos de rendimiento celular, unidades formadoras de colonias, capacidad proliferativa y multipotencialidad con objeto de elegir la fuente de tejido adiposo óptima para el empleo de ADMSC en las etapas posteriores del proyecto.

### **RENDIMIENTO CELULAR**

---

En el momento de su recepción en el Laboratorio de Cultivos Celulares, el peso medio de las muestras de tejido adiposo abdominal fue de  $2.218 \pm 365$  mg, mientras que en el caso de la grasa de Hoffa fue significativamente menor:  $488 \pm 52$  mg ( $p \leq 0,001$ ).

En ambos casos, la disgregación mecánica y posterior digestión enzimática de las muestras de tejido graso durante 24 horas hizo posible la obtención de un pellet celular que permitió cuantificar las células de la SVF. La media de los rendimientos celulares obtenidos a partir de las muestras de tejido adiposo abdominal fue de  $57 \pm 16$  células/mg de tejido digerido, mientras que a partir de las muestras de tejido infrapatelar se aislaron una media de  $275 \pm 57$  células/mg. Así

pues, tal y como se muestra en la figura-27-, se obtuvo un número significativamente mayor de células aptas para su cultivo *in vitro* a partir de las muestras de grasa de Hoffa respecto al tejido adiposo abdominal de los conejos estudiados ( $p \leq 0,01$ ).

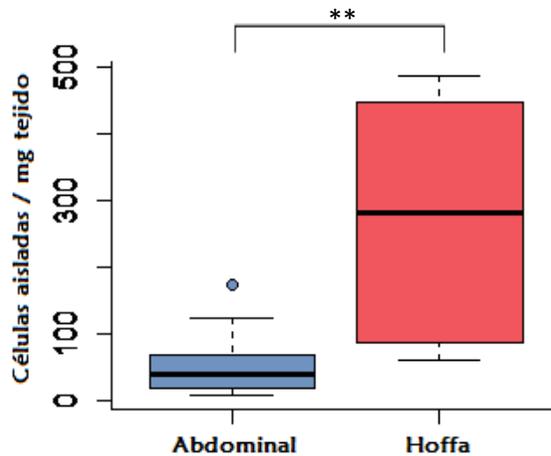


Figura-27- Rendimientos celulares medios obtenidos a partir de las biopsias de tejido graso. Los círculos corresponden a valores atípicos. n=10; \*\*= $p \leq 0,01$ .

Las ADMSC aisladas fueron sembradas sobre superficies plásticas para su expansión *in vitro* con el propósito de obtener cantidades celulares suficientes para el estudio tanto de su patrón proliferativo como de su multipotencialidad. La densidad de siembra empleada fue de 30.000 células/cm<sup>2</sup> en pocillos de 1,8 cm<sup>2</sup>, lo que aseguró el correcto establecimiento y progreso del cultivo primario en todos los casos estudiados.

Al cabo de 48 horas se observaron abundantes restos no adheridos que fueron eliminados en su mayor parte tras el lavado de los pocillos con PBS. Durante la progresión del cultivo, la población celular fue adquiriendo una morfología fusiforme típica de las ADMSC (Figura-28).

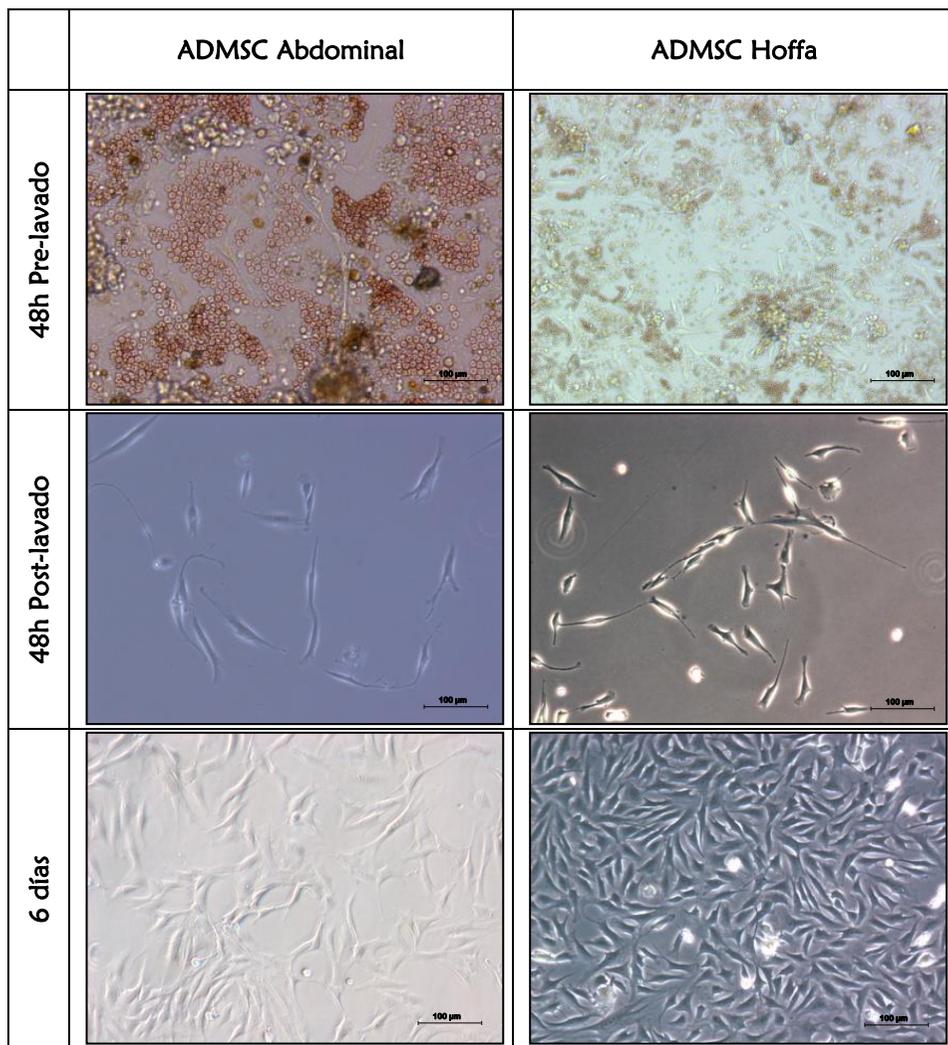


Figura-28- Aspecto de las células en OP 48 horas tras la siembra antes y después del lavado con PBS y tras 6 días de cultivo *in vitro*. Microscopio óptico invertido.

---

## UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

---

Tras la siembra a baja densidad (100 células/cm<sup>2</sup>) de las poblaciones celulares obtenidas, se consiguieron células aisladas que dieron lugar a colonias de más de 50 células en 8-10 días de cultivo *in vitro*.

Mediante el recuento de las colonias celulares teñidas con cristal violeta, se estableció el porcentaje de UFC aisladas en cada muestra a partir del número de colonias visibles macroscópicamente con respecto al número de células sembradas (Figura-29-).

Las ADMSC de ambos orígenes mostraron una marcada capacidad clonogénica obteniéndose una media de UFC significativamente mayor ( $p \leq 0,001$ ) en los cultivos de ADMSC de origen infrapatelar ( $1,173 \pm 0,169\%$ ) respecto a los de origen abdominal ( $0,346 \pm 0,079\%$ ) en el cultivo primario (OP) (Figura-30-).

Teniendo en cuenta el número de células aisladas a partir de las muestras de tejido adiposo y el número de unidades formadoras de colonias obtenidas a partir de ellas, podemos estimar que a partir de grasa abdominal obtuvimos un número medio de  $0,150 \pm 0,03$  UFC por mg de tejido digerido, mientras que en el caso de la grasa de Hoffa, el número fue significativamente mayor:  $2,911 \pm 0,672$  UFC por mg de tejido digerido ( $p \leq 0,001$ ) (Figura-31-). Así pues el número medio de ADMSC con capacidad clonogénica *in vitro* obtenido a partir de las muestras de tejido adiposo abdominal fue de  $401 \pm 132$  UFC/muestra mientras que en el caso de la grasa de Hoffa fue de  $1685 \pm 516$  UFC/muestra ( $p \leq 0,05$ ) (Figura-32-).

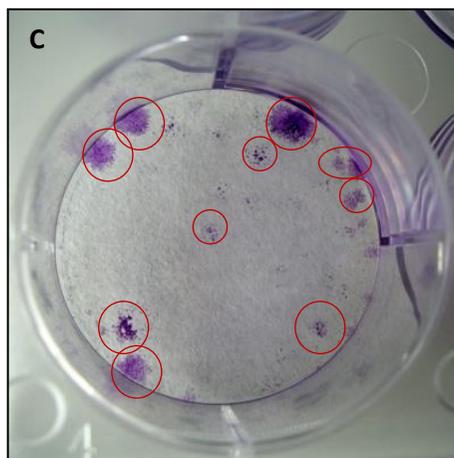
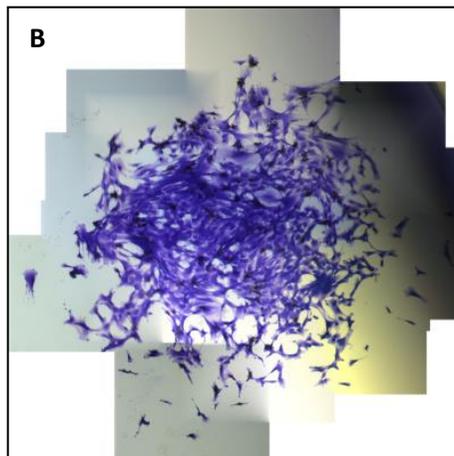
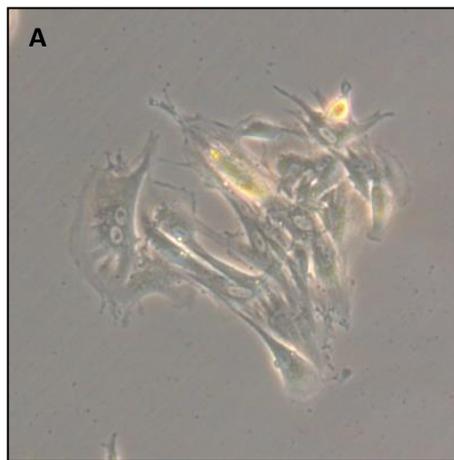


Figura-29- Unidades formadoras de colonias.

Aspecto microscópico (A, B) y macroscópico (C) de las UFC tras la tinción con cristal violeta para su recuento. n=10;  $p \leq 0,001$ .

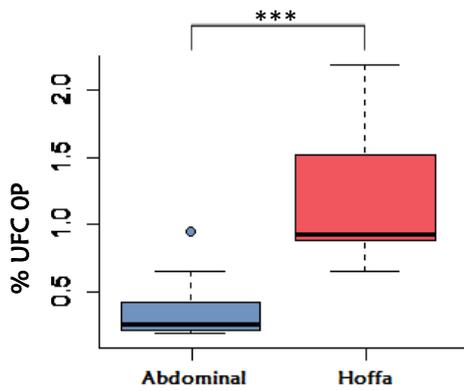


Figura-30- Porcentaje de UFC obtenidas en OP. Los círculos corresponden a valores atípicos. n=10; \*\*\*= $p \leq 0,001$ .

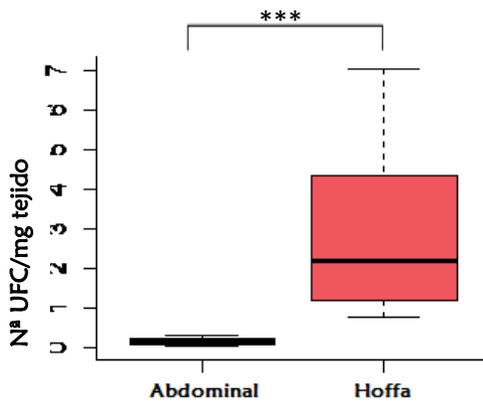


Figura-31- Número medio de UFC en OP por mg de tejido adiposo digerido. n=10; \*\*\*= $p \leq 0,001$

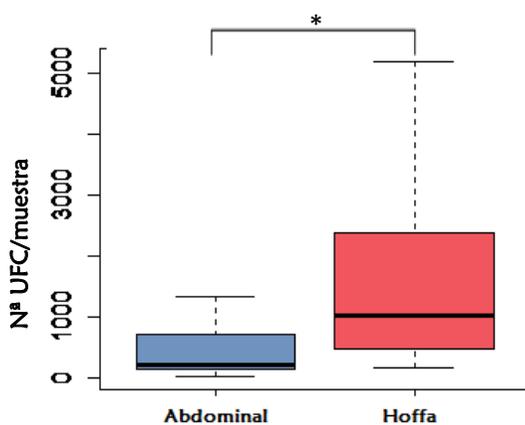


Figura-32- Número medio de UFC en OP por muestra de tejido adiposo procesada. n=10; \*= $p \leq 0,05$

## PROLIFERACIÓN CELULAR

---

Mediante el recuento del número de células cada 48 horas durante un total de 12 días, se estableció el patrón proliferativo de ambas poblaciones celulares en el cultivo primario y los 2 primeros subcultivos. En el caso del cultivo primario, dado que se disponía de un número limitado de células pudieron realizarse los estudios de proliferación celular en 4 de las muestras de grasa de origen abdominal y 5 de las muestras de grasa infrapatelar. Para los pases 1P y 2P se analizó el patrón proliferativo del total de las muestras (n=10).

Tanto en el caso de las ADMSC obtenidas a partir de grasa abdominal como en las obtenidas a partir de grasa de Hoffa, se observó cómo las células entraron rápidamente en fase exponencial de crecimiento al cabo de 4 días en el caso del cultivo primario (OP), y de 2 días en los pases 1P y 2P, alcanzando la fase estacionaria al cabo de 10 días (Figura-33-).

Los contajes celulares fueron ligeramente más altos en el caso de las ADMSC derivadas de grasa de Hoffa respecto a las derivadas de grasa abdominal sin llegar a obtenerse diferencias estadísticamente significativas.

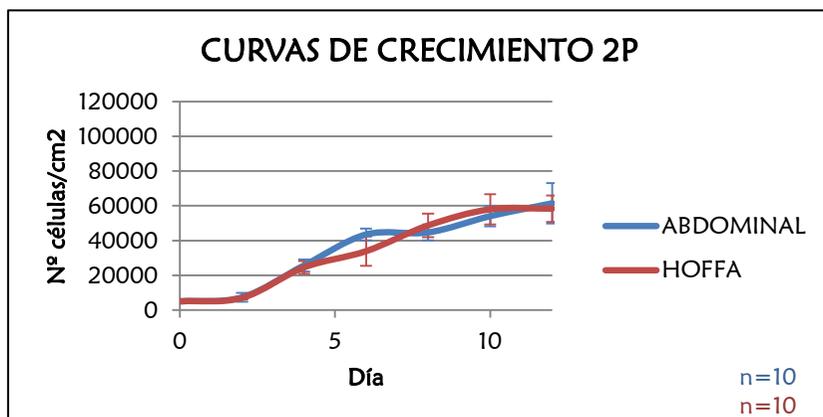
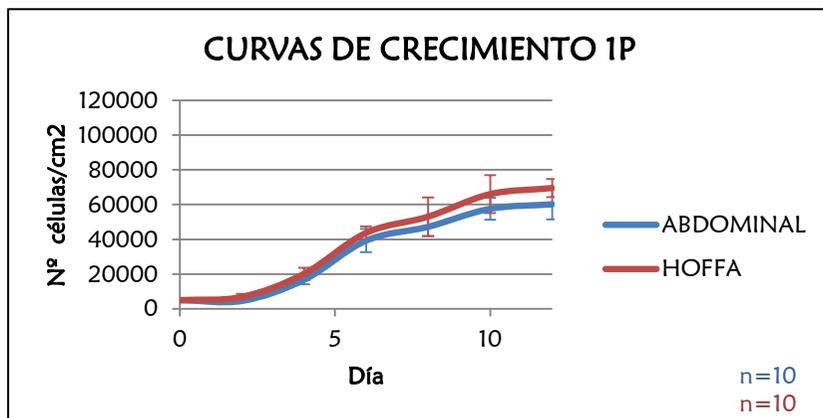
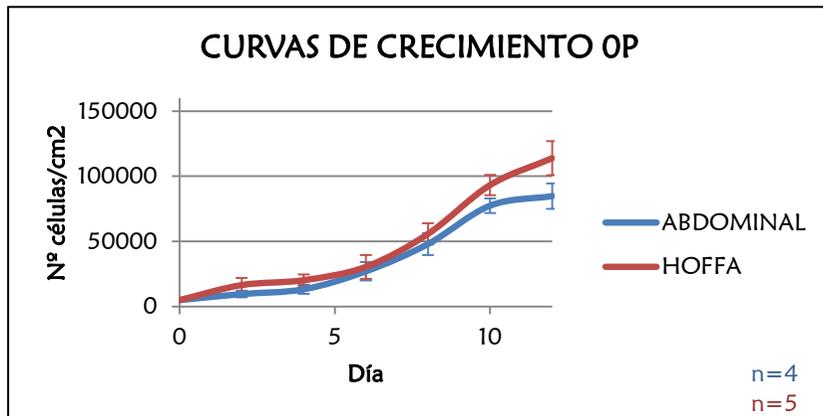


Figura-33- Patrones proliferativos *in vitro* de las ADMSC aisladas a partir de grasa abdominal y grasa de Hoffa en OP, 1P y 2P.

## MULTIPOTENCIALIDAD

---

Sometidas a los estímulos correspondientes ambas poblaciones celulares (derivadas de tejido graso abdominal e infrapatelar) fueron capaces de demostrar capacidad multipotencial. Las células mantuvieron su capacidad de diferenciación hacia diferentes estirpes celulares tras la expansión *in vitro*.

- Diferenciación adipogénica: la tinción Oil Red, que tiñe de rojo las sustancias lipídicas, se empleó para mostrar la presencia de vacuolas con contenido lipídico en el interior de las células, característica propia de las células adiposas. 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 fibroblástica con finas prolongaciones a una morfología más estrellada, incluso redondeada. 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 en cultivo, no observándose diferencias entre ambas poblaciones celulares, la derivada de tejido abdominal y la aislada a partir de grasa de Hoffa (Figura-34-).

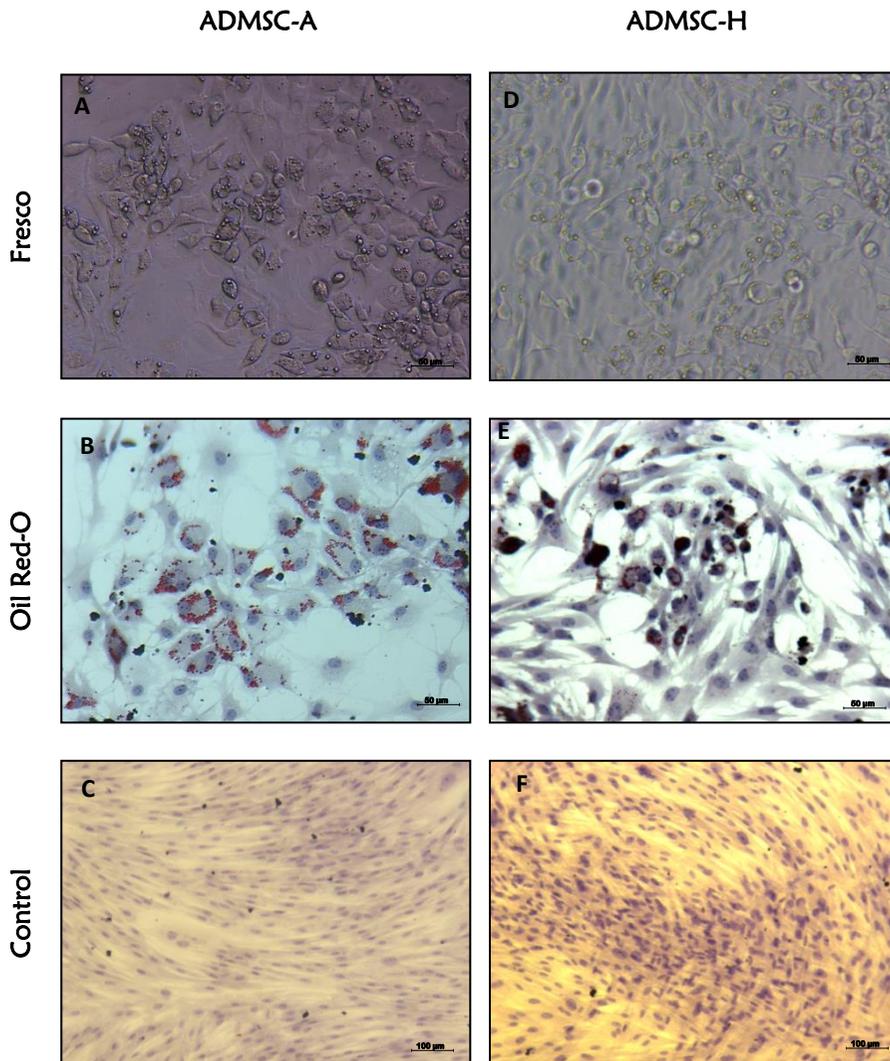


Figura-34- Aspecto de los cultivos celulares de ADMSC derivadas de grasa abdominal (ADMSC-A) e infrapatelar o de Hoffa (ADMSC-H) tras 7 días de inducción adipogénica. En los cultivos en fresco (A, D) se observan vesículas refringentes en el citoplasma de las células sometidas a diferenciación adipogénica. Tras la tinción Oil Red O, las células diferenciadas (B, E) muestran vesículas con contenido lipídico en su interior teñidas de rojo, mientras que los cultivos no inducidos no mostraron signos de tinción lipídica (C, F).

- Diferenciación osteogénica: la tinción Rojo Alizarina, que tiñe de rojo los depósitos de calcio, se utilizó para revelar la presencia de depósitos minerales en los cultivos inducidos hacia diferenciación osteogénica, dado que la mineralización del medio es una propiedad típica de las células de tipo osteoblástico. El cultivo de ADMSC derivadas de grasa de Hoffa y abdominal 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 grupos celulares organizados en nódulos que mostraron signos de mineralización tras la tinción con Rojo Alizarina al cabo de 7 días de cultivo (Figura-35-).

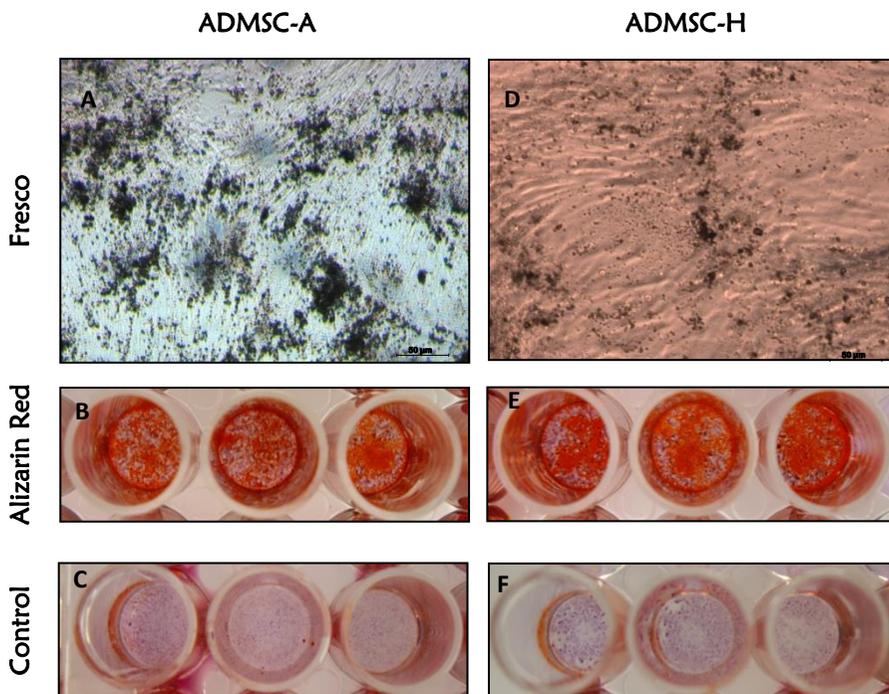
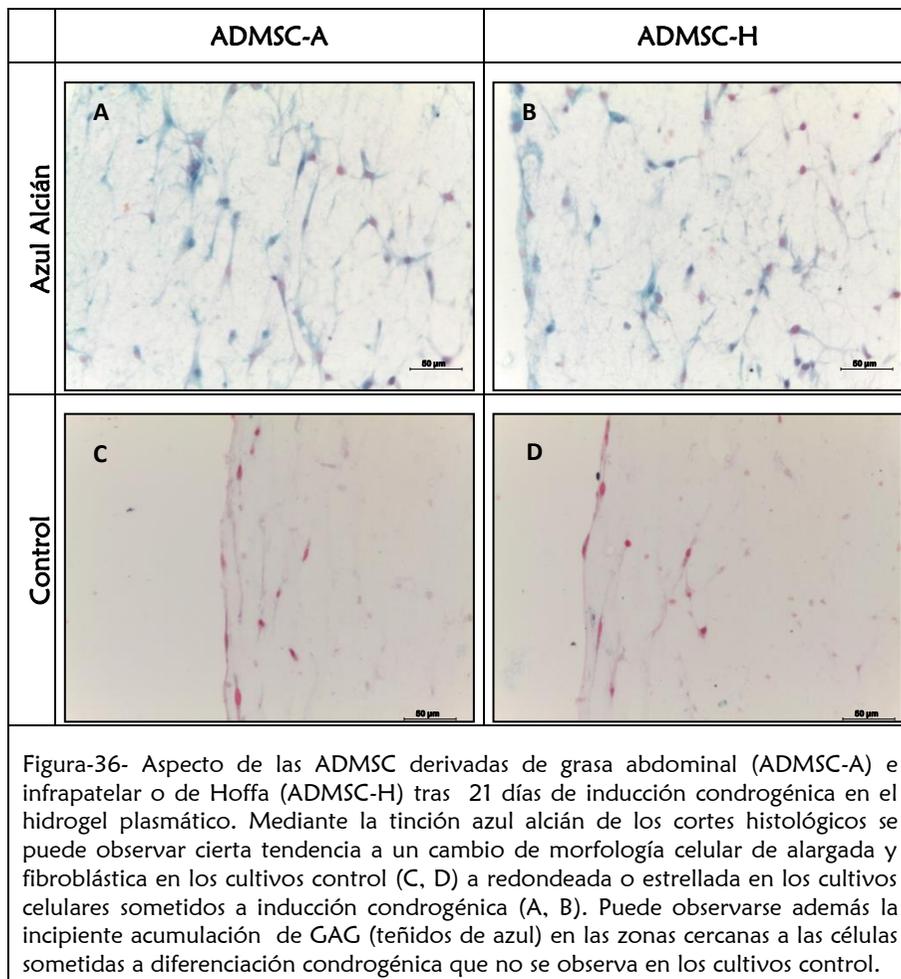


Figura-35- Aspecto de los cultivos celulares de ADMSC derivadas de grasa abdominal (ADMSC-A) e infrapatelar o de Hoffa (ADMSC-H) tras 7 días de inducción osteogénica. En los cultivos en fresco (A, D) se observan depósitos minerales sobre los cultivos sometidos a diferenciación osteogénica. Tras la tinción rojo Alizarina, los cultivos diferenciados (B, E) mostraron un claro marcaje de color rojo que indica la existencia de mineralización, mientras que los cultivos no inducidos no mostraron signos de tinción mineral (C, F).

- 
- Diferenciación condrogénica: mediante cultivo en ambiente tridimensional y medio de inducción condrogénica, se trató de promover la adquisición de morfología celular condroide por parte de las ADMSC, así como la capacidad de sintetizar GAG. Ambas propiedades fueron puestas en evidencia mediante la tinción Azul Alcían. Se comprobó que la inducción condrogénica de las células durante 21 días en el hidrogel plasmático, promovió la morfología redondeada-estrellada de las células y la tinción Azul Alcían puso de manifiesto la presencia de GAG en las zonas de la matriz cercanas a las células diferenciadas (Figura -36-). Ambas poblaciones celulares, las derivadas de tejido abdominal y de tejido infrapatelar, mostraron una capacidad similar de diferenciación condrogénica en las condiciones de cultivo descritas.



---

**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA ETAPA -0-**

---

En el estudio comparativo de ambas fuentes de ADMSC en conejo (grasa abdominal e infrapatelar) se observó que, a pesar de ser posible obtener una menor cantidad media de tejido adiposo a partir de la localización infrapatelar (488 mg) respecto a la localización abdominal (2.218 mg), el rendimiento celular medio tras la digestión del tejido y la frecuencia media de UFC fueron significativamente mayores en el caso de la grasa de Hoffa (275 células/mg y 1,173% UFC ) que en el caso de la grasa abdominal (57 células/mg y 0,346% UFC).

Así pues, y dado que ambas poblaciones celulares no mostraron diferencias significativas en lo referente a capacidad proliferativa y multipotencialidad, el tejido adiposo infrapatelar fue la fuente de ADMSC seleccionada para los estudios realizados en las etapas 1 y 2.

## **Resultados Etapa 1: ESTUDIO *IN VITRO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS**

A partir de 3 conejos se obtuvieron muestras de grasa de Hoffa y cartílago articular de las que se asilaron ADMSC y condrocitos respectivamente, tras su expansión *in vitro* cada tipo celular fue incluido en matrices tridimensionales elaboradas con plasma y ácido hialurónico. Se estudió el comportamiento *in vitro* en el interior de los hidrogeles de los condrocitos articulares, las ADMSC alimentadas con medio de cultivo estándar y las ADMSC inducidas condrogénicamente (ADMSC-C) en términos de distribución celular (mediante microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido), proliferación celular (técnica Azul Tripán), y estudio histológico (técnicas hematoxilina-eosina, azul alcian y detección inmunohistoquímica de colágeno tipo II).

### **DISTRIBUCIÓN CELULAR**

---

Tras la inclusión de las células en el interior de las matrices, y observadas con microscopio óptico de contraste de fases, éstas presentaban una morfología redondeada y se distribuían por todo el espacio disponible dentro del andamiaje tridimensional, pero con evidente mayor presencia en el fondo de la matriz. Tras pocos días de cultivo las células comenzaron a mostrar prolongaciones citoplasmáticas y su presencia se extendió y homogeneizó por toda la matriz. Sin embargo, al cabo de 4-6 semanas los hidrogeles tendían a retraerse y soltarse de las paredes de los pocillos (Figura-37-), dificultando enormemente su observación y seguimiento mediante microscopía óptica.

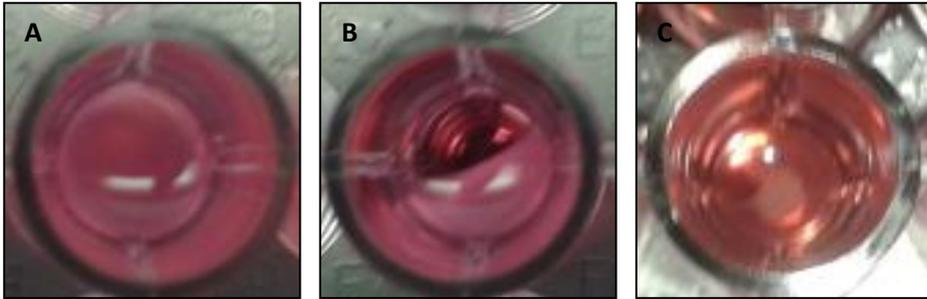


Figura-37- Aspecto macroscópico de las matrices celulares al cabo de 2 semanas de cultivo *in vitro* (A), 4 semanas (B) y 6 semanas (C).

El uso de técnicas de microscopía confocal y microscopía electrónica de barrido permitió visualizar las células en el interior de las matrices tridimensionales en cada tiempo de estudio (2, 4, 6 y 8 semanas).

Empleando calceína AM y homodímero de etidio como marcadores de células vivas (color verde) y muertas (color rojo) respectivamente y mediante microscopía confocal pudo valorarse la distribución uniforme de las células en el interior de las matrices así como comprobar su viabilidad durante todo el periodo experimental.

Como se observa en la figura-39-, las células permanecieron viables en su mayoría tras su inclusión en los andamiajes plasmáticos, aumentando en número durante su cultivo *in vitro*. La retracción estructural de las matrices entre las 4 y 6 semanas de cultivo *in vitro* no afectó a la viabilidad celular, que siguió manteniéndose elevada hasta el punto final del estudio (8 semanas).

La observación mediante microscopía confocal permitió también apreciar la morfología de los diferentes tipos celulares en el interior de los hidrogeles, que fue de marcado carácter fibroblástico (células alargadas con prominentes prolongaciones citoplasmáticas) en el caso de las ADMSC, mientras que los condrocitos articulares mostraron un

tamaño ligeramente menor, con cuerpo celular más esférico y pequeñas prolongaciones. En el caso de las ADMSC diferenciadas condrogénicamente se observa una morfología fibroblástica que a partir de las 4 semanas de inducción tiende a convertirse en una morfología de tipo condroide (Figura-38-).

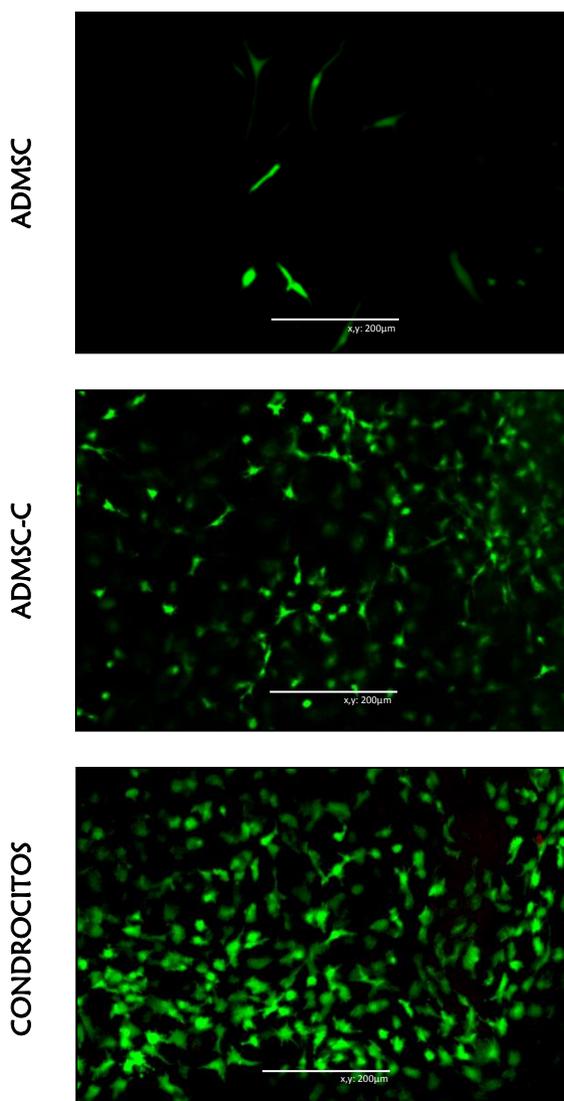


Figura-38- Morfología de los distintos tipos celulares en el interior de las matrices visualizados mediante microscopía confocal y marcaje fluorescente con homodímero de etidio y calceína.

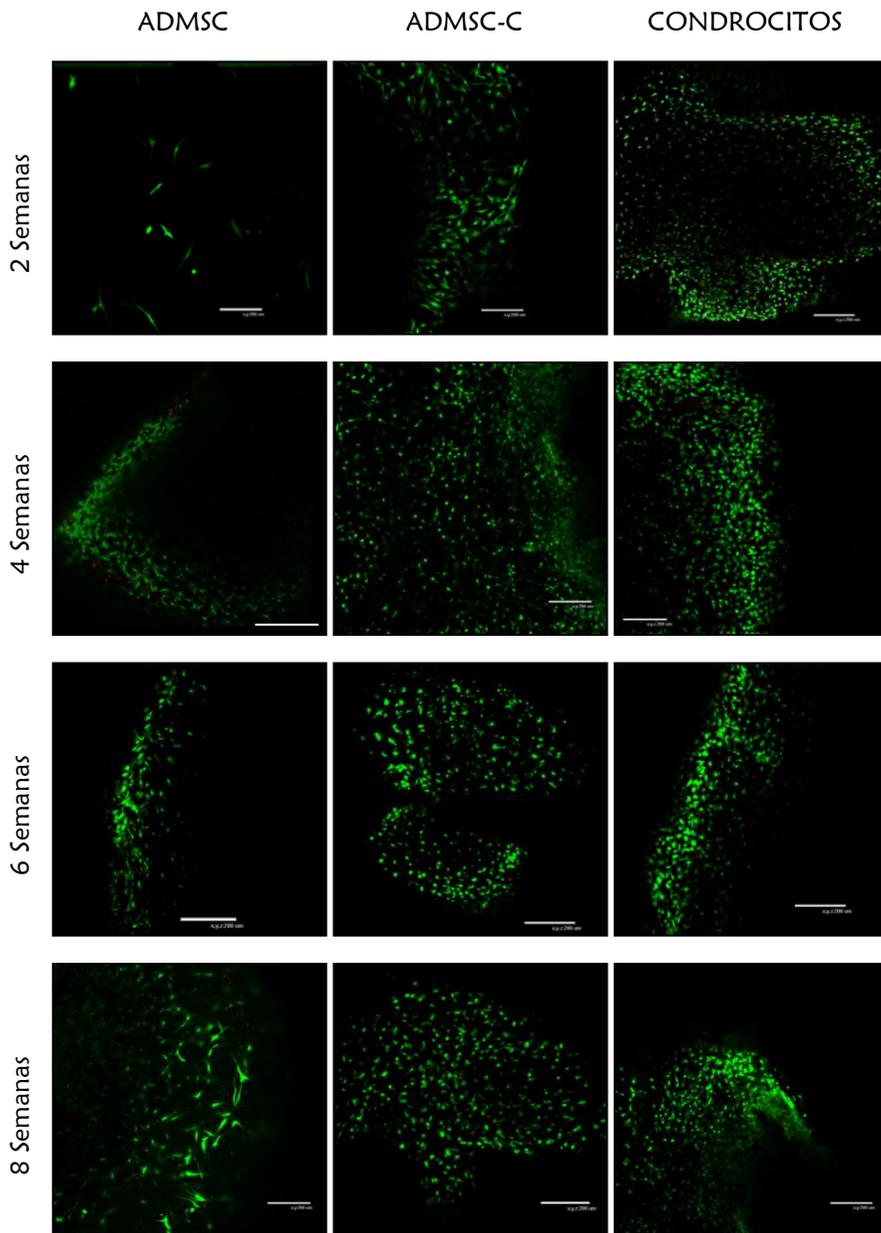


Figura-39- Imágenes de microscopía confocal de cada tipo celular estudiado en el interior de los hidrogeles al cabo de 2, 4, 6 y 8 semanas de cultivo *in vitro*.

La técnica de **microscopía electrónica de barrido** permitió observar la integración de las células en el hidrogel así como su morfología. La matriz plasmática se observó con esta técnica como un andamiaje tridimensional fibrilar (Figura-40-), en el que las células fueron capaces de integrarse interactuando con el mismo (Figuras-41- y -42-).

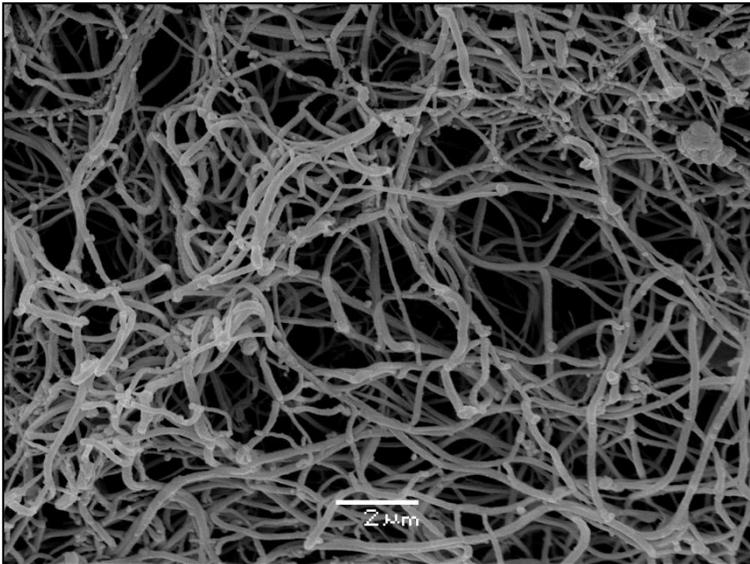


Figura-40- Detalle del hidrogel plasmático. Se observa el andamiaje de carácter fibroso que posteriormente será colonizado por las células en cultivo.

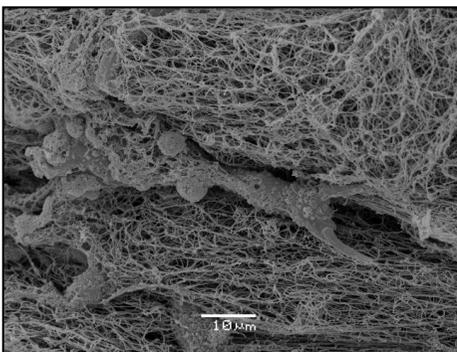


Figura-41- Detalle de la matriz en el que se aprecia cómo las ADMSCs al cabo de 4 semanas de cultivo *in vitro* se adhieren e interaccionan con el andamiaje de fibrina.

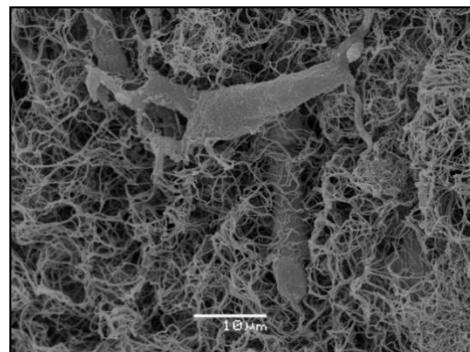


Figura-42-ADMSC diferenciadas condrogénicamente mediante cultivo hidrogel plasmático al cabo de 2 semanas de inducción. Se advierte la presencia de células tanto en la superficie como en el interior de la malla fibrilar.

Todos los tipos celulares proliferaron en el interior de las matrices y también sobre su superficie donde, en algunos casos, llegaron a conformar monocapas celulares (Figuras-43- y -44-). Además la morfología y disposición de las células en el interior del andamiaje fibrilar pudo ser observada con esta técnica (Figuras-45-, -46-, -47- y -48-).

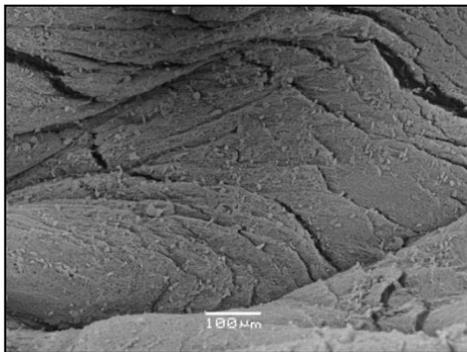


Figura-43- Panorámica en la que se observan ADMSC diferenciadas condrogénicamente dispersas por la superficie de la matriz tridimensional al cabo de 6 semanas de cultivo *in vitro*.

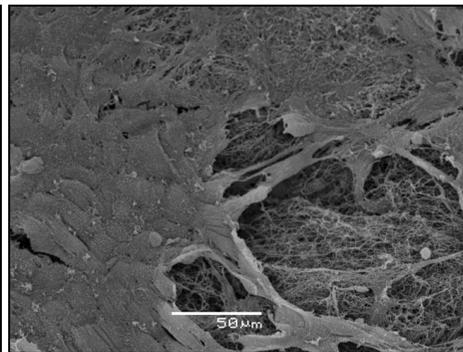


Figura-44- Semipanorámica de un constructo celular que ilustra la formación de monocapas celulares sobre el hidrogel plasmático. ADMSC, 4 semanas de cultivo *in vitro*.

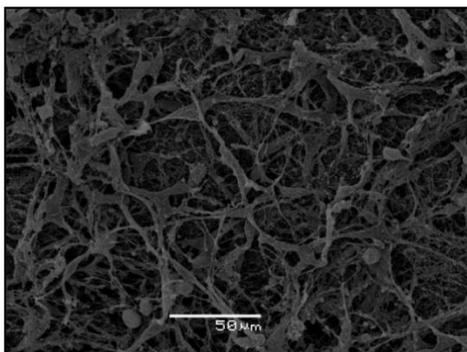


Figura-45- ADMSC al cabo de 8 semanas de cultivo *in vitro*. Se aprecia claramente la morfología fibroblástica de las células que muestran grandes prolongaciones citoplasmáticas estableciendo una red interconectada.

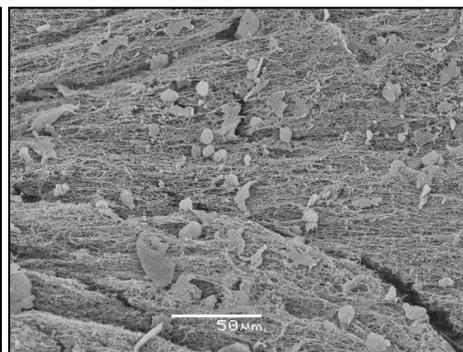


Figura-46- ADMSC sometidas a inducción condrogénica al cabo de 6 semanas de cultivo *in vitro*. Se aprecia la coexistencia de células de morfología fibroblástica y células de aspecto redondeado sobre la matriz tridimensional.

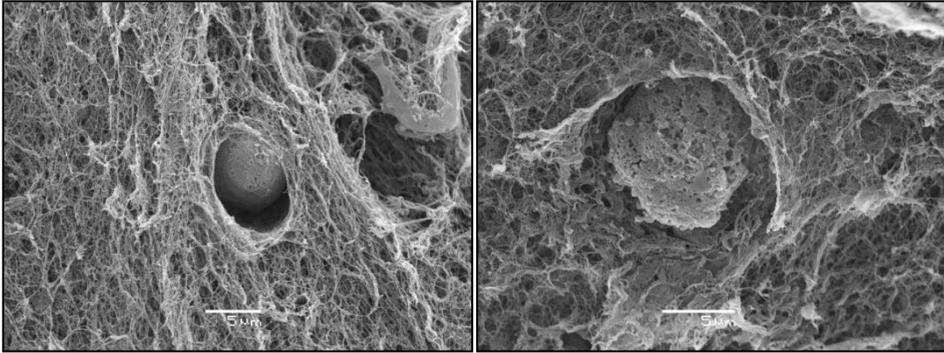


Figura-47- Detalle del hidrogel en el que se advierte la presencia de un condrocito articular inmerso en la red fibrilar formando una laguna en ella. 4 semanas.

Figura-48- Detalle del andamiaje tridimensional en el que se observa la superficie rugosa de un condrocito articular mantenido en cultivo durante 6 semanas.

En la figura-49- se muestra la integración de todos los tipos celulares en la malla tridimensional de fibrina.

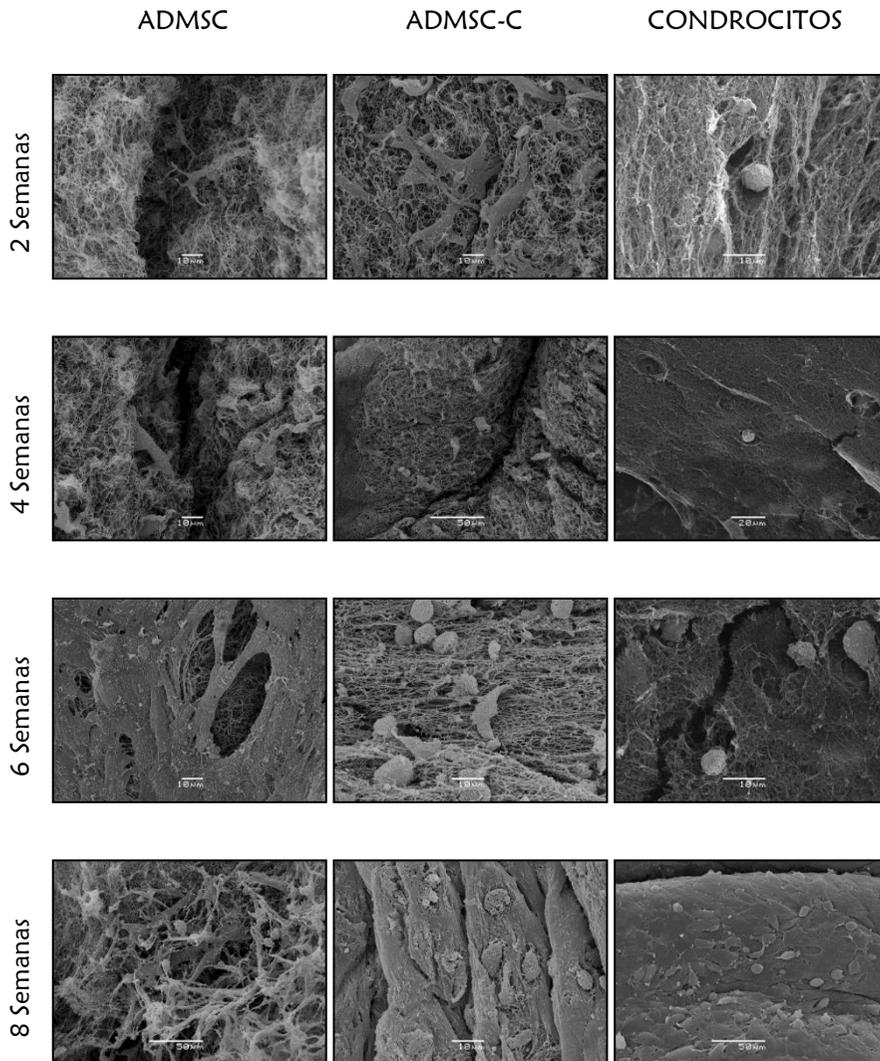


Figura-49- Imágenes de microscopía electrónica de barrido de cada tipo celular estudiado en el interior de los hidrogeles plasmáticos. Las ADMSC alimentadas con medio de cultivo estándar muestran una morfología de tipo fibroblástica, con prolongaciones citoplasmáticas prominentes. A diferencia de éstas, los condrocitos articulares son más pequeños, redondeados y tienden a localizarse en el interior de lagunas dentro del entramado fibrilar mientras que las ADMSC sometidas a diferenciación condrogénica, que a las 2 semanas tienen una morfología claramente fibroblástica, tienden a adquirir una morfología redondeada al cabo de 4-6 semanas e incluso pueden observarse formaciones de tipo laguna en la matriz que rodea las células al cabo de 8 semanas.

## PROLIFERACIÓN CELULAR

La digestión enzimática de los hidrogeles permitió cuantificar las poblaciones celulares en su interior mediante la técnica azul Tripán y establecer así el patrón proliferativo de cada tipo celular en el interior de los andamiajes tridimensionales.

En la figura-50- se observa una gráfica que muestra cómo las células entraron rápidamente en fase exponencial de crecimiento, que continuó hasta las 8 semanas de cultivo *in vitro*. Las ADMSC no sometidas a diferenciación mostraron una mayor proliferación durante el cultivo tridimensional, mostrando diferencias estadísticamente significativas a las 6 y 8 semanas de cultivo respecto a las ADMSC-C ( $p \leq 0,1$ ) y a las 6 semanas respecto a los condrocitos articulares ( $p \leq 0,05$ ). Sin embargo, las poblaciones celulares de tipo condroide (ADMSC-C y condrocitos articulares) mostraron patrones proliferativos similares a lo largo de las 8 semanas de cultivo tridimensional.

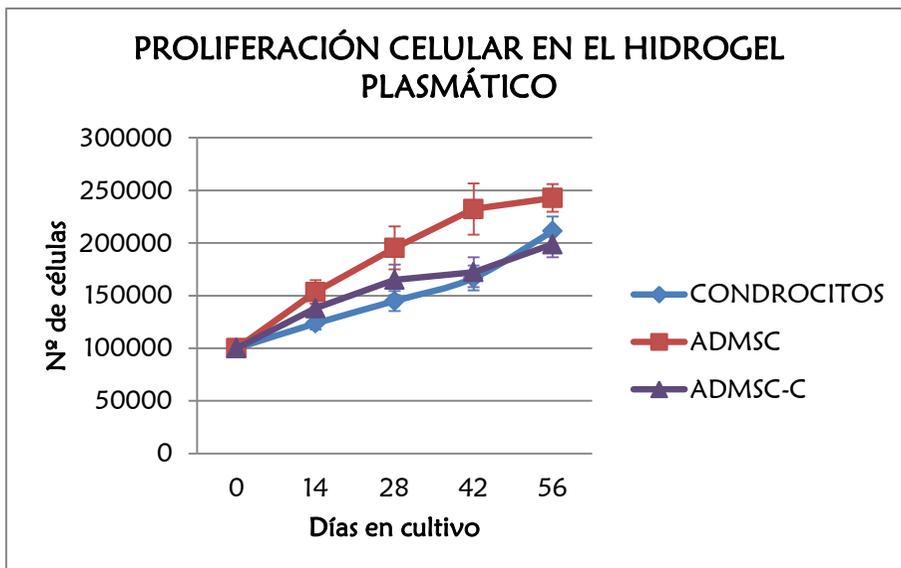


Figura-50- Patrones proliferativos *in vitro* de las distintas poblaciones celulares (condrocitos articulares, ADMSC y ADMSC diferenciadas condrogénicamente) en el interior del hidrogel plasmático. n=3, 2 réplicas por caso.

---

## ANÁLISIS HISTOLÓGICO

---

El análisis histológico de los constructos celulares se realizó tomando como referencia las características propias del cartílago articular en lo que se refiere a la presencia de células de morfología redondeada que se disponen en el interior de lagunas esféricas y que sintetizan los glicosaminoglicanos y las fibras de colágeno tipo II que conforman la matriz cartilaginosa en la que se encuentran embebidas.

Así pues, las secciones histológicas de las matrices celulares a las 2, 4, 6 y 8 semanas de cultivo fueron sometidas a la tinción hematoxilina-eosina para el estudio de la morfología celular, la tinción azul Alcian para analizar la producción de glicosaminoglicanos y la detección inmunohistoquímica de colágeno tipo II (Figuras-51-, -52- y -53-).

Las matrices de fibrina y ácido hialurónico conteniendo ADMSC y mantenidas con medio de cultivo base, no mostraron signos de producción de glicosaminoglicanos ni de síntesis de colágeno tipo II a lo largo del experimento. Las células mantuvieron su morfología fibroblástica con prominentes procesos citoplasmáticos durante las 8 semanas de cultivo tridimensional.

Las ADMSC sometidas a inducción condrogénica en el interior de los hidrogeles mostraron a las 2 semanas una morfología alargada que fue volviéndose redondeada entre las 4 y 6 semanas de cultivo, momento en el que se pudo apreciar que algunas células comenzaban a acumular glicosaminoglicanos y colágeno tipo II en la matriz circundante. Al cabo de 8 semanas de cultivo, la presencia de glicosaminoglicanos y colágeno tipo II fue más notoria.

A lo largo de las 8 semanas de estudio los condrocitos articulares mostraron una morfología redondeada en el interior de lagunas dispersas por la matriz tridimensional, pero especialmente en los bordes

de la misma. La presencia de glicosaminoglicanos y colágeno tipo II en estos constructos fue evidente desde las 2 semanas de cultivo, pero se hizo más intensa a partir de las 4 semanas.

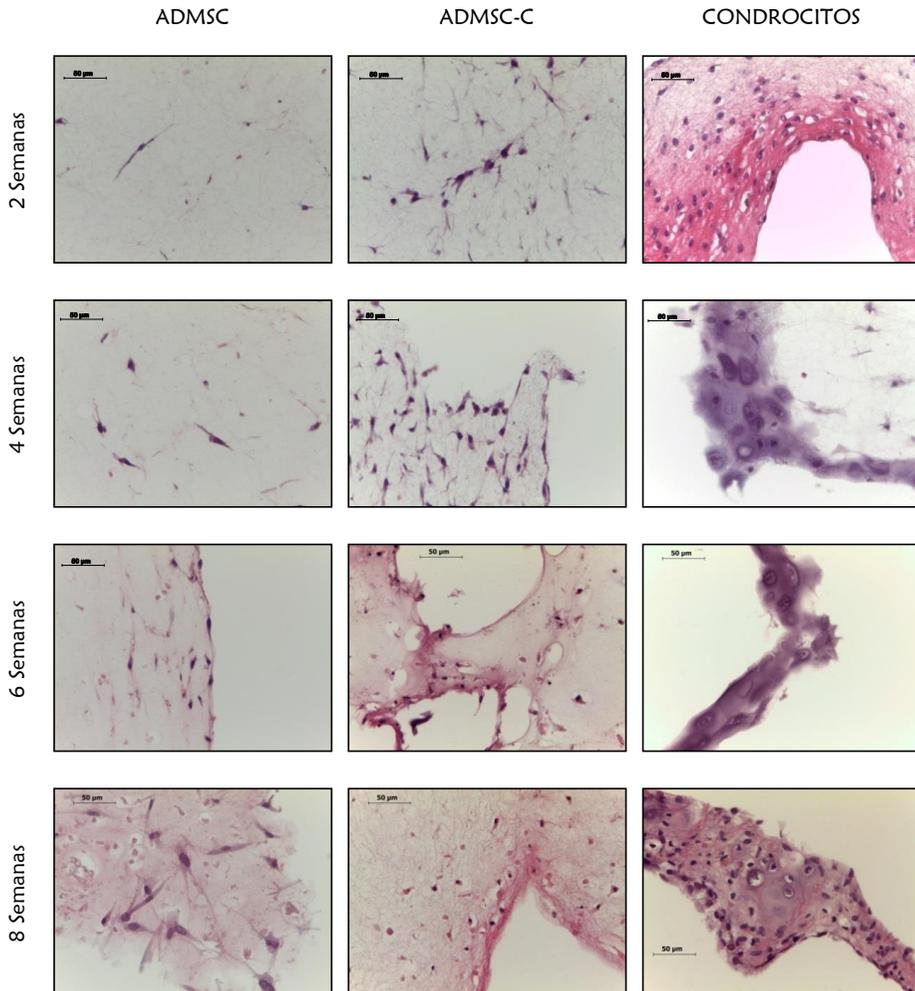


Figura-51- Detalles de cortes histológicos en los que se observa la morfología comparada de los 3 tipos celulares estudiados en el interior de los hidrogeles a lo largo del experimento *in vitro*. Puede apreciarse el contraste entre la morfología fibroblástica de las ADMSC y la morfología redondeada de los condrocitos articulares que forman lagunas en el interior del andamiaje. Las ADMSC-C, que a las 2 y 4 semanas muestran una morfología alargada con proyecciones citoplasmáticas similares a las ADMSC, al cabo de 6 y 8 semanas en cultivo tridimensional adquieren una morfología de tipo condroide, esto es, redondeada y con tendencia a disponerse en el interior de lagunas dentro de la matriz. Tinción hematoxilina-eosina.

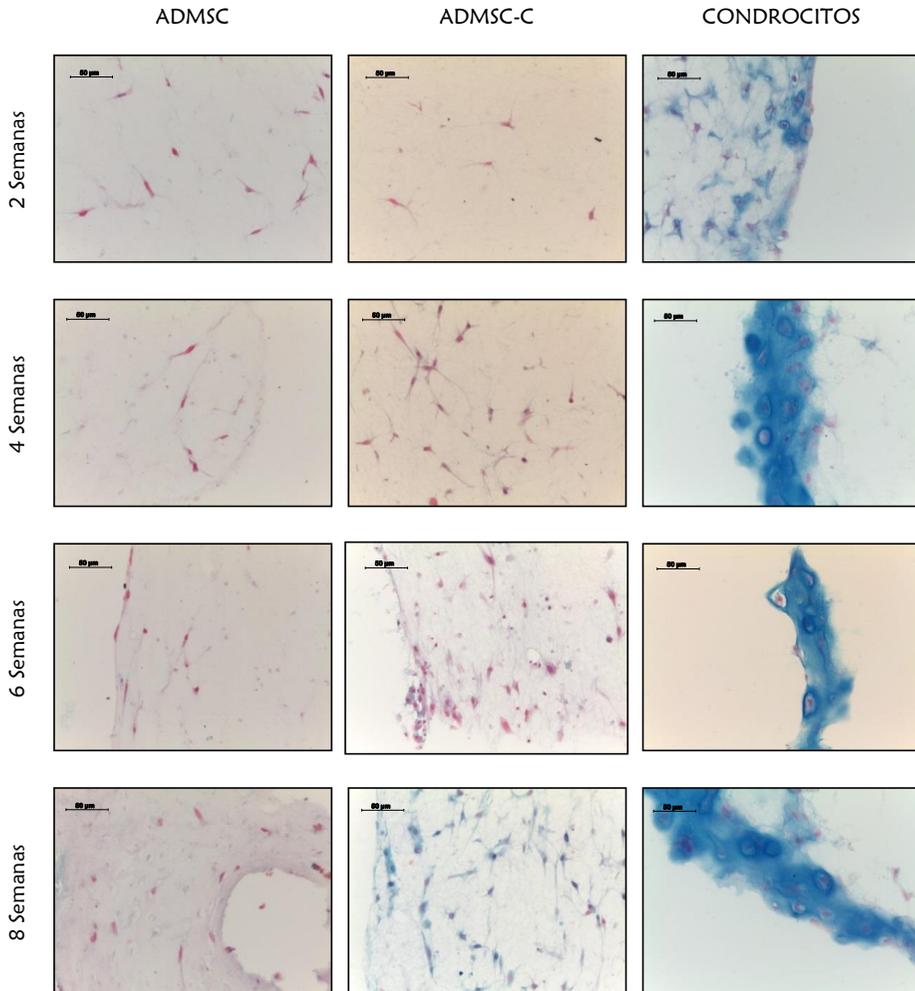


Figura-52- Detalles de cortes histológicos en los que se observa la presencia de glicosaminoglicanos en el interior de las matrices tridimensionales que contienen los 3 tipos celulares estudiados a lo largo de las 8 semanas de cultivo *in vitro*. Se puede observar claramente como los constructos que contienen condrocitos articulares muestran una tinción importante con azul Alcian a las 2 semanas de cultivo, que se vuelve muy intensa a partir de las 4 semanas. En el caso de las ADMSC no se observa coloración alguna de la matriz en ninguna de las muestras estudiadas. Las ADMSC-C muestran una leve tinción con azul Alcian a las 6 y 8 semanas de cultivo que se limita a la zona adyacente a las células. Tinción azul Alcian.

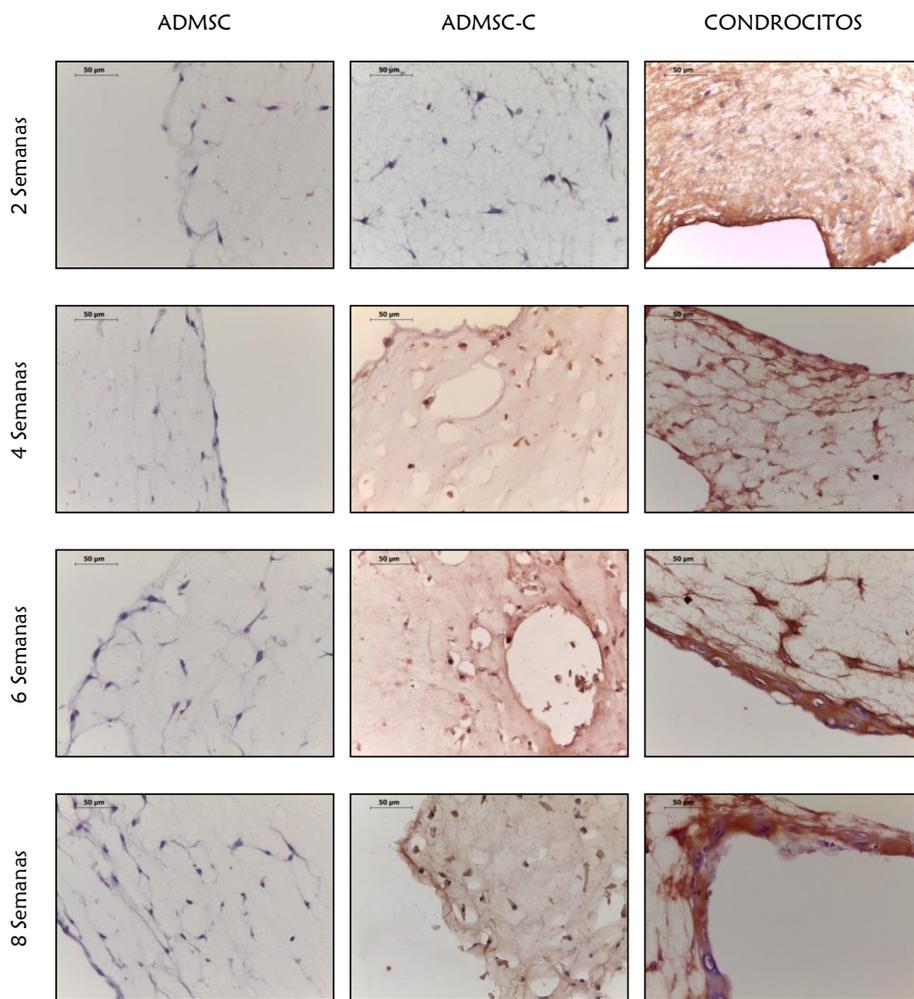


Figura-53- Detalles de los cortes histológicos en los que se observa la presencia de colágeno tipo II en el interior los hidrogeles en los 3 tipos celulares en los 4 tiempos de estudio. Puede observarse la ausencia de la proteína colágena en los andamiajes con ADMSC durante todo el protocolo experimental. Por el contrario, las matrices con condrocitos articulares mostraron una importante producción de colágeno tipo II desde las 2 semanas de cultivo *in vitro* que se mantuvo durante todo el experimento. En el caso de las ADMSC inducidas condrogénicamente (ADMSC-C), las células comenzaron a sintetizar colágeno tipo II y acumularlo en la matriz tridimensional a las 4-6 semanas y ese colágeno se mantuvo asociado a la matriz hasta las 8 semanas de cultivo. Técnica: detección inmunohistoquímica de colágeno tipo II. Inmunohistoquímica de colágeno tipo II.



**Resultados Etapa 2:**

**ESTUDIO *IN VIVO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS**

De los 11 conejos empleados en esta etapa del estudio, uno sirvió como animal de referencia y no fue sometido a intervención quirúrgica alguna, de los otros 10 que fueron intervenidos, uno falleció durante la intervención quirúrgica por complicaciones anestésicas y otro tuvo que ser eutanasiado 4 semanas tras la intervención por fallo en el proceso de cicatrización de la herida quirúrgica. Así pues, el número de animales objeto de estudio fue finalmente de 8 individuos, que fueron intervenidos para la creación de una lesión osteocondral en cada hemicóndilo femoral (n=32) tratada con aloinjerto óseo sobre el que se colocó el implante según el grupo de estudio.

Tras 12 semanas de evolución, los animales fueron eutanasiados y se procedió a la disección de los fémures distales, tomando fotografías y posteriormente radiografías de los mismos para comprobar el aspecto general y la localización de las lesiones y facilitar así su posterior ubicación durante el estudio histológico.

Macroscópicamente, las lesiones fueron, en general, fácilmente localizables en los cóndilos femorales de los animales de experimentación en el momento de la eutanasia. Mientras el animal de referencia mostraba una superficie articular intacta compuesta por un tejido cartilaginoso brillante, blanco, liso y compacto (Figura-54-), las articulaciones de los animales en los que se realizó la lesión experimental mostraban diversos signos de degeneración articular. La imágenes radiográficas sirvieron para ayudar a la localización de los defectos articulares.

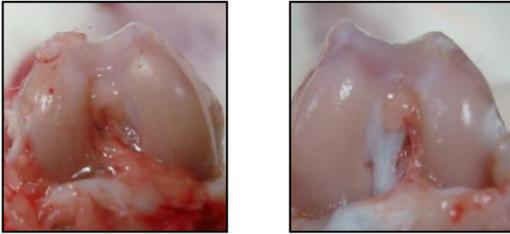


Figura-54- Aspecto macroscópico de los cóndilos femorales del animal no sometido a intervención

La exposición de los resultados de esta etapa del estudio se realizará planteando los hallazgos de los distintos grupos: hidrogel acelular (Grupo I), hidrogel conteniendo condrocitos articulares (Grupo II), hidrogel con ADMSC (Grupo III) e hidrogel conteniendo ADMSC diferenciadas a condrocitos (Grupo IV).

### Grupo I: hidrogel acelular

Un total de 8 lesiones experimentales fueron tratadas con implante óseo e hidrogel acelular. Uno de los animales presentó signos de inflamación y alteración del movimiento en la extremidad tratada, el resto cicatrizaron correctamente y mantuvieron una funcionalidad articular normal.

Al cabo de 12 semanas las lesiones eran visibles macroscópicamente, estando todas ellas localizadas en la región central de la zona de carga de los hemicóndilos femorales salvo la lesión del hemicóndilo lateral GI-4 que estaba en posición más anterior.

Se observaron escasos signos de reparación, mostrándose una superficie articular deprimida en la zona de la lesión en el 50% de los casos estudiados que tendía a rellenarse de un tejido blanquecino que no estaba integrado con el tejido adyacente sano, siendo los bordes de la lesión perfectamente identificables (Figura-55-). Solo en uno de los casos (hemicóndilo medial GI-2) se observó integración del tejido neoformado y recuperación total de la superficie articular.

La aplicación de la escala ICRS modificada dio un valor medio de  $2,875 \pm 0,875$  sobre 6 puntos lo que corresponde con una lesión de Grado III con cartílago articular dañado (Figura-56-).

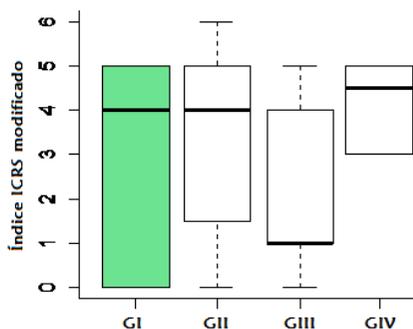


Figura-56- Índice ICRS modificado. Se observa una gran variabilidad en los resultados dentro del grupo I sin diferencias estadísticamente significativas con el resto de los grupos experimentales.

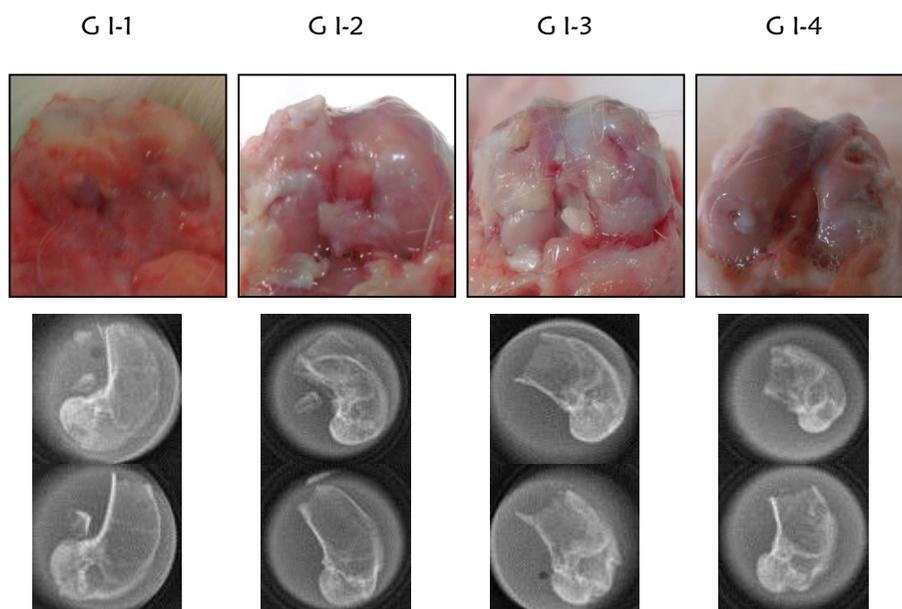


Figura-55- Aspecto macroscópico y radiológico de los hemicondilos femorales de los animales del Grupo I a las 12 semanas de evolución. La imagen GI-1 corresponde al animal que mostró alteraciones en la funcionalidad de la extremidad, pueden observarse importantes signos de inflamación y degeneración de los tejidos periarticulares. En las radiografías se observan las imágenes osteolíticas correspondientes a los defectos osteocondrales yuxtaarticulares.

El análisis histológico de las lesiones osteocondrales puso en evidencia una respuesta tisular de reparación en todos los casos estudiados.

La superficie articular estuvo constituida casi exclusivamente por tejido conectivo (Figura-57-), con distintos grados de desarrollo fibrilar desde laxo (Figura-60-), a muy denso (Figura-58-), y ocasionalmente vascularizado (Figuras-59- y -64-), pudiendo éste estar cubierto de una capa superficial de tejido que recordaba a la membrana sinovial de la articulación (Figuras-59- y -65-).

Solo en dos de los casos se apreció presencia de tejido condroide: en uno de ellos aparecía un foco de tejido condroide aislado en el tejido conectivo predominante (Figura-62-), y en el otro caso se observó tejido condroide hiper celular aunque la superficie articular seguía siendo

de naturaleza fibrosa (Figura-63-); ambos casos estuvieron relacionados con la presencia de hueso subcondral sano.

En el hueso subcondral pudo apreciarse la presencia de una tidemark entre leve (Figura-61-) y bien conservada (Figura-57-), bajo la que se encontró un tejido óseo con trabéculas finas y laberínticas y diferentes grados de actividad remodeladora (Figuras-65, -66- y -67-) e islotes de médula ósea.

El análisis del marcaje fluorescente mostró un aumento de incorporación del penúltimo fluorocromo aplicado (rojo alizarina a las 8 semanas de evolución) respecto a los anteriores, lo que se traduce como un aumento de la actividad ósea en el contorno de la lesión en etapas tardías de la experiencia (Figuras-68-, -69- y -70-). El último marcaje, aplicado 3 días antes del sacrificio no pudo visualizarse en las muestras histológicas.

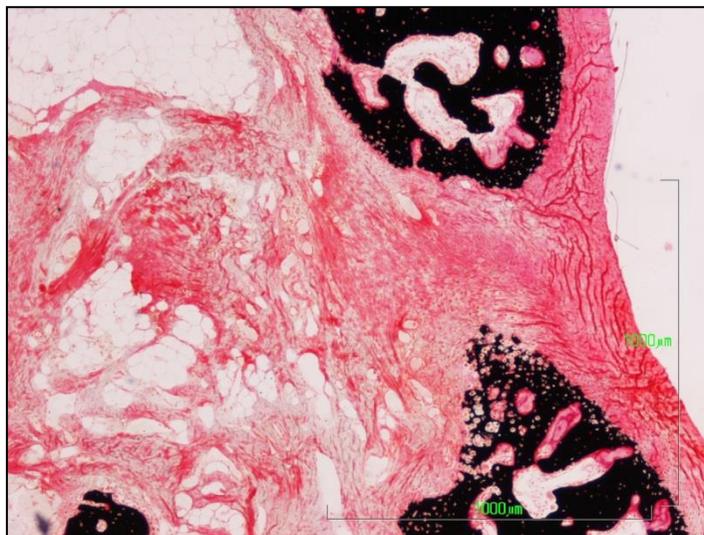


Figura-57-: Grupo I (hidrogel acelular). Panorámica de lesión donde se observa la discontinuidad ósea ocupada por tejido conectivo moderadamente fibroso. El hueso existente presenta un contorno irregular, apolillado, con signos de calcificación, que engloba grupos o células aisladas. Donde está presente, la tidemark está bien conservada. La superficie articular está constituida prácticamente en su totalidad por tejido conectivo fibroso. Tinción V. Kossa.

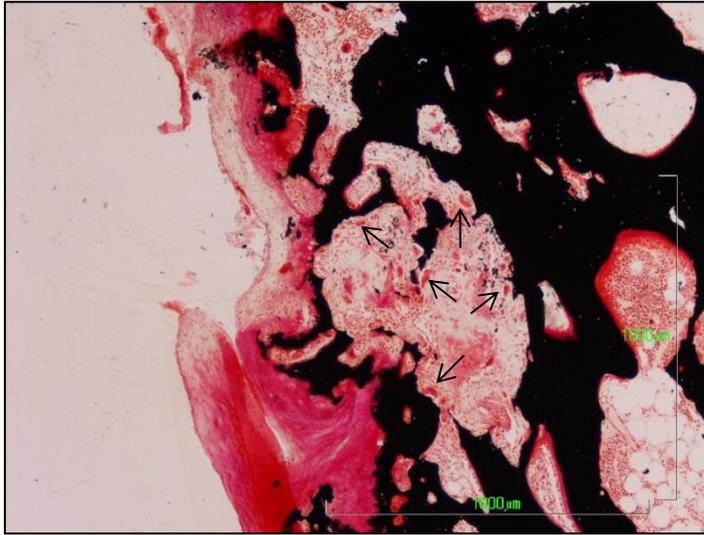


Figura-58: Grupo I (hidrogel acelular). Panorámica de lesión donde se observa hueso neoformado con importantes procesos de remodelación adoptando una estructura laberíntica. Se aprecian islotes de médula ósea hematopoyética. Entre las formaciones óseas se observan numerosos procesos de remodelación confirmados por la presencia de abundantes osteoclastos (flechas). La superficie articular está constituida por tejido conectivo. Tinción V. Kossa.

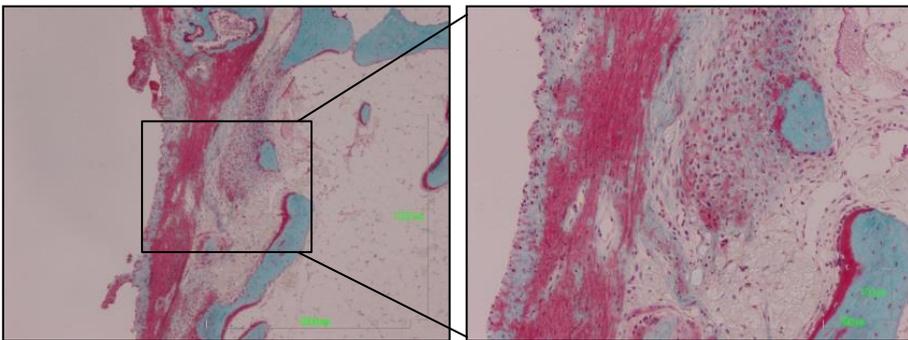


Figura-59: Grupo I (hidrogel acelular) Panorámica y detalle de lesión que muestra una superficie articular formada por tejido conectivo vascularizado relativamente denso recubierta por una capa superficial que recuerda a la membrana sinovial de la articulación. No se observa médula ósea hematopoyética entre el escaso entramado óseo. Tinción T. Goldner.

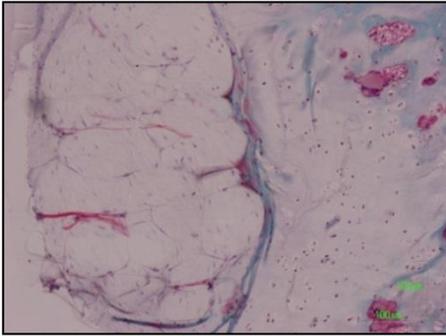


Figura-60:- Grupo I (hidrogel acelular). Detalle de lesión en el que se observa la presencia en superficie articular (parte izquierda de la imagen) de una matriz amorfa, laxa, de naturaleza conectiva con células fibroblásticas en su interior. Tinción T. Goldner.

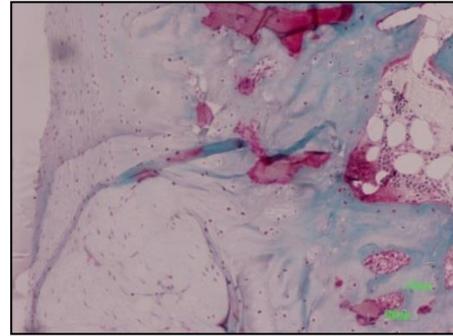


Figura-61:- Grupo I (hidrogel acelular). Detalle de lesión en el que se observa un hueso subcondral poco denso sobre el que encontramos una capa de cartílago calcificado y la presencia de una tidemark poco definida. Tinción T. Goldner.



Figura-62:- Grupo I (hidrogel acelular). Panorámica de lesión. Junto al tejido conectivo fibroso que rellena la fracción condral de la lesión, se observa un islote de tejido condroide (flecha) relacionado con la presencia de hueso subcondral bien estructurado. Tinción T. Goldner.

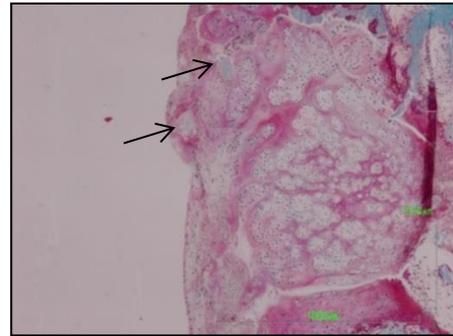


Figura-63:- Grupo I (hidrogel acelular). Semipanorámica de lesión del único caso en el que se observa tejido condroide hiper celular relleno de parte de la fracción condral del defecto articular. La superficie articular sin embargo, presenta tejido conectivo fibroso con algún fragmento óseo residual (flechas). Tinción T. Goldner.



Figura-64:- Grupo I (hidrogel acelular). Panorámica de lesión donde se observa la superficie articular conformada por tejido conectivo vascularizado y la presencia de un fragmento óseo residual (flecha). Tinción V. Kossa.

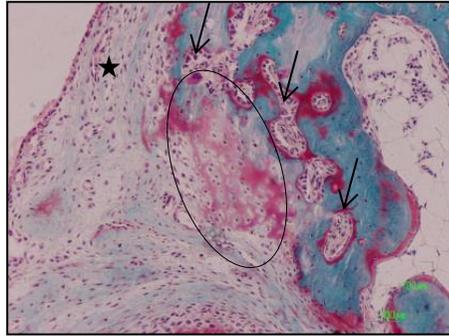


Figura-65:- Grupo I (hidrogel acelular). Detalle de la lesión en el que se observan fenómenos de remodelación ósea: hueso subcondral en remodelación en el que se distingue actividad osteogénica de naturaleza endocondral (círculo), remodelación ósea evidenciada por la presencia de ribetes osteoblásticos activos (flechas) y también la presencia de vasos sanguíneos en el tejido conectivo de la superficie articular (estrella). Tinción T. Goldner.

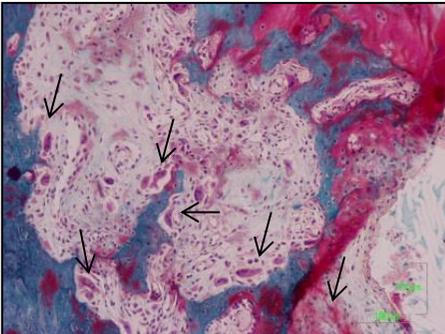


Figura-66:- Grupo I (hidrogel acelular). Detalle de la lesión en el que se aprecia tejido óseo en remodelación con abundantes osteoclastos (flechas). Tinción T. Goldner.

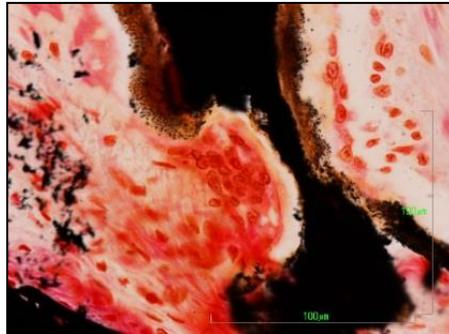


Figura-67:- Grupo I (hidrogel acelular). Detalle de osteoclasto reabsorbiendo una trabécula ósea. Tinción V. Kossa.

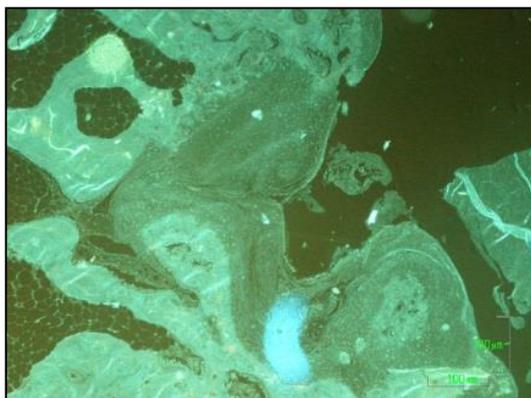


Figura-68-

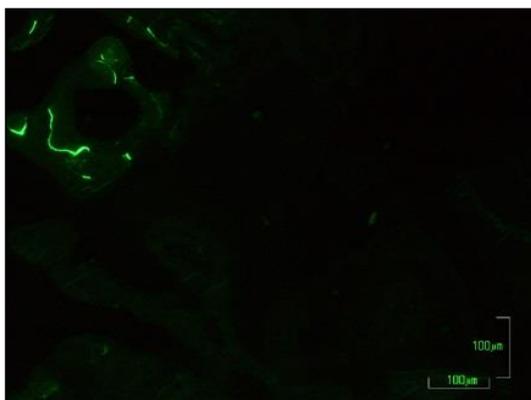


Figura-69-

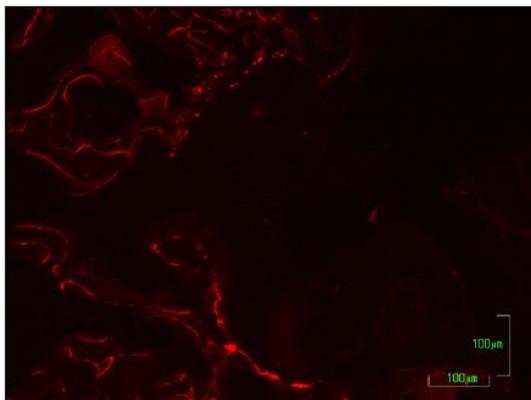


Figura-70-

Figuras-68, -69- y -70-: Grupo I (hidrogel acelular). Detalles de la lesión en los que se observan los marcajes fluorescentes: tetraciclina 3 días post-intervención (M13), calceína 4 semanas (M14) y rojo alizarina 8 semanas (M15). El marcaje con tetraciclina es difuso a causa de la administración de tetraciclina como profilaxis antibiótica a los animales de experimentación. Destaca la intensa actividad formadora de hueso a partir de las 8 semanas post-intervención.

---

**Grupo II: hidrogel con condrocitos articulares**

Un total de 8 lesiones experimentales fueron tratadas con implante óseo e hidrogel con condrocitos articulares. Todos los animales evolucionaron favorablemente con una cicatrización correcta de las heridas quirúrgicas y mostraron una funcionalidad articular normal.

Al cabo de 12 semanas casi todas las lesiones eran visibles macroscópicamente, estando todas ellas localizadas en la región central de la zona de carga de los cóndilos femorales.

Se observaron ciertos signos de regeneración: la superficie articular se encontraba conservada en la mayoría de los casos y no siempre se distinguían claramente los bordes de la lesión. Solo en uno de los casos (hemicóndilo lateral GII-3) se observaba una prominente depresión en la zona de la lesión (Figura-71-).

El tejido de relleno fue en el 50% de los casos de color blanquecino opaco aunque en la otra mitad de los casos tenía un aspecto y consistencia prácticamente indistinguibles del cartílago articular sano adyacente.

La aplicación de la escala ICRS modificada dio un valor medio de  $3,375 \pm 0,778$  sobre 6 puntos lo que corresponde a una lesión de Grado III con cartílago articular dañado en menor grado que en los grupos I y III pero sin diferencias estadísticamente significativas (Figura-72-).

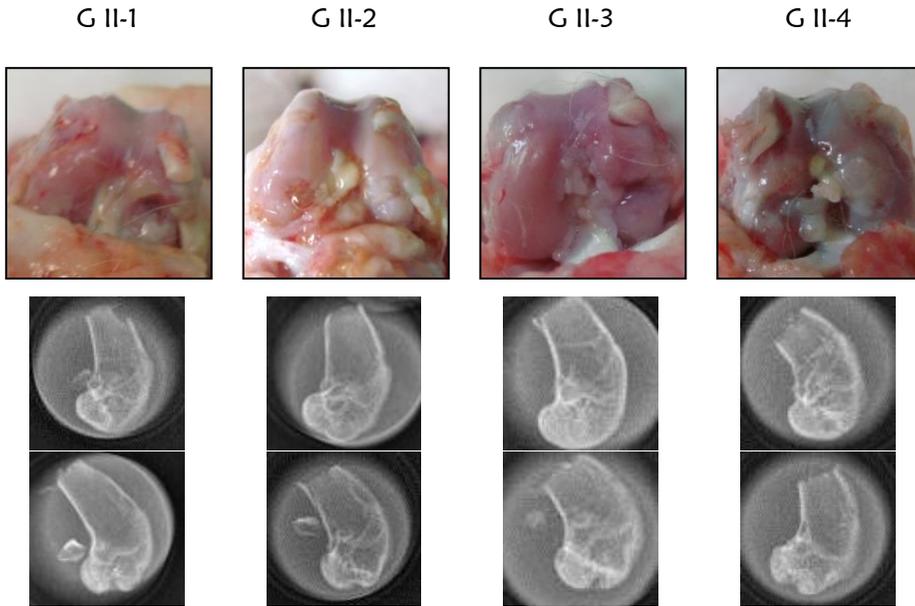


Figura-71- Aspecto macroscópico y radiológico de los hemicóndilos femorales de los animales del Grupo II a las 12 semanas de evolución.

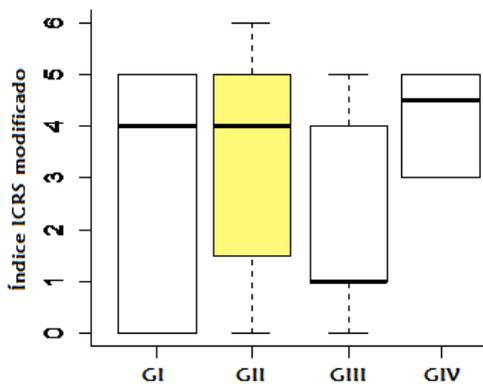


Figura-72- Índice ICRS modificado. Se observa una gran variabilidad en los resultados que tienen a posicionarse en segundo lugar tras el grupo IV pero sin diferencias estadísticas significativas con el resto de los grupos experimentales.

El análisis histológico de las lesiones osteocondrales tras 12 semanas de evolución puso en evidencia una respuesta tisular regeneradora del tejido osteocondral en los casos estudiados.

En la superficie articular de la zona lesionada predominó el tejido cartilaginoso formado a expensas de condronas hipertróficas (Figura-73-), con tendencia a la organización columnar de los condrocitos maduros (Figuras-74- y -75-) y sin presencia de vasos sanguíneos. Solo en uno de los casos experimentales se observó presencia de tejido conectivo de aspecto fibrilar en la región condral de la lesión (Figura-78-).

En algunos casos se encontraron espículas óseas residuales del implante inmersas en la fracción cartilaginosa del defecto. Esos fragmentos de hueso no eran sometidos a procesos de remodelación y permanecían inertes embebidos en la matriz cartilaginosa (Figura-76- y -77-). Se observaron numerosos focos de osificación endocondral rudimentaria del lecho óseo de la lesión que generaron una matriz ósea calcificada que posteriormente evolucionaba a hueso maduro subcondral mediante fenómenos de remodelación ósea (Figuras-80-, -81- y -82-). La tidemark estaba generalmente bien definida y asociada a un lecho óseo correctamente vascularizado.

Frecuentemente aparecían elementos quísticos en la profundidad del defecto articular (Figura-79-). Se trataba de formaciones circulares al corte con una cavidad central generalmente ocupada por sustancia amorfa entremezclada con células aisladas o formando pequeños grupos. La pared estaba constituida por células de aspecto epitelioide o condroide y recubierta por una cápsula de tejido conectivo moderadamente fibroso. Parecían provocar fenómenos de reabsorción en el tejido óseo circundante.

El análisis del marcaje fluorescente hizo evidente, como en el caso anterior, un aumento de incorporación del penúltimo fluorocromo aplicado (rojo alizarina a las 8 semanas de evolución) respecto a los anteriores, lo que es indicativo de un aumento de la actividad ósea en la zona de la lesión en las últimas semanas de evolución (Figuras-83-, -84- y -85-). El último marcaje, aplicado 3 días antes del sacrificio no pudo visualizarse en las muestras histológicas.

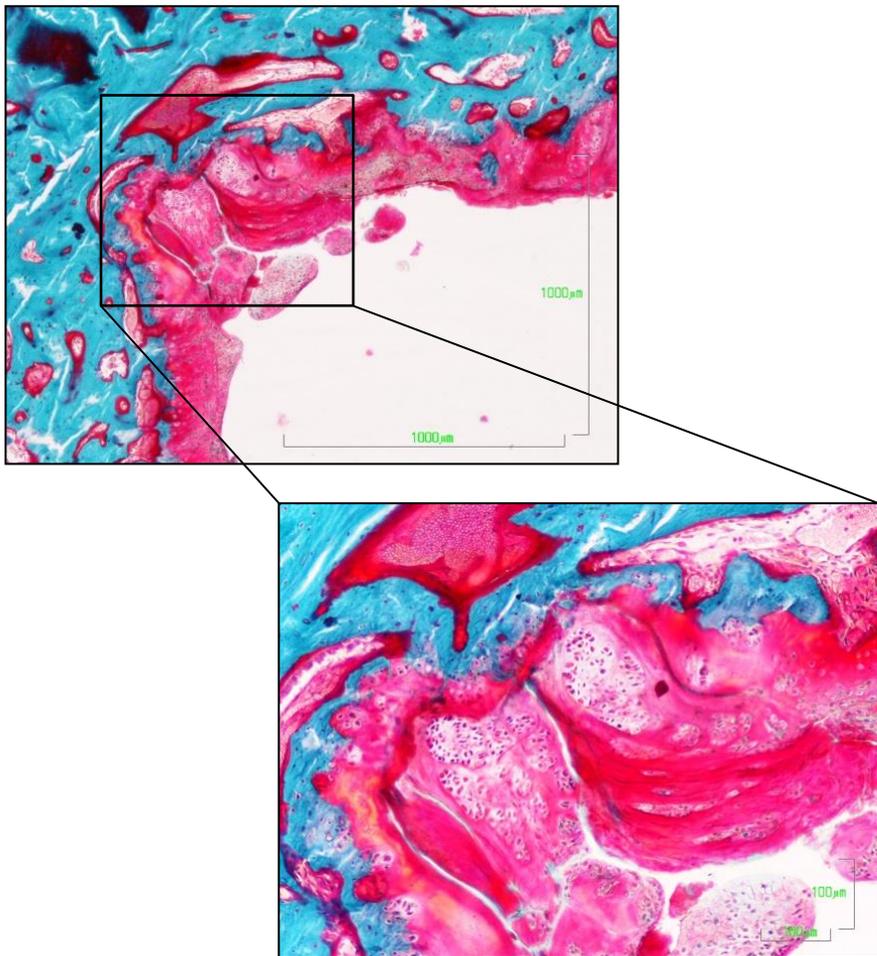


Figura-73- Grupo II (hidrogel con condrocitos). Panorámica y detalle de la lesión en el que se observa una superficie articular compuesta por tejido predominantemente cartilaginoso formado por importantes grupos de condronas hipertróficas. El hueso subcondral es abundante y vascularizado, con una tidemark y línea de cimentación bien definidas. Tinción T. Goldner.

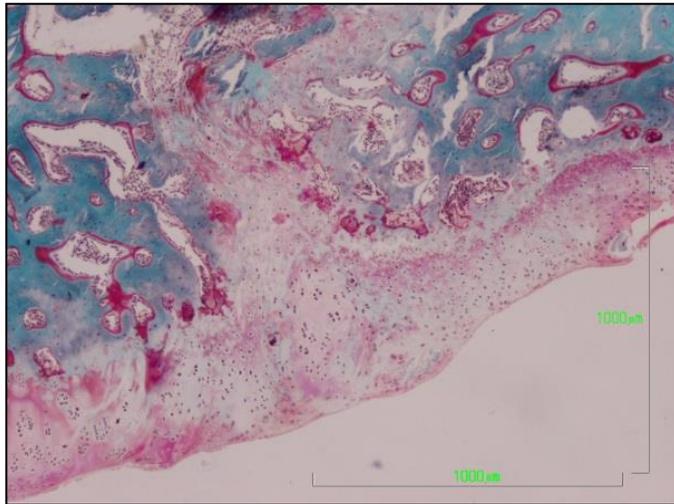


Figura-74- Grupo II (hidrogel con condrocitos). Panorámica de la lesión en la que se aprecia la naturaleza condroide predominante en el tejido que recubre la superficie articular. Algunos de los condrocitos inmersos en él empiezan a adoptar la disposición columnar típica del cartílago hialino. La línea de cimentación se observa definida, con un hueso subcondral correctamente vascularizado. Tinción T. Goldner.

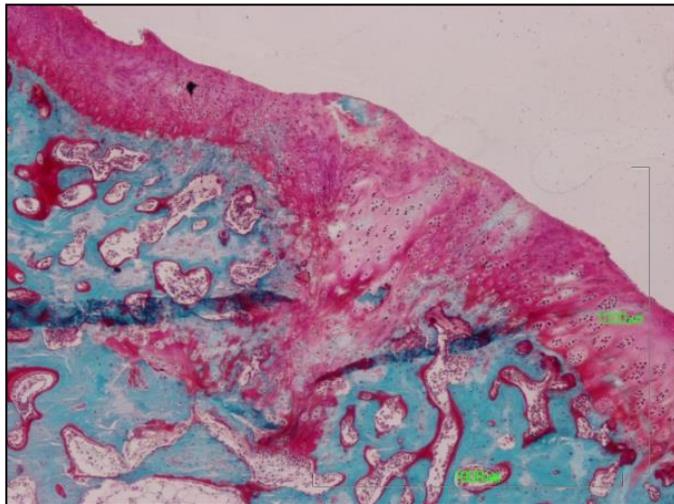


Figura-75- Grupo II (hidrogel con condrocitos). Panorámica de la lesión en la que se aprecia tejido condroide recubriendo la superficie articular con condrocitos en parejas y disposición columnar. La tidemark y la línea de cimentación se observan definidas, con una placa de hueso subcondral intensamente vascularizado. Tinción T. Goldner.



Figura-76- Grupo II (hidrogel con condrocitos). Detalle de lesión en el que se aprecia la presencia de fragmentos óseos producto del acto quirúrgico englobados en el tejido articular de naturaleza condroide. Tinción V. Kossa.

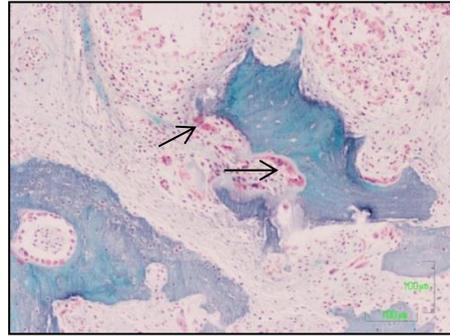


Figura-77- Grupo II (hidrogel con condrocitos). Detalle de la lesión en el que se pueden observar dos tipos de fragmentos óseos. A la izquierda de la imagen hay una trabécula ósea en formación, con células vivas en su interior. El fragmento óseo de la derecha es un resto del aloinjerto óseo implantado que está siendo reabsorbido por osteoclastos (flechas). Tinción T. Goldner.



Figura-78- Grupo II (hidrogel con condrocitos). Panorámica de la lesión en la que se observa tejido conectivo principalmente recubriendo la lesión con presencia de condronas hipertróficas. La línea de cimentación y la placa de hueso subcondral están en proceso de formación. Se observa también un fragmento de aloinjerto óseo quirúrgico (flecha). Tinción V. Kossa.

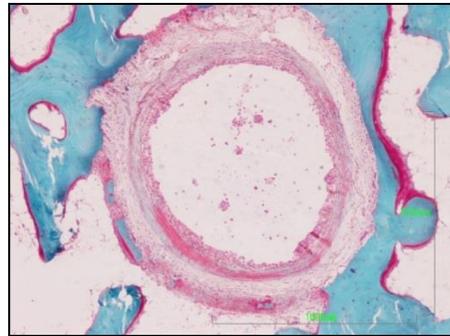


Figura-79- Grupo II (hidrogel con condrocitos). Semipanorámica de lesión en la que se destaca la presencia de un quiste entre el tejido óseo. Tinción T. Goldner.

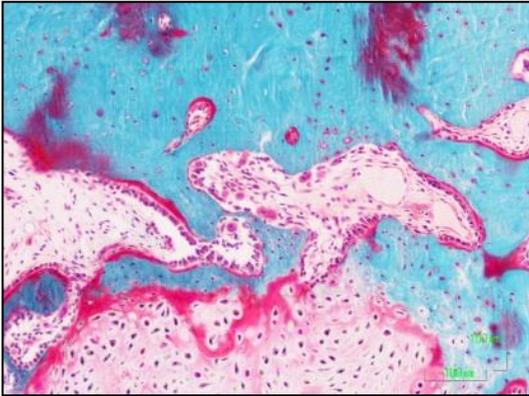


Figura-80- Tinción T. Goldner

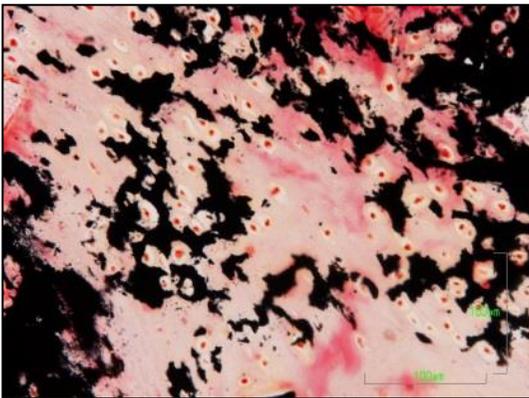


Figura-81- Tinción V. Kossa

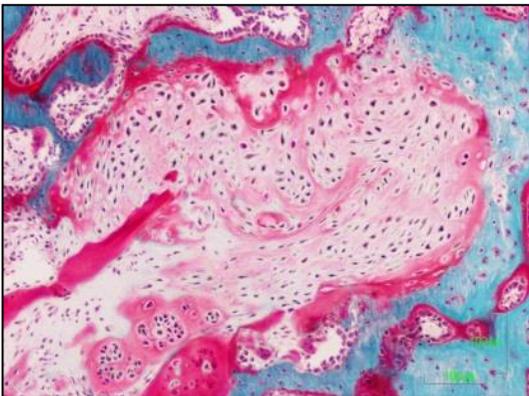


Figura-82- Tinción T. Goldner

Figuras-77-, -78- y -79-. Grupo II (hidrogel con condrocitos). Detalles de lesión en los que se aprecia el fenómeno de osificación endocondral por el que células de aspecto condroide generan una matriz de tipo óseo que posteriormente es calcificada.

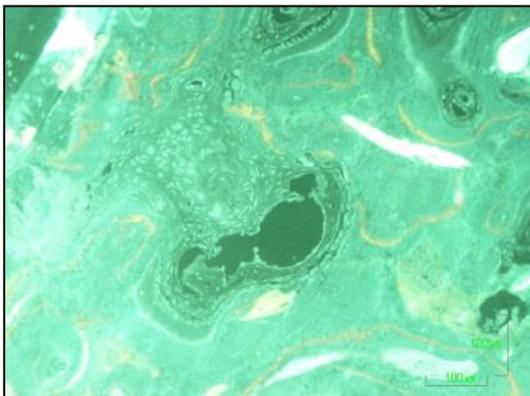


Figura-83-

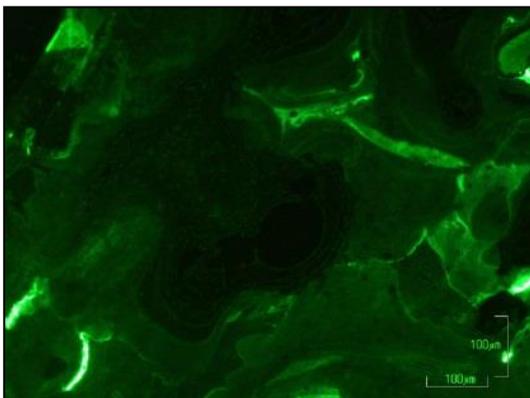


Figura-84-

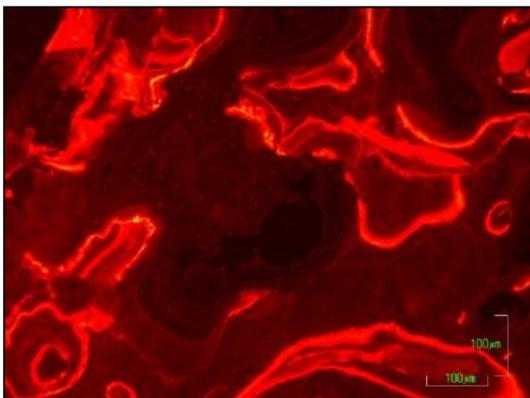


Figura-85-

Figuras-83-, -84 y -85-: Grupo II (hidrogel con condrocitos). Detalles de la lesión en los que se observan los marcajes fluorescentes: tetraciclina 3 días post-intervención (-83-), calceína 4 semanas (-84-) y alizarina 8 semanas (-85-). El marcaje con tetraciclina es difuso a causa de la administración de tetraciclina como profilaxis antibiótica a los animales de experimentación. Destaca la intensa actividad formadora de hueso a partir de las 8 semanas post-intervención.

---

### Grupo III: hidrogel con ADMSC

Un total de 8 lesiones experimentales fueron tratadas con implante óseo e hidrogel con ADMSC. Uno de los animales presentó dificultades en la cicatrización superficial de la herida quirúrgica mostrando ciertos signos de cojera en esa pata. El resto de los animales de experimentación mostraron una evolución favorable y una funcionalidad articular normal.

Al cabo de 12 semanas todas las lesiones eran visibles macroscópicamente, estando todas ellas localizadas en la región central de la zona de carga de los hemicóndilos femorales.

Se observaron ciertos signos de regeneración tisular en dos de los casos (hemicóndilos lateral y medial GIII-2) en los que la superficie articular se recuperó totalmente siendo rellenada la lesión con un tejido blanquecino pero consistente. En el resto de los casos la regularidad de la superficie articular estuvo entre poco o nada conservada y el tejido de relleno era opaco y de color blanco (Figura-86-).

La aplicación de la escala ICRS modificada dio un valor medio de  $2,125 \pm 0,693$  sobre 6 puntos lo que corresponde con una lesión de Grado III con cartílago articular dañado sin diferencias estadísticamente significativas respecto a los otros grupos experimentales (Figura-87-).

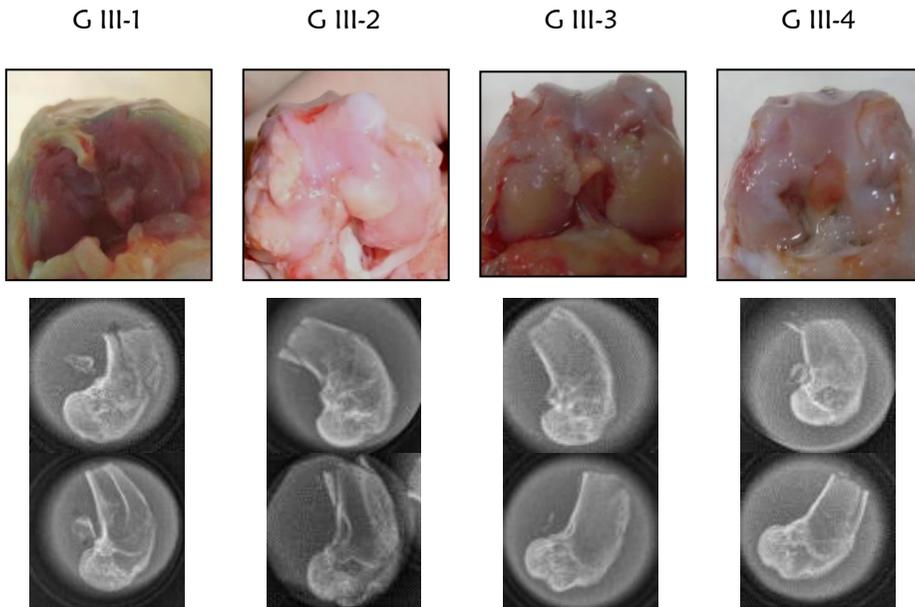


Figura-86- Aspecto macroscópico y radiológico de los hemicondílos femorales de los animales del Grupo III a las 12 semanas de evolución. La articulación GIII-1 fué la que se encontró en peores condiciones y correspondía con el animal que tuvo dificultades con la cicatrización de la herida quirúrgica y que mostro signos de cojera. En las radiografías se observan las imágenes osteolíticas correspondientes a los defectos osteocondrales.

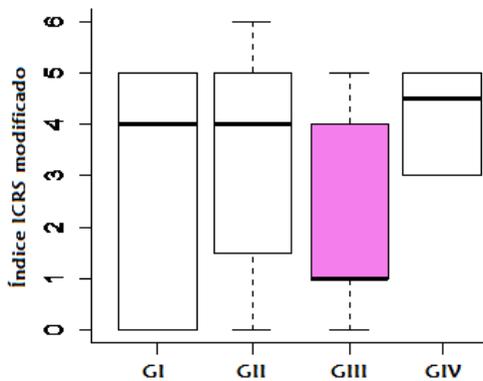


Figura-87- Índice ICRS modificado. Se observa que el grupo III presenta el menor grado de regeneración tisular pero sin diferencias estadísticamente significativas con el resto de los grupos experimentales.

El análisis histológico de las lesiones tras 12 semanas de evolución puso en evidencia una respuesta tisular principalmente reparadora del tejido osteocondral en los casos estudiados. En la superficie articular de la zona lesionada era predominante la presencia de tejido conectivo más o menos laxo con abundantes vasos sanguíneos (Figura-88-). En algunos casos la capa de tejido conectivo en superficie recordaba a la membrana sinovial articular (Figura-91-). En algunas zonas el tejido conectivo de la fracción condral de la lesión estuvo acompañado de algunos focos de tejido condroide minoritarios (Figuras-89-, -90-). Solo en uno de los casos estudiados se observaron condronas hipertróficas rellenando la lesión condral, pero en su superficie encontramos una capa de tejido conectivo fibrilar (Figuras-94-, -95-).

Era común la presencia de espículas óseas residuales del aloinjerto implantado inmersas en la fracción cartilaginosa del defecto (Figuras-93-, -97-, -98-). Esos fragmentos óseos estaban generalmente siendo reabsorbidos por células gigantes de cuerpo extraño (Figuras-91-, -92-).

El hueso subcondral y la tidemark estaban generalmente bien conservados en los laterales del defecto mientras que en la zona central de la lesión se encontraban mayoritariamente en proceso de formación con diferentes grados de vascularización (Figura-88-). Se encontraron importantes fenómenos de remodelación ósea mediada por la actividad de osteoclastos y osteoblastos (Figuras-96-, -97-).

El análisis del marcaje fluorescente hizo evidente, como en los casos anteriores, una marcada incorporación del penúltimo fluorocromo aplicado (rojo alizarina a las 8 semanas de evolución) respecto a los anteriores, indicativo de un aumento de la actividad ósea en la zona de la lesión en las últimas semanas de evolución (Figuras-99-, -100-, -101-).

El último marcaje, aplicado 3 días antes del sacrificio no pudo visualizarse en las muestras histológicas.

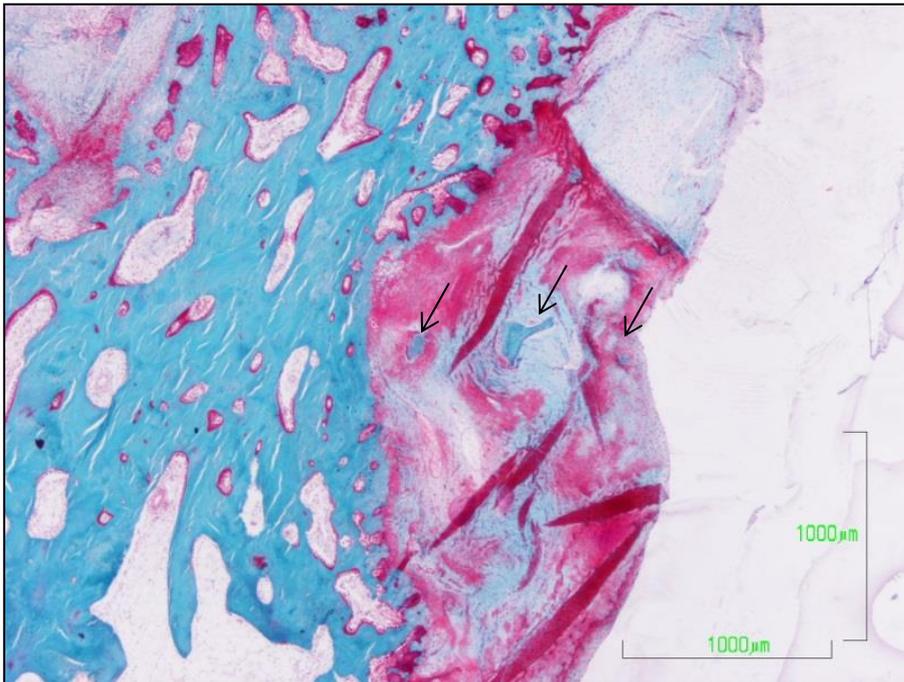


Figura-88- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Panorámica de la lesión en la que se observa el hueso subcondral bien vascularizado con una línea de cimentación bien definida salvo en el centro del defecto donde se está formando. La porción articular de la lesión muestra un tejido conectivo laxo con algunas áreas más ricas en fibras y presencia de vasos sanguíneos. Existen restos de aloinjerto óseo embebidos en el tejido conectivo articular (flechas). Tinción T. Goldner.



Figura-89- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Detalle de la lesión en el que se aprecia el tejido articular predominantemente fibroso con pequeños focos de tejido de naturaleza condroide (flechas). Tinción V. Kossa.

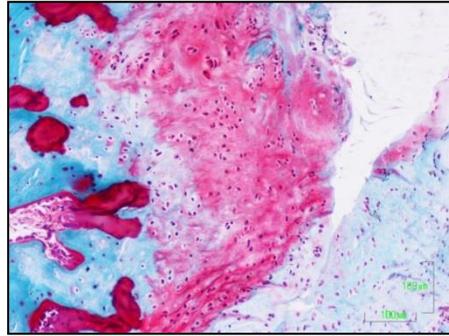


Figura-90- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Detalle de la lesión en el que se observa el hueso subcondral vascularizado y la coexistencia de tejido conectivo (derecha) y condroide (izquierda) en la superficie articular. Tinción T. Goldner.



Figura-91- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Semipanorámica de la lesión en la que se observan numerosos vasos sanguíneos (círculo) dispersos por el tejido conectivo que rellena la fracción condral del defecto y que está recubierto por otra capa de tejido conectivo que recuerda a la membrana sinovial. Se aprecian varias células gigantes de cuerpo extraño (flechas). Tinción T. Goldner.

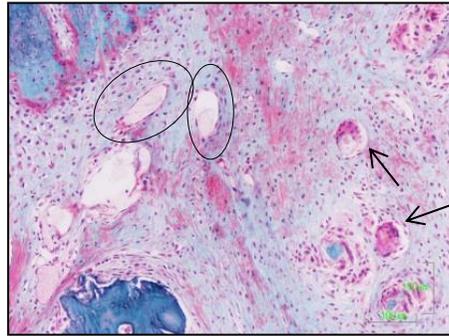


Figura-92- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Detalle de la porción articular de la lesión en el que se observan células gigantes multinucleadas (flechas) y vasos sanguíneos inmersos en el tejido conectivo (círculos). Tinción T. Goldner.

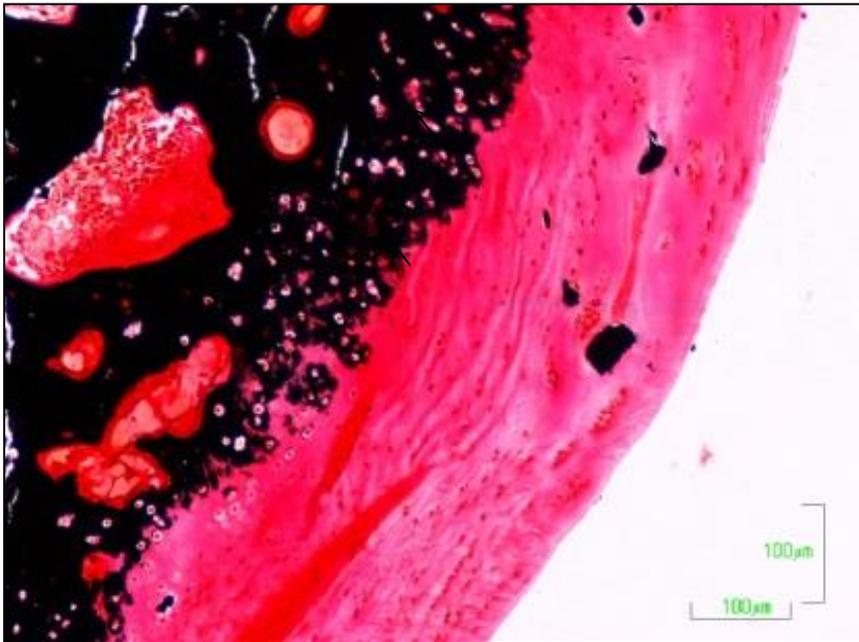


Figura-93- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Detalle de la lesión en el que se aprecia el borde apolillado del hueso subyacente sin los vasos sanguíneos típicos de la placa de hueso subcondral. Sobre el mismo hay un tejido conectivo fibroso denso en el que se encuentran inmersas varias espículas óseas. Tinción V. Kossa.

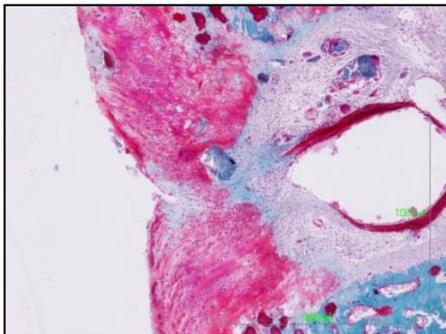


Figura-94- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Semipanorámica de la lesión en la que se observa la naturaleza mixta fibrosa y condroide del tejido que rellena la fracción articular del defecto. Tinción T. Goldner.

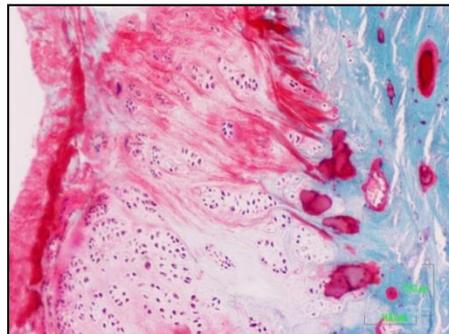


Figura-95- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Detalle de la lesión en el que se aprecia la presencia de condronas hipertróficas. La superficie articular está sin embargo recubierta por tejido conectivo fibroso. Tinción T. Goldner.

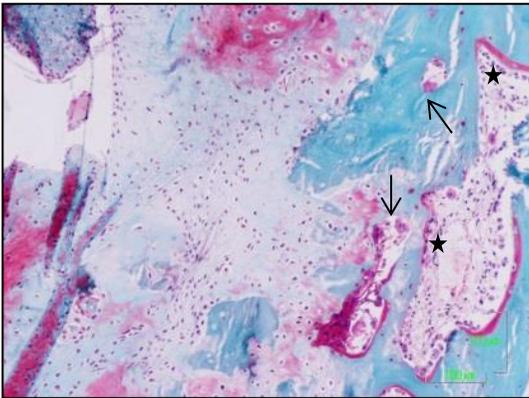


Figura-96- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Detalle de la lesión en el que se observan procesos de remodelación ósea en el hueso subcondral mediada por osteoclastos (flechas) y osteoblastos (estrellas). Tinción T. Goldner.

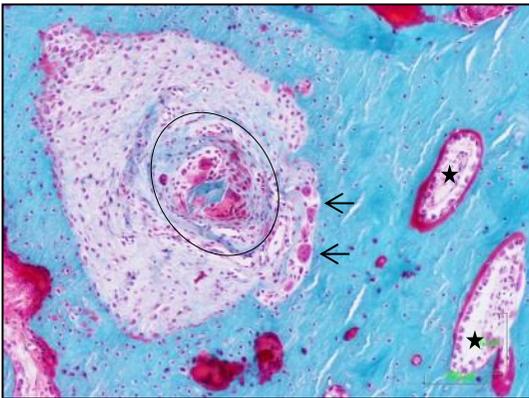


Figura-97- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Detalle de la lesión en el que se aprecian los procesos de absorción del aloinjerto óseo mediante células multinucleadas gigantes (círculo) y de remodelación ósea mediada por osteoclastos (flechas) y osteoblastos (estrellas). Tinción T. Goldner.

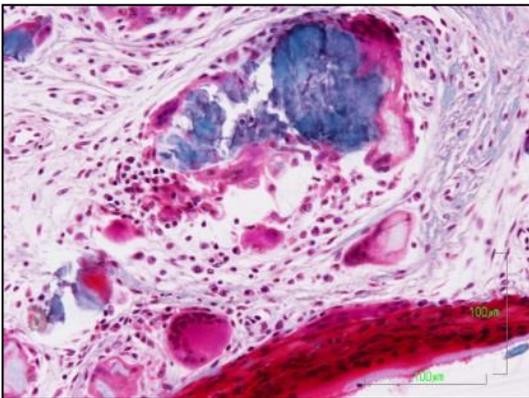


Figura-98- Grupo III (hidrogel con ADMSC). Detalle de la lesión en el que se ilustra el proceso de degradación de los restos de aloinjerto óseo mediado por células gigantes multinucleadas. Tinción T. Goldner.

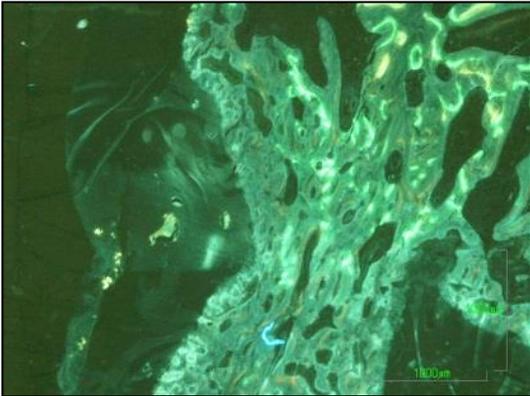


Figura-99-

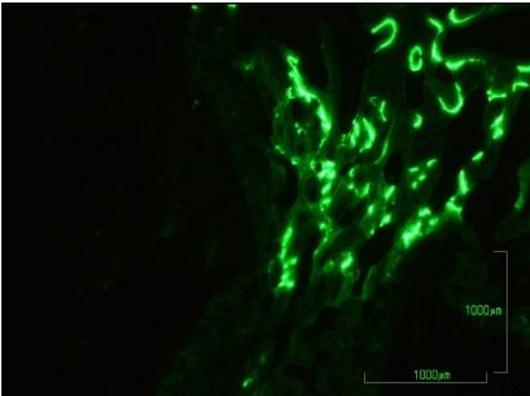


Figura-100-

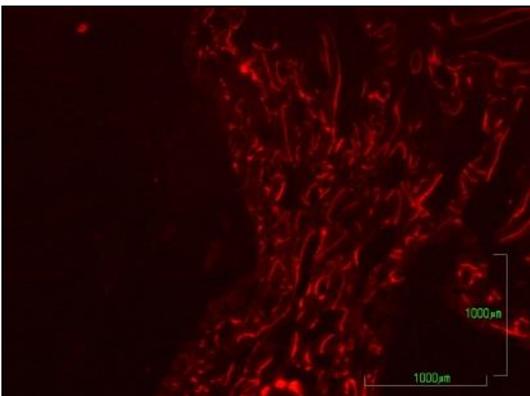


Figura-101-

Figuras-99-, -100- y -101-: Grupo III (hidrogel con ADMSC). Semipanorámicas de la lesión en las que se observan los marcajes fluorescentes: tetraciclina 3 días post-intervención (-96-), calceína 4 semanas (-97-) y alizarina 8 semanas (-98-). El marcaje con tetraciclina es difuso por la administración de tetraciclina como profilaxis antibiótica a los animales de experimentación. Destaca la intensa actividad formadora de hueso a partir de las 8 semanas post-intervención.

---

**Grupo IV: hidrogel con ADMSC diferenciadas condrogénicamente**

Un total de 8 lesiones experimentales fueron tratadas con implante óseo e hidrogel con ADMSC diferenciadas condrogénicamente. Todos los animales mostraron una evolución post-quirúrgica favorable con una cicatrización correcta de las heridas y una funcionalidad articular normal.

Al cabo de 12 semanas todas las lesiones eran visibles macroscópicamente, estando todas ellas localizadas en la región central de la zona de carga de los hemicóndilos femorales.

Se observaron importante signos de reparación articular en todos los casos estudiados, en los que la superficie articular se recuperó totalmente estando el tejido de relleno perfectamente integrado con el cartílago sano adyacente siendo ese tejido neoformado de color blanco opaco en la mitad de los casos y de aspecto hialino en la otra mitad (Figura-102-).

La aplicación de la escala ICRS modificada dio un valor medio de  $4,125 \pm 0,35$  sobre 6 puntos lo que corresponde con una lesión de Grado II con cartílago articular alterado sin diferencias estadísticamente significativas respecto al resto de los grupos experimentales (Figura-103-).

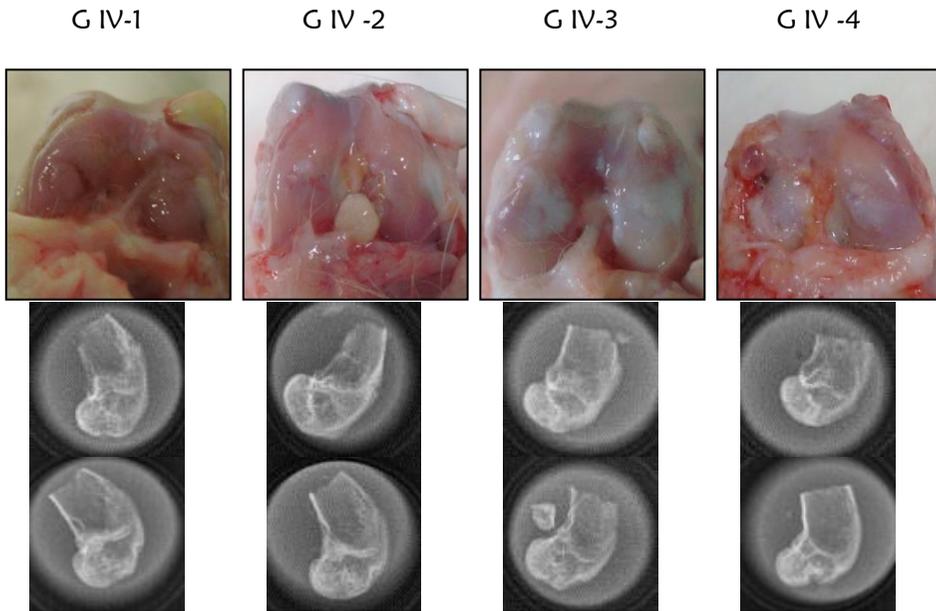


Figura-102- Aspecto macroscópico y radiológico de los hemicondílos femorales de los animales del Grupo IV a las 12 semanas de evolución. Se observa claramente como las lesiones articulares de los casos GIV-3 y GIV-4 son rellenadas en su totalidad por un tejido principalmente de color blanco y opaco que está bien integrado. En los casos GIV-1 y GIV-2 el tejido neoformado se parece macroscópicamente al cartílago hialino. Las imágenes radiográficas sirvieron de soporte para la localización de las lesiones articulares post-mortem.

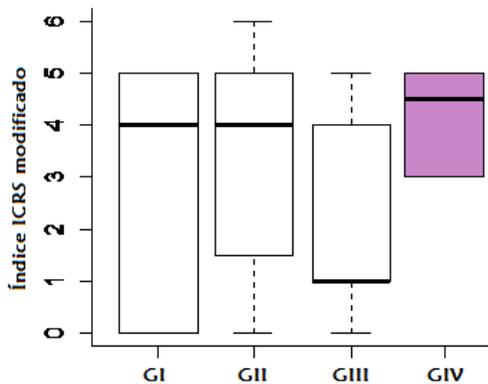


Figura-103- Se observa como el grupo IV presenta el mayor índice ICRS modificado sin diferencias estadísticamente significativas con el resto de los grupos experimentales.

El análisis histológico de las lesiones osteocondrales tras 12 semanas de evolución puso en evidencia una respuesta tisular regeneradora del tejido óseo y una formación de tejido condroide atípico en los casos estudiados.

En la superficie articular de la zona lesionada destacaba la presencia de células de morfología condroide, que llegaban a disponerse en parejas y pequeñas hileras, inmersas en una matriz fibrilar (Figuras-105-, -106-). Este tejido de tipo condrocítico estaba adelgazado respecto al cartílago sano adyacente (Figuras-108-, -113-, -114-). No se apreciaba presencia de vasos sanguíneos (Figura-104-).

En varios casos se encontraron espículas de aloinjerto óseo residuales en la fracción cartilaginosa del defecto. Esos fragmentos de hueso no estaban sometidos a procesos de remodelación y permanecían inertes embebidos en la matriz cartilaginosa (Figuras-104-, 109-, -110-).

Se apreciaba una importante osificación endocondral del lecho óseo de la lesión y reconstrucción del hueso subcondral, con la vascularización y formación de tidemark correspondiente (Figuras-107-, -109-, -111-, -112-). En ocasiones, esta formación de hueso subcondral se producía en varios focos que tendían a formar un frente único bajo el tejido condroide adelgazado (Figuras-113-, -114-).

El análisis del marcaje fluorescente hizo evidente, como en los casos anteriores, un aumento de incorporación del penúltimo marcaje aplicado (rojo alizarina a las 8 semanas de evolución) respecto a los anteriores, lo que indica un aumento de la actividad ósea en la zona de la lesión en las últimas semanas de evolución (Figuras-115-, -116-, -117-). El último marcaje, aplicado 3 días antes del sacrificio no pudo visualizarse en las muestras histológicas.

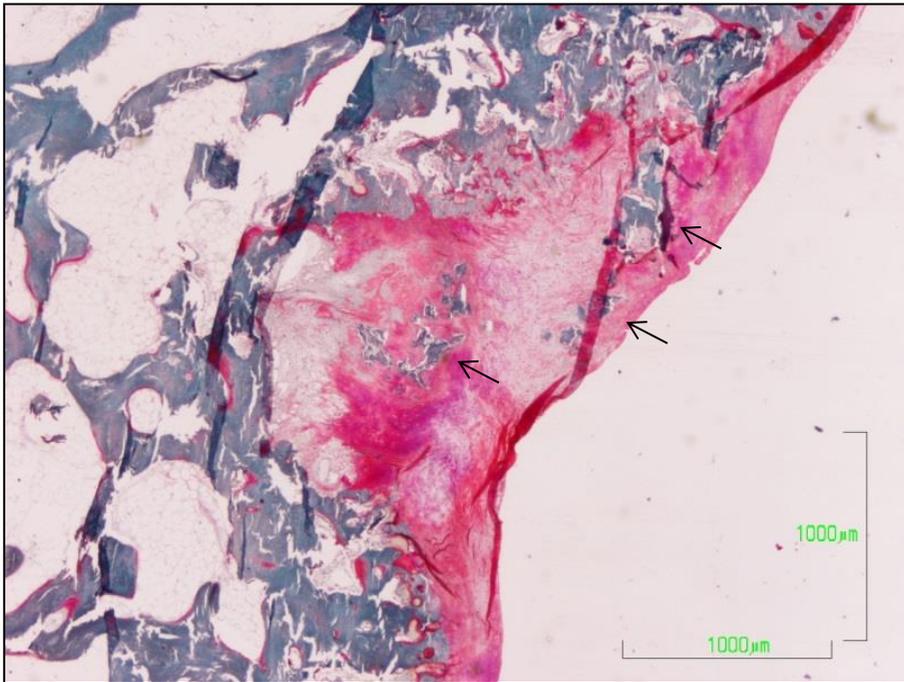


Figura-104- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Panorámica de lesión en la que se observa un hueso laberíntico con línea de cicatrización definida en los bordes de la lesión y en proceso de formación en la zona central. La fracción condral del defecto está rellena de una mezcla de tejido de tipo condroide y fibroso que se muestra adelgazado y con presencia de espículas óseas residuales (flechas). Tinción T. Goldner.

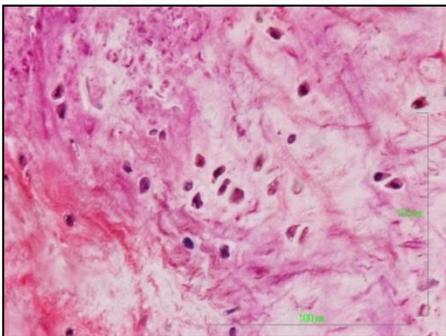


Figura-105- Tinción T. Goldner.

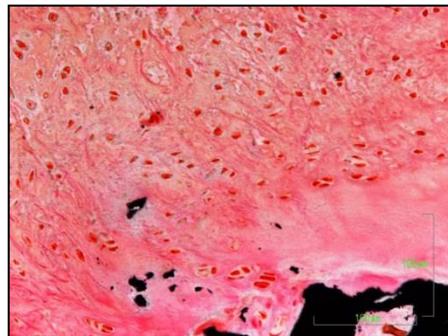


Figura-106- Tinción V. Kossa.

Figura-105- y -106- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Detalles de lesión que muestran el tejido de relleno de la fracción condral de la lesión. En ambos casos se observan células de morfología claramente condroide, que se disponen de forma aislada, en parejas e incluso formando pequeñas columnas. El tejido circundante es fundamentalmente de tipo fibroso.

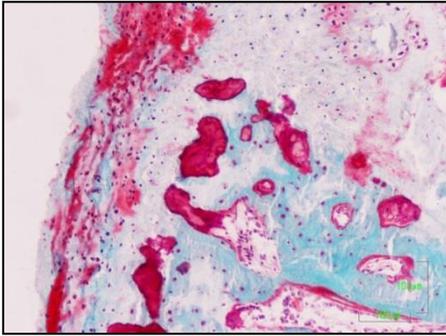


Figura-107- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Panorámica de la lesión en la que se aprecian importantes signos de osificación endocondral en el hueso subarticular sobre el que se está reconstruyendo la placa del hueso subcondral. Tinción T. Goldner.

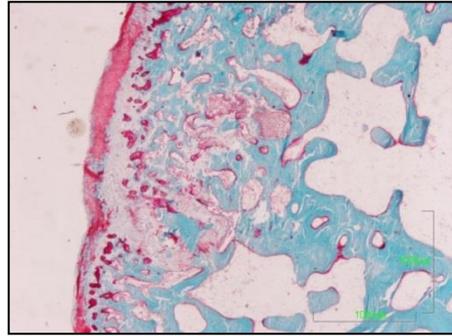


Figura-108- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Panorámica de la lesión en la que se distingue un cartílago articular adelgazado que descansa sobre un lecho de hueso subcondral en formación en el que destaca la presencia de vasos sanguíneos característicos de la placa subcondral. Tinción T. Goldner.

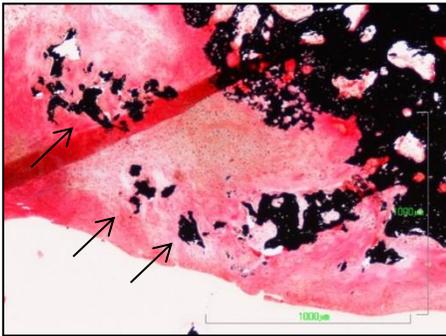


Figura-109- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Semipanorámica de la lesión en la que se observa la presencia de espículas óseas residuales del implante inmersas en la fracción condral del defecto (flechas). El tejido de la superficie articular está formado por células de naturaleza condroide, que en el lecho de la lesión se calcifican dando lugar a la formación de hueso subcondral. Tinción V. Kossa.

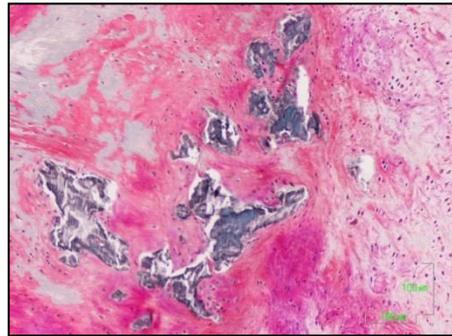


Figura-110- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Detalle de la lesión en el que destaca la presencia de esquirlas de aloinjerto óseo dispersas entre el tejido condroide avascular. Tinción T. Goldner.

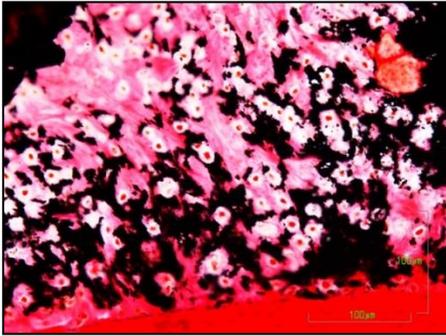


Figura-111- Tinción V. Kossa.

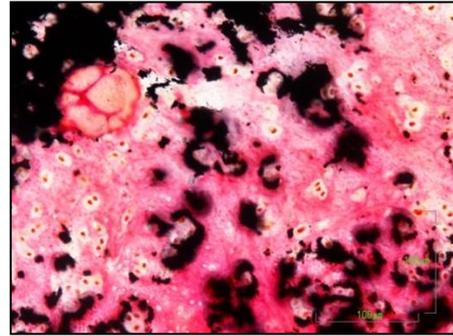


Figura-112- Tinción V. Kossa.

Figuras-111- y -112- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Detalles de lesión en los que se observa la calcificación del tejido condroide que da lugar a la formación de hueso subcondral. Se aprecia también la presencia de vasos sanguíneos típica del mismo así como la incipiente formación de la línea de cimentación.

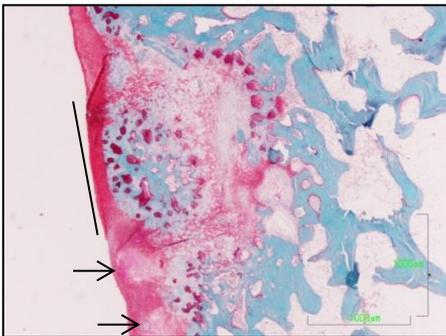


Figura-113- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Panorámica mostrando trabéculas de la epífisis femoral con hueso subcondral bien desarrollado en el nicho de la lesión, células de hábito condroide y un gran fragmento óseo funcionalmente activo con características osteo-vasculares de hueso subcondral rodeado lateralmente por células de hábito condroide inmersas en una matriz de color rojo. La superficie articular está constituida por tejido fibroso fundamentalmente (línea) que se continua con tejido cartilaginoso en la zona inferior (flechas). T. Goldner.



Figura-114- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Imagen semipanorámica teñida con la técnica de Von Kossa para demostrar el grado de calcificación, donde se observa la vitalidad y calcificación del fragmento óseo incluido en la lesión y adicionalmente se ve que parte de la matriz lateral se encuentra calcificada formando puentes con los bordes laterales de la lesión. Por debajo del fragmento óseo y entre este y el hueso subcondral que se continua con la epífisis predomina el tejido condroide con algo de conectivo con pocos signos de calcificación de la matriz. Tinción V. Kossa.

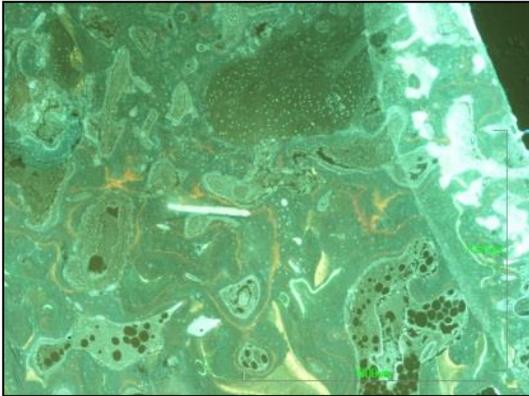


Figura-115-

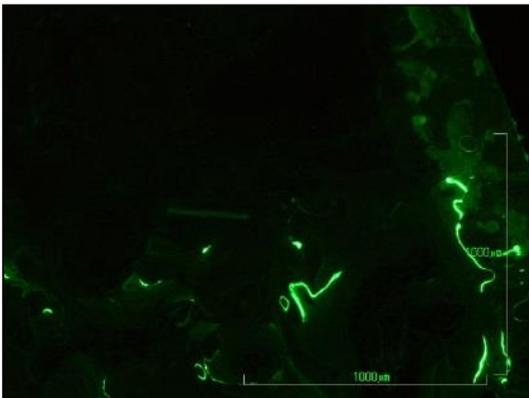


Figura-116-

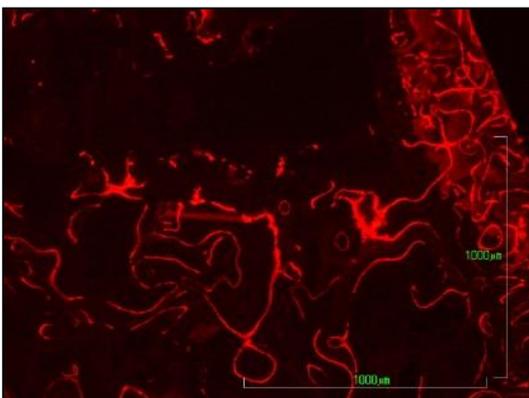


Figura-117-

Figuras-115-, -116- y -117- Grupo IV (hidrogel con ADMSC-C). Semipanorámicas de la lesión en las que se observan los marcajes fluorescentes: tetraciclina 3 días post-intervención (-112-), calceína 4 semanas (-113-) y alizarina 8 semanas (-114-). El marcaje con tetraciclina es difuso debido a la administración de tetraciclina como profilaxis antibiótica a los animales de experimentación. Destaca la intensa incorporación de marcaje al hueso en formación a partir de las 8 semanas post-intervención.



## VII- DISCUSIÓN

---



El tratamiento efectivo de las enfermedades articulares degenerativas como la osteoartritis constituye uno de los principales desafíos del siglo XXI. En la actualidad, las terapias de elección son principalmente el tratamiento farmacológico del dolor y la cirugía de reemplazo en las fases avanzadas de la enfermedad, con la consiguiente carga social y económica en una sociedad cuya esperanza de vida aumenta progresivamente, con un importante sector de la población que envejece pero mantiene altos requerimientos funcionales. Además del envejecimiento, los traumatismos agudos derivados de accidentes o lesiones deportivas provocan frecuentemente lesiones articulares que pueden constituir el comienzo de un proceso degenerativo artrósico en pacientes jóvenes<sup>127</sup>.

Así pues, el desarrollo de estrategias terapéuticas que ayuden a la recuperación de los tejidos lesionados y mitiguen el dolor asociado se ha convertido en una prioridad para los investigadores en el área de la traumatología y la cirugía ortopédica.

La ingeniería tisular se plantea como la herramienta definitiva para conseguir la regeneración de los tejidos dañados. Sin embargo, la osteoartritis es una enfermedad que afecta a todos los tejidos de la articulación sinovial generando un ambiente altamente patológico<sup>25</sup>, por lo que todavía queda un largo camino por recorrer hasta conseguir la recuperación completa de una articulación artrósica<sup>22,25,128</sup>. Por ahora, la reparación de defectos puntuales provocados en el cartílago articular de otra manera sano es el foco en el que se centran los investigadores para el desarrollo de terapias celulares que pretenden generar condrocitos articulares de reemplazo para la producción de tejido cartilaginoso sano reduciendo así el dolor, restaurando la función articular y retrasando la degradación del cartílago y la necesidad de reemplazo de la articulación<sup>4,129</sup>.

El uso de condrocitos articulares expandidos *in vitro* es la técnica de referencia en la reparación de lesiones condrales mediante terapia celular<sup>45,48</sup>. Sin embargo, las MSC superan a éstos en lo que se refiere a disponibilidad y capacidad proliferativa, aunque aún está pendiente determinar las condiciones específicas en las que deben ser manipuladas para la producción de cartílago hialino *in vivo*<sup>115,116</sup>.

El propósito de esta tesis es determinar la idoneidad de las condiciones de aislamiento, cultivo y diferenciación *in vitro* de las ADMSC en matrices tridimensionales de plasma y ácido hialurónico y su capacidad de regenerar lesiones osteocondrales en un modelo animal de conejo, comparando los resultados con los obtenidos con el empleo de condrocitos articulares en las mismas condiciones.

**ETAPA-0- ESTUDIO COMPARATIVO DE DOS FUENTES DE ADMSC EN CONEJO**

La fuente ideal de células para el desarrollo de técnicas de ingeniería tisular aplicadas al cartílago articular debe ser de fácil obtención y expansión *in vitro* y capaz de sintetizar los componentes específicos de la matriz extracelular cartilaginosa, como glicosaminoglicanos y colágeno tipo II<sup>130</sup>. Las fuentes de células más investigadas por su potencial en este sentido son los condrocitos y las células madre mesenquimales<sup>105</sup>.

Los condrocitos articulares son los encargados de producir, mantener y remodelar la matriz extracelular del cartílago articular *in vivo* y son capaces de hacerlo también *in vitro*, por lo que constituyen la fuente celular más obvia a la hora de plantear la reparación del cartílago articular mediante técnicas de ingeniería tisular. Sin embargo, la disponibilidad de condrocitos autólogos es limitada y está supeditada a la escisión de cartílago sano, procedimiento invasivo con potencial morbilidad asociada al sitio donante<sup>38,131</sup>. Además, la expansión en monocapa de condrocitos articulares provoca su desdiferenciación y la consiguiente pérdida de sus propiedades como células generadoras de matriz extracelular cartilaginosa<sup>113,114,132,133</sup>. Sin embargo, esta limitación puede verse reducida mediante la inclusión de las células en matrices tridimensionales para favorecer el mantenimiento de su fenotipo durante la expansión *in vitro*<sup>134</sup> o previamente al implante<sup>135,136</sup>. Aun así, las células aisladas a partir de muestras de cartílago articular en pacientes con osteoartritis muestran una capacidad condrogénica disminuida<sup>137</sup> por lo que los resultados de los trabajos que emplean

condrocitos de animales jóvenes pueden no ser extrapolables al paciente osteoartítico, cuyos condrocitos, de mayor edad, son metabólicamente menos activos *in vitro*<sup>49,138,139</sup>.

Como alternativa al uso de condrocitos articulares, las células madre mesenquimales (MSC) constituyen una población de células indiferenciadas, localizadas en diferentes tejidos, que poseen capacidad de autorenovación y pueden dar lugar a distintos tipos celulares, incluyendo el fenotipo condrocítico<sup>68,69</sup>. Fueron descritas por primera vez como unidades formadoras de colonias a partir de aspirado medular (BMMSC)<sup>67,117</sup>, y diversos estudios han demostrado su potencial condrogénico *in vitro*<sup>140-142</sup> e *in vivo*<sup>79,83,86,89,143</sup>.

A pesar de ser las MSC más estudiadas, las BMMSC presentan diversos inconvenientes a la hora de ser aplicadas en terapias de regeneración osteocondral, principalmente por el bajo número de células con capacidad proliferativa aisladas a partir de un aspirado medular, que además disminuye con la edad<sup>144</sup>, de igual forma que su capacidad proliferativa<sup>145</sup> y su potencial condrogénico<sup>137,146</sup>. Durante los últimos años han sido numerosos los estudios que han demostrado la presencia de MSC en diversos tejidos, siendo el tejido adiposo la alternativa más interesante.

Desde que Zuk en 2001 describiera la presencia de ADMSC en el tejido adiposo<sup>71</sup> éstas células se han convertido en las grandes protagonistas de la investigación con células madre adultas en medicina regenerativa. Las principales ventajas de las ADMSC frente a las BMMSC son la abundancia del tejido adiposo en humanos y la mínima morbilidad del procedimiento de extracción, junto con el elevado número de MSC que pueden obtenerse de él. Además, diversos estudios han demostrado que el número, capacidad proliferativa y potencial condrogénico de estas

células no disminuye con la edad<sup>137,146</sup>, con lo que podrían constituir una fuente de células ventajosa respecto a las BMMSC para el tratamiento de patologías en pacientes de edad avanzada.

En el año 2003 Wickham describió la presencia de ADMSC en el tejido graso infrapatelar o grasa de Hoffa<sup>147</sup>. La resección de la grasa infrapatelar es habitual en el procedimiento de artoplastia de rodilla, con el que los cirujanos ortopédicos están familiarizados, para mejorar la visualización durante la intervención y evitar posteriormente el posible pinzamiento del tejido graso; también puede extraerse de manera segura por vía artroscópica. Aunque no se han estudiado las consecuencias de la resección del depósito de grasa infrapatelar en individuos sanos, es poco probable que empeoren los síntomas o la función en pacientes con lesiones osteocondrales significativas<sup>148</sup>.

Esto ha hecho que en los últimos 10 años diversos grupos de investigadores estén explorando el potencial de las ADMSC derivadas de grasa infrapatelar como fuente de células para la regeneración tisular en patología osteocondral. La mayoría de los trabajos publicados en torno al estudio de las ADMSC derivadas de grasa de Hoffa son estudios *in vitro* con muestras de origen humano<sup>42,137,146-160</sup>, aunque también se han aislado ADMSC a partir de grasa infrapatelar de ratón<sup>161</sup>, cerdo<sup>162-164</sup>, perro<sup>165</sup>, ternero<sup>166</sup>, oveja<sup>159</sup> y conejo<sup>159,167</sup>.

Dado que, en la bibliografía consultada, no se han encontrado estudios concluyentes sobre la fuente más adecuada de ADMSC en conejo, en esta tesis se realizó un estudio previo en el que se trató de comparar el tejido subcutáneo abdominal y la grasa de Hoffa de conejo en términos de rendimiento celular, UFC, proliferación y multipotencialidad.

### **Rendimiento celular**

El rendimiento celular tras la digestión enzimática del tejido graso fue significativamente superior en el caso de la grasa infrapatelar de conejo (275 células/mg) respecto a la grasa abdominal (57 células/mg). Arrigoni y cols.<sup>168</sup> obtuvieron resultados similares con grasa subcutánea de conejo, mientras que Martínez-Lorenzo<sup>159</sup> y Jurgens y cols.<sup>154</sup> muestran rendimientos celulares superiores a los nuestros, y más elevados en el caso de las ADMSC de Hoffa de conejo (700 células/mg) que las de humano (400 células/mg) en lo que se refiere tanto al número de células aisladas así como a su capacidad proliferativa durante los primeros pases.

Bien es cierto que el conteo de ADMSC en la SVF es aproximado debido a la abundante presencia de otros tipos celulares, por lo que no se puede asegurar que todas las células objeto de recuento sean MSC, lo que puede explicar no solo la variabilidad de los rendimientos celulares en los diferentes estudios si no también la utilización de tan diferentes densidades de siembra para asegurar el cultivo primario: en nuestro caso, una densidad de siembra 30.000 células/cm<sup>2</sup> permitió una correcta adherencia y proliferación de las poblaciones celulares aisladas a partir de todas las muestras, sin embargo, en la bibliografía consultada pueden encontrarse densidades de siembra inicial que oscilan entre las 10.000 células/cm<sup>2</sup> en conejo<sup>159</sup> y hasta 100.000 células/cm<sup>2</sup> en algunos estudios con células de origen humano<sup>146,155</sup>.

### **Unidades formadoras de colonias**

En cualquier caso, dada la ausencia de marcadores específicos de ADMSC que permitan un recuento fiable de este tipo celular en las muestras de tejido graso, la frecuencia de las unidades formadoras de

---

colonias obtenidas a partir de una muestra tisular es lo que realmente va a definir la capacidad clonogénica de las poblaciones celulares aisladas. En este sentido los resultados de este estudio demostraron de nuevo la superioridad de la grasa infrapatelar respecto a la de origen abdominal de conejo. A pesar de que no hemos encontrado en la bibliografía consultada datos referentes a la frecuencia de UFC en el cultivo primario, otros investigadores que han trabajado con muestras de origen humano y cultivos en 1P han encontrado también mayor presencia de UFC en la grasa de Hoffa respecto a la grasa subcutánea periarticular<sup>150,151</sup>, mientras que Manfredini y cols.<sup>149</sup> no encontraron diferencias significativas.

### **Proliferación celular**

Una vez en condiciones de cultivo *in vitro*, el patrón proliferativo de las ADMSC derivadas de grasa infrapatelar y abdominal de conejo fue similar en el cultivo primario y los dos primeros subcultivos mostrando una fase de latencia de más larga duración en el caso del cultivo primario, posiblemente debido a la presencia de otros tipos celulares y la adaptación de las células a las condiciones de cultivo *in vitro* sobre superficie plástica. No se han encontrado en la bibliografía consultada estudios comparativos de la proliferación de ADMSC de distintas localizaciones.

### **Multipotencialidad**

Ambas poblaciones de ADMSC se mostraron capaces de dar lugar a células maduras de tipo óseo y adiposo cuando fueron mantenidas bajo condiciones de cultivo inductoras de diferenciación. La calcificación del medio y la acumulación de depósitos lipídicos en el citoplasma celular

pusieron en evidencia una idéntica capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica respectivamente de ambas poblaciones celulares, de manera similar a lo descrito en numerosos estudios con diversos tipos de MSC<sup>68,69,168</sup>.

Mientras que para la diferenciación adipogénica y osteogénica de las ADMSC basta con mantener las células en cultivo en monocapa con los medios de cultivo inductores de diferenciación, en el caso de la diferenciación condrogénica, se hace necesario el empleo de un cultivo en tres dimensiones, ya sea en formato de pellet celular o empleando constructos tridimensionales elaborados a partir de diferentes materiales<sup>169</sup>.

En nuestro caso, para inducir la diferenciación condrogénica de las ADMSC expandidas, empleamos un hidrogel elaborado con plasma sanguíneo y ácido hialurónico (cuya especificación será expuesta en más adelante) en el que fueron incluidas las ADMSC de ambos orígenes (infrapatelar y abdominal) a alta densidad. La adición de factores de demostrada capacidad condrogénica como el TGF- $\beta$ <sup>193,147,166</sup> promovió la adquisición de características típicas condroides por parte de las células en cultivo, esto es, morfología redondeada y síntesis de glicosaminoglicanos. La condrogénesis celular en el hidrogel fue menos evidente que en otros estudios que emplean la técnica de cultivo en pellet<sup>158,148</sup>, pero presenta varias ventajas sobre ésta puesto que proporciona un ambiente más fisiológico para las células, es más fácil mantener en condiciones de cultivo y constituye una herramienta terapéutica más adecuada a la hora de ser aplicada en el ámbito clínico, puesto que se trata de un constructo de fácil manipulación.

Aunque Mochizuki y cols.<sup>160</sup> han encontrado un mayor potencial condrogénico de las células derivadas de grasa infrapatelar humanas *in*

*vitro* respecto a las de origen subcutáneo, en nuestro caso, con muestras grasas de conejo, no encontramos diferencias significativas entre ambas fuentes celulares.

Esta etapa del estudio demostró por tanto que las ADMSC derivadas de grasa de Hoffa muestran patrones proliferativos y multipotencialidad similares a las ADMSC de origen abdominal, pero son superiores en número y capacidad clonogénica por lo que constituyeron la población celular de elección para el desarrollo de las etapas posteriores del estudio.

## ETAPA-1- ESTUDIO *IN VITRO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS

Se analizó en profundidad el comportamiento de las ADMSC derivadas de grasa de Hoffa sometidas o no a diferenciación condrogénica en el interior del hidrogel plasmático, y se comparó con el de condrocitos articulares en términos de distribución celular, proliferación y exhibición de características condroides.

La fibrina es un polímero natural y biocompatible que favorece las interacciones célula-matriz, contiene diversos factores de crecimiento y puede elaborarse a partir de sangre autóloga, evitando así problemas inmunológicos. Por todo ello, la fibrina 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. En estudios previos se ha demostrado *in vitro* la capacidad del gel de fibrina para favorecer la proliferación de los condrocitos en cultivo<sup>110,170,171</sup>. Además, el ambiente tridimensional que proporciona la matriz de fibrina promueve el mantenimiento de la morfología celular y la producción de matriz cartilaginosa.

Por su parte, el ácido hialurónico, como componente mayoritario de la matriz extracelular cartilaginosa que es, constituye un polímero sintético biocompatible directamente implicado en el mantenimiento del fenotipo condrocítico<sup>172</sup>. Este ácido no solo actúa como elemento estructural en el cartílago hialino, sino que también interactúa con proteínas de unión, proteoglicanos y otras moléculas mediante receptores celulares específicos que promueven la migración celular y facilitan la síntesis y remodelado de la matriz extracelular. Además,

---

interacciona con los condrocitos estimulando la producción de colágeno y agreganos<sup>173</sup>.

En nuestro estudio empleamos una matriz elaborada a partir de plasma sanguíneo de conejo y ácido hialurónico al 5%, se activó su coagulación con  $\text{CaCl}_2$  y se estabilizó la estructura con ácido tranexámico. Esta formulación permitió el cultivo *in vitro* tanto de condrocitos articulares como de ADMSC derivadas de grasa de Hoffa sometidas o no a inducción condrogénica.

Los tres tipos de poblaciones celulares estudiados mostraron una morfología redondeada en el interior de las matrices en el momento de su gelificación y, posteriormente fueron emitiendo prolongaciones citoplasmáticas que interactuaban con la red proteica, proliferando y colonizando todo el espacio disponible en el interior de las matrices con mayor presencia en el borde inferior de la estructura, posiblemente debido al efecto de la gravedad durante la polimerización.

La densidad celular en el interior del andamiaje es un factor importante a tener en cuenta en el diseño de sustitutos cartilaginosos. Altas densidades celulares promueven la síntesis de matriz extracelular cartilaginosa por parte de condrocitos articulares y MSC probablemente debido a que las interacciones celulares simulan la condensación de las células condroides durante el desarrollo embrionario<sup>174-176,157</sup>. Una densidad de siembra de  $10^6$  células/ml permitió evaluar el fenómeno de proliferación y diferenciación de las distintas poblaciones celulares en el interior del hidrogel. Las 3 poblaciones celulares mostraron patrones proliferativos similares hasta las 4 semanas de cultivo, pero a las 6 y 8 semanas el número de ADMSC fue significativamente superior al de ADMSC sometidas a inducción condrogénica, que era a su vez similar al número de

condrocitos en los hidrogeles. Este cambio en el patrón proliferativo puede relacionarse con el fenómeno de diferenciación celular, dado que al favorecerse la adquisición del fenotipo condrocítico, la capacidad proliferativa de las células se ve disminuida de acuerdo a lo publicado por Cooper y cols.<sup>177</sup> e Im y cols.<sup>178</sup>.

Lee y cols. encontraron problemas a la hora de mantener el volumen de las matrices de fibrina *in vitro* puesto que éstas tendían a retraerse al cabo de pocos días de cultivo<sup>170</sup>. Al igual que en el estudio de Park y cols.<sup>110</sup> en el que la matriz de fibrina se suplementó con ácido hialurónico, nuestros constructos celulares mantuvieron su forma y volumen un mínimo de 4 semanas, momento en el que comenzaron a mostrar signos de retracción. La presencia de ácido hialurónico y tranexámico en la matriz de fibrina pudo retrasar la retracción de la misma<sup>110</sup>. En todo caso, la viabilidad de las células no se vio comprometida por la retracción de la estructura tridimensional como se detalla a continuación.

Durante las 8 semanas de cultivo *in vitro* pudo observarse la viabilidad celular en el interior del hidrogel mediante microscopía confocal y marcaje fluorescente de células vivas y muertas, incluso en las matrices retraídas. El microscopio confocal, a diferencia del microscopio de fluorescencia convencional, permite enfocar planos de una muestra de manera individual, obviando la señal producida por los planos superiores e inferiores, lo que aumenta notablemente la calidad de la imagen. Cada captura que se realiza con la cámara asociada al microscopio confocal muestra la señal de un solo plano, por lo que es preciso realizar un “barrido” o imágenes seriadas a lo largo del eje Z para poder realizar construcciones tridimensionales. Para poder visualizar las células, se empleó un marcaje fluorescente basado en el empleo de calceína AM y homodímero de etidio como marcadores de

---

células vivas y muertas respectivamente. Las células mantuvieron su viabilidad durante todo el protocolo experimental colonizando la matriz en su totalidad. El marcaje fluorescente permitió intuir cambios en la morfología celular a lo largo del procedimiento que fueron corroborados mediante microscopía electrónica de barrido y tinción hematoxilina-eosina.

La morfología específica condroide así como ciertas particularidades estructurales, como la existencia de lagunas, son algunas de características que se observan en el tejido cartilaginoso nativo y se persiguen en los sustitutos cartilaginosos desarrollados *in vitro* por ser indicativos de adquisición o mantenimiento del fenotipo condrocítico por parte de las células en cultivo. Durante la expansión en monocapa, los condrocitos articulares sufren un reconocido fenómeno de desdiferenciación celular<sup>113,114,132,133</sup> que puede ser revertido mediante el cultivo tridimensional de las células<sup>135,136</sup>. Las matrices de fibrina y ácido hialurónico permitieron la recuperación de la morfología condroide por parte de los condrocitos articulares tras la expansión en monocapa. Mediante microscopía electrónica de barrido pudo observarse la presencia de células de aspecto redondeado y superficie rugosa embebidas en lagunas dentro del entramado fibrilar. La técnica de hematoxilina-eosina confirmó la presencia de células con morfología redondeada en el interior de lagunas dispersas por la matriz tridimensional, pero especialmente en los bordes de la misma.

En el caso de las ADMSC, tanto las imágenes de microscopía electrónica como los cortes histológicos sometidos a tinción hematoxilina-eosina, mostraron la presencia de células con una morfología claramente fibroblástica, con prominentes prolongaciones citoplasmáticas que interactuaban con la red de fibrina llegando incluso a recubrirla totalmente.

Cuando estas células eran sometidas a inducción condrogénica, al cabo de 4-6 semanas tendían a adquirir una morfología redondeada e incluso podían observarse formaciones de tipo laguna en la matriz que las rodeaba al cabo de 6-8 semanas, mostrando claras evidencias de adquisición del típico fenotipo condrocítico. Resultados similares han sido descritos por López-Ruiz y cols. con ADMSC de origen humano expuestas a extractos de condrocitos articulares<sup>42</sup>.

La morfología y disposición de las células en cultivo suelen tomarse como factores indicativos de fenotipo condroide, pero la correcta diferenciación condrogénica de las células se completa con su funcionalidad, esto es, su capacidad para producir matriz extracelular cartilaginosa, principalmente GAG y colágeno tipo II, características que pueden ser evidenciadas mediante tinción azul Alcían y detección inmunohistoquímica respectivamente<sup>69</sup>.

El colorante azul Alcían se une a los grupos ácidos de los mucopolisacáridos dando lugar a la formación de un compuesto salino de color azul cuando el nivel de pH es suficientemente bajo. Por tanto, esta tinción permite valorar el fenotipo condrocítico de las células en base a la presencia de glicosaminoglicanos en la matriz, que son marcadores de la diferenciación celular hacia células de estirpe condroide.

A su vez, la detección inmunohistoquímica de colágeno tipo II permite valorar la calidad de la matriz extracelular sintetizada por las células, asignándole características de cartílago hialino y distinguiéndola del tejido fibroso de reparación típicamente formado por las células fibroblásticas.

Los constructos conteniendo condrocitos articulares mostraron una importante tinción con azul Alcían y presencia de colágeno tipo II a las

2 semanas de cultivo, que se volvió muy intensa a partir de las 4 semanas y se mantuvo durante todo el experimento, demostrando una re-diferenciación efectiva de los condrocitos tras su inclusión en el hidrogel tridimensional.

En el caso de las ADMSC no se observó coloración alguna de la matriz con la técnica azul Alcian ni tampoco presencia de colágeno tipo II durante las 8 semanas de cultivo *in vitro*. Sin embargo, las ADMSC sometidas a inducción condrogénica comenzaron a sintetizar colágeno tipo II y acumularlo en la matriz tridimensional a las 4-6 semanas y ese colágeno se mantuvo asociado a la matriz hasta las 8 semanas de cultivo. En cuanto a la síntesis de GAG, mostraron una leve tinción con azul Alcian a las 6 y 8 semanas en la periferia de las células en cultivo. Los resultados indican que la grasa infrapatelar constituye una fuente de células madre mesenquimales con capacidad de diferenciarse hacia células de tipo condroide de forma similar a las derivadas de la médula ósea o el tejido adiposo subcutáneo<sup>151,161</sup>.

Así pues, el empleo de fibrina plasmática y ácido hialurónico permitió la re-diferenciación de los condrocitos expandidos en monocapa y la diferenciación de las ADMSC cuando éstas eran cultivadas con medio de inducción condrogénico. Por el contrario, Solchaga y cols.<sup>124</sup> obtuvieron resultados desfavorables a la hora de promover la diferenciación condrogénica de MSC en hidrogeles de fibrina, recomendando el uso de otros materiales como la agarosa. Según estudios recientes la clave podría estar en el papel del ácido hialurónico, que promueve la condrogénesis de las MSC a través del receptor CD44 que está presente tanto en los condrocitos articulares como en el 99,9%<sup>173</sup> de las ADMSC y activa la expresión de diversos grupos de genes que inician la síntesis de GAG y colágeno tipo II en las células<sup>179,180</sup>. Estos estudios se han realizado con ADMSC de origen humano, pero se ha observado un

comportamiento similar en las BMMSC de conejo, que incrementan la síntesis de GAG y colágeno tipo II en matrices de fibrina y ácido hialurónico superando incluso los valores obtenidos con geles de agarosa<sup>181</sup>.

Un factor a tener en cuenta y que no se ha incluido en este estudio es el papel de la carga mecánica a la hora de favorecer la expresión del fenotipo condroide. Son varios los estudios que indican que la diferenciación condrogénica de las células mejora cuando son sometidas a estímulos mecánicos *in vitro*, aunque todavía no está claramente definida la metodología ideal para hacer esto (centrifugación<sup>148</sup>, presión hidrostática<sup>163</sup>, ultrasonidos<sup>181</sup> ...).

**ETAPA-2- ESTUDIO *IN VIVO* DE LOS SUSTITUTOS CARTILAGINOSOS.****EL MODELO EXPERIMENTAL**

Para comprobar la utilidad de los sustitutos cartilagosos diseñados *in vitro*, éstos fueron implantados en lesiones osteocondrales practicadas en los cóndilos femorales de conejos adultos de raza Nueva Zelanda.

**El animal de experimentación**

Teniendo en cuenta que ningún modelo animal reproduce fielmente la patología osteocondral humana, el conejo representa una alternativa asequible apta para las primeras fases de estudio *in vivo* de nuevos tratamientos. Sin embargo, es necesario ser conscientes de que este modelo experimental presenta diversas limitaciones:

- La articulación femoro-tibial del conejo es mucho más pequeña que la humana, con un cartílago más fino, lo que no permite crear defectos de dimensiones comparables a las lesiones en humanos<sup>182</sup>.
- La rodilla del conejo frecuentemente muestra una flexión extrema, lo que hace que la rótula esté sometida a carga parcial, alterando la distribución de cargas que se da en la rodilla humana<sup>183</sup>.
- El empleo de animales genéticamente similares permite obtener resultados comparables, aptos para su análisis, pero no reproduce la variabilidad de la respuesta fisiológica que tiene lugar en los pacientes clínicos.

Siendo conscientes de sus limitaciones, se ha elegido el conejo como animal de experimentación por los siguientes motivos:

- Por su similitud con el modelo humano. Aunque la biomecánica de la articulación del conejo difiere de la humana, presenta semejanzas en cuanto a su composición, estructura y crecimiento<sup>184</sup>, además de mostrar signos de deterioro progresivo tras una lesión<sup>185</sup>.
- Por su accesibilidad. A pesar de su pequeño tamaño, las proporciones de la rodilla del animal son suficientes para poder realizar la cirugía sin riesgos considerables, con un fácil acceso quirúrgico a la articulación.
- Por tratarse de un modelo experimental ampliamente utilizado y documentado en la literatura, en la que pueden encontrarse numerosos trabajos publicados sobre regeneración de lesiones osteocondrales en este animal, lo que permite establecer paralelismos y comparaciones con nuestro estudio.
- Por la disponibilidad de tejido adiposo abdominal e infrapatelar para la obtención de biopsias grasas a partir de las cuales aislar ADMSC.
- Además, el coste del animal respecto a otros animales de experimentación es reducido, así como su tamaño, lo que simplifica su estabulación por el espacio relativamente pequeño que requiere y menores costes para su mantenimiento. Así mismo, se trata de un animal dócil, lo que facilita su manejo durante las diferentes fases del estudio experimental.

### La lesión y el implante

Para evaluar la capacidad regenerativa de los implantes se realizaron lesiones osteocondrales bilaterales de tamaño supercrítico en los cóndilos femorales de los animales de experimentación. En ellas, se implantaron los constructos biológicos de origen alogénico.

La rodilla es la localización más frecuentemente empleada para el estudio de la reparación osteocondral porque es la articulación diartrodial que más carga soporta y que por tanto, más expuesta se ve a estrés mecánico, lo que puede desencadenar el proceso degenerativo articular. La creación de defectos osteocondrales en la zona posterior de carga de la superficie articular del cóndilo femoral, constituye un contrastado modelo apto para el estudio de nuevas estrategias terapéuticas que persigan promover la regeneración del cartílago articular, puesto que presenta similitud anatómica con el modelo humano, un tamaño adecuado, fácil accesibilidad quirúrgica y está sometido a considerables fuerzas de carga.

Varios estudios han demostrado que lesiones osteocondrales de 4 mm de diámetro y 3 mm de profundidad no regeneran espontáneamente en el conejo<sup>186-188</sup>, de manera que este modelo permite analizar y comparar el efecto reparador de los diversos tratamientos aplicados excluyendo la posible influencia beneficiosa que la realización de una lesión de pequeño tamaño podría tener en su reparación espontánea<sup>107,189</sup>.

Para poder analizar un número significativo de casos por tratamiento aplicado (n=10), se realizaron un total de 40 lesiones en 10 animales de experimentación. Al realizar lesiones bilaterales en ambos cóndilos femorales (medial y lateral), pudo obtenerse un número significativo de casos minimizando el número de animales empleados. Además, al

utilizar material biológico de origen alogénico, se minimizó el número de cirugías al que se sometió a los animales de experimentación, reduciendo así las complicaciones asociadas y sin apreciar signos de rechazo inmunológico.

Aunque son muchos los investigadores que emplean material de implante de origen alogénico<sup>111,187,190</sup>, la mayoría de los estudios en conejo realizan lesiones osteocondrales únicamente en el cóndilo femoral medial<sup>172,186,190,191</sup>, trasladando directamente al modelo animal la distribución de cargas que tiene lugar en la articulación humana, donde el cóndilo femoral medial absorbe el 60% de la carga articular y es por tanto más propenso a sufrir procesos traumáticos o degenerativos.

Sin embargo, como ya se ha mencionado anteriormente, la biomecánica de la rodilla del conejo no es exactamente igual a la humana. La distribución de cargas en la rodilla de los cuadrúpedos en general y del conejo en particular difiere del modelo humano hasta el punto que diversos estudios han demostrado una distribución de cargas balanceada en los cóndilos femorales<sup>192,193</sup>, e incluso aumentada en un 2% en el cóndilo lateral respecto al medial<sup>194</sup>.

Por lo tanto no parece existir justificación documentada para la creación de lesiones osteocondrales únicamente en el cóndilo femoral medial, siendo posible reducir el número de animales empleados creando lesiones experimentales en ambos cóndilos femorales. En nuestro estudio no observamos diferencias en este sentido, aunque sería necesario un análisis exhaustivo de los datos obtenidos para poder descartarlas definitivamente.

---

## REPARACIÓN DE LAS LESIONES OSTEOCONDRALES

---

Las lesiones osteocondrales, que atraviesan la *tide mark* penetrando en el hueso subcondral subyacente, muestran un proceso de reparación espontánea que difiere del proceso regenerativo que se persigue con el empleo de técnicas de ingeniería tisular. El acceso a la vascularización subcondral hace que el defecto se rellene de sangre y se forme un coágulo de fibrina que activa la movilización, proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales de la médula ósea. Estas células se diferencian hacia condrocitos pero rápidamente la matriz cartilaginosa degenera formándose un tejido fibro-vascular de reparación que poco o nada tiene que ver con el cartílago hialino articular, tanto en su composición y estructura como en sus propiedades biomecánicas<sup>3</sup>. El implante de los constructos empleados en este estudio pretendió desviar la acción reparadora fisiológica hacia un proceso regenerativo que restituyese la estructura y función articular normales.

### Grupo I: hidrogel acelular

Al contrario de lo que se ha descrito con el empleo de pegamentos fibrina comerciales, que permanecen acelulares tras su colocación en la lesión osteocondral<sup>195</sup>, el implante del hidrogel acelular de plasma y ácido hialurónico empleado en nuestro estudio fue invadido por células provenientes de la médula ósea, que produjeron un tejido blanquecino, de aspecto opaco e irregular que en el 50% de los casos no consiguió recuperar la fisionomía de la superficie articular y en el resto lo hizo de manera incompleta.

A nivel microscópico, el tejido de relleno correspondió a un tejido de tipo conectivo, más o menos laxo y solo en uno de los casos se observó algún foco de tejido condroide hiper celular. Resultados similares

obtuvieron Park y cols. al emplear matrices de fibrina y ácido hialurónico para la regeneración de lesiones en el canal troclear de conejos adultos<sup>171</sup>.

Para mejorar la consistencia y el efecto condrogénico sobre las MSC provenientes de la médula ósea, algunos autores han optado por combinar la fibrina y el ácido hialurónico con otras sustancias como la gelatina o el colágeno, aunque los resultados de los estudios *in vivo* muestran efectos dispares: Hay-Reem y cols. encontraron un mayor efecto condrogénico al emplear hidrogeles de plasma rico en plaquetas con gelatina, pero con sobrecrecimiento del tejido cuando era implantado en lesiones osteocondrales creadas en el canal troclear de conejos adultos<sup>171</sup>, mientras que Filová y cols. combinaron fibrina, ácido hialurónico y colágeno tipo I obteniendo un tejido de relleno fibrocartilaginoso en las lesiones experimentales<sup>196</sup>.

Así pues, los resultados del presente estudio demuestran la biocompatibilidad del andamiaje empleado, pero el proceso reparativo que se observa recuerda al que tiene lugar en las lesiones no sometidas a tratamiento descritas por numerosos autores<sup>186</sup>, por lo que puede considerarse el grupo control del protocolo experimental aplicado.

### **Grupo II: hidrogel con condrocitos articulares**

La introducción de condrocitos articulares en el hidrogel plasmático produjo una mejora considerable en los resultados, observándose signos de regeneración condral que lograron recuperar la superficie articular y rellenar la lesión con un tejido blanquecino macroscópicamente similar al cartílago sano adyacente en la mitad de los casos estudiados, siendo este tejido de relleno de aspecto opaco en la otra mitad.

---

El análisis histológico reveló que el tejido de relleno de la fracción condral del defecto correspondía en todos los casos a un tejido cartilaginoso de tipo hialino en el que se observaron células condrocíticas dispersas, en grupos o clusters, e incluso en disposición columnar. Aunque la presencia de condronas hipertróficas es un signo degenerativo en el cartílago sano, en el caso del tejido lesionado se interpreta como un fenómeno positivo puesto que la proliferación condrocítica es la base de la formación del neocartílago<sup>3</sup>.

El constructo celular mostró una perfecta integración con el cartílago sano adyacente. Algunos estudios con polímeros sintéticos como el ácido poliglicólico (PGA) muestran buenos resultados en lo que se refiere a la formación de cartílago hialino en la lesión, pero dificultades a la hora de integrarse con el tejido sano, apareciendo fisuras y discontinuidad física entre el implante y el tejido adyacente<sup>197</sup>. Sin embargo cuando ese mismo material es combinado con fibrinógeno la integración del implante en la lesión es completa<sup>196</sup>, al igual que en nuestro estudio. Así pues, la inclusión de fibrina en la composición de la matriz parece favorecer la integración del implante, convirtiéndola en un elemento muy beneficioso en el diseño de andamiajes para ingeniería tisular.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros grupos que han empleado condrocitos autólogos o heterólogos embebidos en matrices de fibrina, ácido hialurónico o combinaciones de ambos elementos para la regeneración de lesiones osteocondrales<sup>172,111,196</sup>. Estos grupos sin embargo, localizan las lesiones en el canal troclear, sometido a menor carga, y emplean fibrinógeno comercial para la elaboración de la matriz tridimensional. Así pues, nuestro estudio demuestra que pueden obtenerse resultados regeneradores similares en zona de carga, como es la región medial de los cóndilos femorales, y empleando

matrices plasmáticas que pueden ser elaboradas a partir de fibrina autóloga.

A pesar de los prometedores resultados histológicos, no se consiguió la recuperación completa de la lesión, por lo que sería conveniente introducir mejoras en la técnica y comprobar la evolución de las lesiones a largo plazo. Algunos autores apuntan a la introducción de factores de crecimiento que promuevan la óptima formación de tejido cartilaginoso. En este sentido, el enriquecimiento en plaquetas de la fracción plasmática de la matriz podría constituir una fuente de factores de crecimiento promotores de la proliferación celular, aunque su papel en la condrogénesis no está del todo claro. Toggharaie y cols. obtuvieron resultados perjudiciales en este sentido con la formación de tejido de tipo conectivo cuando emplearon PRP en combinación con condrocitos articulares en lesiones condrales del surco intercondíleo femoral en conejos<sup>171</sup>. Otra posibilidad es la transfección de los condrocitos para que sinteticen factores que promuevan la condrogénesis *in vivo* como las proteínas morfogenéticas de hueso BMP-2 o BMP-7. Se necesita profundizar en el estudio del papel de estos factores puesto que se han descrito resultados dispares que van desde la ausencia de mejora en la evolución de la lesión respecto al uso de condrocitos no transfectados<sup>198</sup>, hasta la formación de hueso ectópico<sup>199</sup>.

### **Grupo III: hidrogel con ADMSC**

La aplicación de ADMSC no sometidas a diferenciación condrogénica en combinación con distintos andamiajes ha sido investigada para el tratamiento de lesiones osteocondrales en conejo dando lugar a resultados dispares.

Varios autores describen formación de tejido condroide en las lesiones tratadas con ADMSC indiferenciadas<sup>95,97,200,201</sup>, lo que implica una diferenciación de las células *in situ*<sup>94</sup>. Oliveira y cols. llegaron incluso a obtener mejores resultados que con el empleo de condrocitos articulares como componente celular<sup>98</sup>, aunque Nathan describió la degeneración a largo plazo de la superficie articular que mostraba signos de regeneración a las 12 semanas de estudio<sup>99</sup>. Otros, como Koga y cols. reseñan resultados poco favorables, concluyendo que mientras las BMMSC muestran potencial condrogénico *in vivo*, las ADMSC no lo hacen, siendo estas últimas poco recomendables para el tratamiento de patologías condrales<sup>202</sup>.

Del mismo modo, en nuestro estudio obtuvimos resultados heterogéneos, pero predominantemente de tipo reparador, encontrando signos de regeneración en tan solo 2 de los casos estudiados (25%). En el 75% de los casos la superficie articular no se encontró conservada y la lesión estaba rellena de un tejido blanquecino opaco que histológicamente correspondió con tejido conectivo vascularizado y recubierto de una capa superficial que recordaba a la membrana sinovial. En los dos casos en los que macroscópicamente la lesión estaba rellena de un tejido blanquecino pero brillante y consistente, similar al cartílago sano adyacente, microscópicamente hallamos una matriz fibrilar con algunos focos de tejido condroide y condronas hipertróficas pero siempre recubiertos de una capa fibrosa superficial.

En este grupo experimental pudieron observarse células gigantes multinucleadas asociadas a la presencia de espículas óseas residuales. A pesar de que en todos los grupos se encontraron restos del tejido óseo implantado en el hueso subcondral, como se explicará más adelante, solo en este grupo aparecieron células gigantes multinucleadas.

Igualmente, Im y cols. encontraron células gigantes multinucleadas en el tejido de reparación de lesiones osteocondrales en conejo tratadas con ADMSC embebidas en matrices de PCL<sup>203</sup>. No pudiendo identificar claramente el significado de la presencia de este tipo celular únicamente en las lesiones tratadas con ADMSC no diferenciadas, tanto en el trabajo de Im como en nuestro estudio la reacción inmune queda descartada puesto que no se observa infiltración linfocitaria. La ausencia de tejido condroide en las zonas donde hay células gigantes de cuerpo extraño junto con la presencia de vasos sanguíneos indica que estas características generan un ambiente hostil para la formación de cartílago hialino.

En empleo de ADMSC no diferenciadas es por tanto controvertido en la regeneración de lesiones osteocondrales, sin embargo parece tener un efecto condroprotector evidenciado en procesos osteoartrosicos. El proyecto “ADIPOA”, desarrollado en Francia y financiado por la Unión Europea, trata de comprobar la seguridad y eficacia de la aplicación intra-articular de ADMSC en pacientes con osteoartritis. Se han obtenido resultados prometedores en la primera fase del estudio, en la que se ha comprobado que la aplicación de ADMSC de origen subcutáneo o infrapatelar, mediante uso autólogo o alogénico, inhibe la inflamación sinovial, la formación de entesófitos y la degradación del cartílago en modelos animales de osteoartrosis<sup>101-103,167</sup>. Actualmente hay en marcha un ensayo clínico en fase I para evaluar la seguridad y eficacia de la aplicación de ADMSC mediante inyección intra-articular en pacientes con osteoartrosis moderada o severa.

A la vista de nuestros resultados y los de otros grupos, parece que las ADMSC indiferenciadas presentan limitaciones a la hora para el tratamiento de lesiones osteocondrales. Pero no podemos descartar su

utilidad, siendo necesario llevar a cabo estudios complementarios que validen los resultados obtenidos, incluyendo estudios a largo plazo.

#### **Grupo IV: hidrogel con ADMSC diferenciadas condrogénicamente**

La diferenciación condrogénica de las ADMSC *in vitro* previamente a su aplicación en lesiones osteocondrales mejoró la respuesta regenerativa del implante. A nivel macroscópico se recuperó la superficie articular y la lesión se rellenó de un tejido blanquecino de aspecto similar al cartílago sano adyacente en el 50% de los casos, mientras que en el otro 50% tenía una apariencia opaca, menos lustrosa.

Microscópicamente pudo apreciarse una buena integración del tejido neoformado con el cartílago sano adyacente, de manera similar a lo publicado por Dragoo y cols. que emplearon fibrina autóloga y ADMSC para el tratamiento de lesiones osteocondrales en cóndilo femoral de conejo<sup>75</sup>. De nuevo, parece que la fibrina favorece esta integración puesto que tanto nuestro estudio como el de Dragoo y cols. mostraron mejores resultados en este sentido que aquellos que emplearon polímeros sintéticos como la poli-caprolactona<sup>203</sup>, y cuando la fibrina fue utilizada junto con éstos mejoró su integración<sup>96</sup>.

El estudio histológico evidenció la presencia de un tejido condroide atípico en el que se observaban células de aspecto condrocítico dispersas en una matriz fibrilar que en ocasiones se disponían en parejas e incluso llegaban a formar pequeñas hileras. Resultados similares han sido obtenidos por otros grupos investigadores que han encontrado un tejido de tipo condroide ligeramente distinto al del cartílago articular nativo tras tratar lesiones osteocondrales en el canal femoral troclear de conejos con ADMSC diferenciadas condrogénicamente y embebidas en diferentes tipos de andamiajes<sup>98,100,178</sup>.

Así pues, la regeneración tisular alcanzada con el empleo de ADMSC diferenciadas condrogénicamente no fue completa. Sería recomendable realizar estudios a más largo plazo para comprobar la evolución de la lesión. Algunos estudios, como los de Cui y cols., que emplearon ADMSC diferenciadas condrogénicamente junto con matrices de PLA-PGA en un modelo porcino de lesión osteocondral, muestran que el tejido de naturaleza fibrosa presente en la lesión desaparece a las 24 semanas, sustituyéndose por un tejido claramente hialino con una disposición zonal adecuada de las células condroides<sup>118</sup>, que llega incluso a superar a la regeneración alcanzada con el empleo de condrocitos articulares<sup>98</sup>.

Junto con la evolución a largo plazo, la optimización de la diferenciación condrogénica *in vitro* previamente al implante del constructo es también un objetivo deseable. Mientras que en nuestro estudio el empleo de ADMSC diferenciadas condrogénicamente en el hidrogel plasmático promovió la formación de tejido cartilaginoso atípico, en el estudio realizado por Dragoo y cols.<sup>75</sup> con ADMSC diferenciadas condrogénicamente mediante la técnica de cultivo en micromasa antes de su inclusión en matrices de fibrina a muy alta densidad ( $4,5 \times 10^6$  células/300  $\mu$ l), se tradujo en la formación de cartílago hialino en un 92% de las lesiones osteocondrales tratadas. Sin embargo, el tiempo de estudio fue de solo 8 semanas y no tuvo lugar una correcta restitución de la *tidemark*, lo que podría provocar degeneración del injerto a largo plazo.

Una variable que sería recomendable definir es la densidad celular del implante condral. En nuestro caso empleamos  $10^6$  células/ml para la construcción de las matrices *in vitro*, que en el momento del implante, 3 semanas después, podrían estimarse en  $1,5 \times 10^6$  células/ml que promovieron la formación de un tejido de adecuado nivel de

celularidad en la lesión. A pesar de que existe un importante consenso sobre la necesidad de utilizar altas densidades celulares para la regeneración condral, cuando comparamos los estudios disponibles *in vivo*, encontramos una alta variabilidad que va desde la aplicación de  $1 \times 10^6$  a  $15 \times 10^6$  células en las lesiones. Aunque podría pensarse que los resultados de aplicar un mayor número de células pueden estar asociados a una mejor producción de fenotipo celular y matriz condroide, sería necesario establecer el número ideal de células a aplicar por unidad de volumen de tejido tratado.

### **Reconstrucción del lecho óseo**

Con objeto de hacer también un seguimiento del proceso reparador en el lecho óseo de la lesión, se realizó un estudio de la dinámica ósea mediante marcaje con fluorocromos. Los fluorocromos empleados para evaluar el proceso de remodelado óseo son sustancias que tienen afinidad por el calcio, de manera que son incorporadas al frente de mineralización del hueso neoformado, y pueden ser posteriormente visualizadas en preparaciones histológicas por su fluorescencia mediante excitación con luz ultravioleta o luz azul.

En nuestro estudio, la formación del cartílago articular estuvo supeditada a una correcta disposición del hueso subcondral. Algunos investigadores, como Oda y cols.<sup>187</sup> y Cheuk y cols.<sup>190</sup>, aplican directamente el sustituto condral sobre la base del defecto osteocondral, en contacto con el hueso esponjoso subarticular. Esto conduce a la formación de tejido condroide en todo el volumen de la lesión, no respetando la disposición hueso-cartílago de la región articular y alterando enormemente sus propiedades biomecánicas<sup>190,187</sup>. Drago y cols.<sup>75</sup> rellenan la fracción ósea del defecto con pegamento de

fibrina para minimizar el acceso de las células sanguíneas a la fracción condral, esto facilita la generación de cartílago hialino en la superficie articular y posibilita la recuperación del hueso subcondral, pero dificulta la correcta formación de una *tidemark* que impida la degeneración del tejido a largo plazo.

La reconstrucción del lecho óseo es por tanto imprescindible para mantener la congruencia estructural del tejido osteocondral. Según los resultados de nuestro estudio, el empleo de aloinjerto óseo puede proporcionar cierto soporte estructural durante las primeras fases de recuperación y, tal y como revela el seguimiento de formación ósea con fluorocromos, es rápidamente sustituido por tejido óseo neoformado que es sometido a procesos de remodelación más intensos a partir de la octava semana.

## VIII- CONCLUSIONES

---



**CONCLUSIONES**

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos establecer las siguientes conclusiones:

- 1- La grasa infrapatelar constituye un depósito graso fácilmente accesible a partir del cual puede obtenerse un gran número de células madre mesenquimales con capacidad proliferativa y multipotencialidad similares a las ADMSC derivadas de tejido subcutáneo.
- 2- Los hidrogeles elaborados a partir de plasma sanguíneo y ácido hialurónico permiten la re-diferenciación de los condrocitos articulares expandidos en monocapa así como la adquisición de características condroides por parte de las ADMSC *in vitro*.
- 3- Lesiones osteocondrales de 4x3 mm en la zona de carga de los cóndilos femorales de conejos adultos permiten establecer diferencias a corto plazo entre distintos tratamientos celulares. Se necesitan tiempos de evolución superiores a 12 semanas para comprobar la efectividad final de los mismos.
- 4- La regeneración de la lesión condral está supeditada al correcto restablecimiento de la arquitectura del hueso subcondral. La aplicación de aloinjerto óseo triturado es adecuada para este fin, aunque debe garantizarse su fijación en la parte ósea de la lesión osteocondral, evitando la presencia de espículas óseas residuales en la fracción condral del defecto.

- 5- La aplicación de condrocitos articulares embebidos en la matriz plasmática empleada en este estudio promueve la formación de cartílago hialino *in vivo*. Se necesitan tiempos de estudio superiores a 12 semanas para comprobar si finalmente el constructo es capaz de provocar la regeneración completa de las lesiones osteocondrales.
  
- 6- Las ADMSC deben ser diferenciadas condrogénicamente previamente a su aplicación en lesiones osteocondrales. Aun así, el tejido que producen *in vivo* es un tejido cartilaginoso atípico.

## IX- BIBLIOGRAFÍA

---



**BIBLIOGRAFÍA**

1. Littrell TA. CHAPTER 6 Normal Anatomy. Third Edit. Clinical Imaging. Elsevier Inc.; 2014.
2. An YH, Martin KL. Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage. New Jersey: Humana Press; 2003.
3. Frenkel SR, Di Cesare PE. Degradation and repair of articular cartilage. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 1999 Oct 15;4:D671–85.
4. Khan IM, Gilbert SJ, Singhrao SK, Duance VC, Archer CW. Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair. A review. *European cells & materials*. 2008 Jan;16(0):26–39.
5. Alford JW. Cartilage Restoration, Part 1: Basic Science, Historical Perspective, Patient Evaluation, and Treatment Options. *American Journal of Sports Medicine*. 2005 Feb 1;33(2):295–306.
6. Lefebvre V, Bhattaram P. Vertebrate skeletogenesis. *Current topics in developmental biology*. 2010 Jan;90(10):291–317.
7. Hunziker EB, Lippuner K, Shintani N. How best to preserve and reveal the structural intricacies of cartilaginous tissue. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. Elsevier B.V.; 2014 Oct;39C:33–43.
8. Guilak F, Mow VC. The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *Journal of biomechanics*. 2000 Dec;33(12):1663–73.
9. Mayan MD, Carpintero-Fernandez P, Gago-Fuentes R, Fernandez-Puente P, Filgueira-Fernandez P, Goyanes N, et al. Articular chondrocytes are physically connected through a cellular network that is responsible of the metabolic coupling between chondrocytes located in different layers of the tissue. *Osteoarthritis and Cartilage*. Elsevier Ltd; 2013 Apr;21(2013):518–9.
10. Mow VC, Ratcliffe A, Robin Poole A. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*. 1992 Jan;13(2):67–97.

11. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo S a. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*. 2009 Nov;1(6):461–8.
12. Buckwalter JA, Martin J. Degenerative joint disease. *Clinical symposia (Summit, NJ : 1957)*. 1995 Jan;47(2):1–32.
13. Pan J, Zhou X, Li W, Novotny JE, Doty SB, Wang L. In situ measurement of transport between subchondral bone and articular cartilage. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009 Oct;27(10):1347–52.
14. Malinin T, Ouellette EA. Articular cartilage nutrition is mediated by subchondral bone: a long-term autograft study in baboons. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2000 Nov;8(6):483–91.
15. Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, Mccomb DW. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *PNAS*. 2012;109(35):14170–5.
16. Xiao Z, Camalier CE, Nagashima K, Chan KC, Lucas D a, de la Cruz MJ, et al. Analysis of the Extracellular Matrix Vesicle Proteome in Mineralizing Osteoblasts. *Journal of cellular physiology*. 2007 Feb;335(May 2006):325–35.
17. Hernández-gil IF, Angel M, Gracia A, Pingarrón C, Carlos J, Hernández-gil DIF. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I . *Histología y fisiología del tejido óseo. Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006;11(E):47–51.
18. Hambli R. Connecting mechanics and bone cell activities in the bone remodeling process: an integrated finite element modeling. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 2014 Jan;2(April):6.
19. Gunson DKEGAV. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. 2013.
20. Eynard A, Valentich M, Rovasio R. *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. Editorial Médica Panamericana; 2008.
21. Ulrich W. Sobotta - Histología - Ulrich Welsch - Google Books. 2ª Edición. Ed. Médica Panamericana; 2008.
22. Bobinac D, Spanjol J, Zoricic S, Maric I. Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in

- 
- osteoarthritic knee joints in humans. *Bone*. 2003 Mar;32(3):284–90.
23. Quintero, Maritza ; Monfort, Jordi ;Mitrovi DR. Osteoartrosis: biología, fisiopatología, clínica y tratamiento. Editorial Médica Panamericana; 2010.
24. Milz S, Eckstein F, Putz R. The thickness of the subchondral plate and its correlation with the thickness of the uncalcified articular cartilage in the human patella. *Anatomy and embryology*. 1995 Nov;192(5):437–44.
25. López-armada MJ, Carames B, Cillero-pastor B, García FJB. Fisiopatología de la artrosis: ¿cuál es la actualidad? *Rev Esp Reumatol*. 2004;31(6):379–93.
26. Iqbal K, Khan Y, Minhas LA. Effects of immobilization on thickness of superficial zone of articular cartilage of patella in rats. *Indian journal of orthopaedics*. 2012 Jul;46(4):391–4.
27. Stella N, Parra L, Alexander D, Alvarado G, Vanegas C, Iii A. Acercamiento a la mecanobiología del cartílago articular a través de un modelo computacional Approach to mechanobiology of articular cartilage through a computation model. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*. 2010;29(1):79–104.
28. Madry H, Grün UW, Knutsen G. Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Deutsches Ärzteblatt international*. 2011 Oct;108(40):669–77.
29. Poley González a., Ortega Blanco J a., Pedregal González M, Martín Azofra M, Hermosilla Camacho C, Mora Moreno F. Prevalencia de enfermedades osteoarticulares y consumo de recursos. Calidad de vida y dependencia en pacientes con artrosis. *SEMERGEN - Medicina de Familia*. 2011 Nov;37(9):462–7.
30. Battle-Gualda E, Carmona L, Gavrila D, García Criado EI, Ruiz Miravalles R, Carbonell Abelló J. ArtRoCad: health resources utilization and socioeconomic impact of knee and hip osteoarthritis. I. Methods and population characteristics. *Reumatología clínica*. 2006 Sep;2(5):224–34.
31. Giannini S, Buda R, Cavallo M, Ruffilli A, Cenacchi A, Cavallo C, et al. Cartilage repair evolution in post-traumatic osteochondral lesions of the talus: from open field autologous chondrocyte to bone-marrow-derived cells transplantation. *Injury*. 2010 Nov;41(11):1196–203.

32. Hauselmann HJ, Jakob RP, Levine D. ICRS Cartilage Injury Evaluation Package. 2000;
33. Farr J, Cole B, Dhawan A. Clinical cartilage restoration: evolution and overview. *Clinical Orthopaedics and ...*. Springer New York (233 Springer Street, New York NY 10013-1578, United States); 2011 Oct;469(10):2696–705.
34. Exploring the Potential of Cartilage Tissue Engineering to Restore Joint Damage [Internet]. *OrthopaedicsOne Articles*. In: *OrthopaedicsOne - The Orthopaedic Knowledge Network*. 2011 [cited 2014 Jan 22]. Available from: <http://www.orthopaedicsone.com/x/agO-Aw>.
35. Álvarez, E. Ripoll, P. Restrepo, A. Forriol F. Revisión de la Reparación del Cartílago. Posibilidades y resultados. *Trauma Fund MAPFRE*. 2010;21(2):117–34.
36. Cole B, Pascual-Garrido C, Grumet R. Surgical management of articular cartilage defects in the knee. *The Journal of Bone & Joint ...*. 2009;91(7):1778–90.
37. Treme G, Milller MD. Autograft Osteochondral Transfer. *Operative Techniques in Sports Medicine*. Elsevier Inc.; 2008 Apr;16(2):81–8.
38. Matricali GA, Dereymaeker GPE, Luyten FP. Donor site morbidity after articular cartilage repair procedures: a review. *Acta orthopaedica Belgica*. 2010 Oct;76(5):669–74.
39. Falah M, Nierenberg G, Soudry M, Hayden M, Volpin G. Treatment of articular cartilage lesions of the knee. *International orthopaedics*. 2010 Jun;34(5):621–30.
40. Giorgini a, Donati D, Cevolani L, Frisoni T, Zambianchi F, Catani F. Fresh osteochondral allograft is a suitable alternative for wide cartilage defect in the knee. *Injury*. Elsevier Ltd; 2013 Jan;44 Suppl 1:S16–20.
41. Vannini F, Filardo G, Kon E, Roffi A, Marcacci M, Giannini S. Scaffolds for cartilage repair of the ankle joint: The impact on surgical practice. *Foot and ankle surgery : official journal of the European Society of Foot and Ankle Surgeons*. European Foot and Ankle Society; 2013 Mar;19(1):2–8.
42. López-Ruiz E, Perán M, Cobo-Molinos J, Jiménez G, Picón M, Bustamante M, et al. Chondrocytes extract from patients with osteoarthritis induces chondrogenesis in infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS*,

- 
- Osteoarthritis Research Society. Elsevier Ltd; 2013 Jan;21(1):246–58.
43. Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vécsei V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *European journal of radiology*. 2006 Jan;57(1):24–31.
  44. Brittberg M. Autologous chondrocyte implantation—Technique and long-term follow-up. *Injury*. 2008 Apr;39(1):40–9.
  45. Cole, Brian J; D’Amato M. Autologous chondrocyte implantation. *Operative techniques in orthopaedics*. 2001;11(2):115–31.
  46. Matsiko A, Levingstone T, O’Brien F. Advanced Strategies for Articular Cartilage Defect Repair. *Materials*. 2013 Feb 22;6(2):637–68.
  47. McCarthy HS, Roberts S. A histological comparison of the repair tissue formed when using either Chondrogide® or periosteum during autologous chondrocyte implantation. *Osteoarthritis and Cartilage*. Elsevier Ltd; 2013 Dec;21(12):2048–57.
  48. Erggelet C, Kreuz PC, Mrosek EH, Schagemann JC, Lahm A, Ducommun PP, et al. Autologous chondrocyte implantation versus ACI using 3D-bioresorbable graft for the treatment of large full-thickness cartilage lesions of the knee. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2010 Aug;130(8):957–64.
  49. Giannoni P, Pagano A, Maggi E, Arbicò R, Randazzo N, Grandizio M, et al. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for aged patients: development of the proper cell expansion conditions for possible therapeutic applications. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2005 Jul;13(7):589–600.
  50. Abbott J, Holtzer H. The loss of phenotypic traits by differentiated cells, V. The effect of 5-bromodeoxyuridine on cloned chondrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1968 Apr;59(4):1144–51.
  51. Harris JD, Siston R a, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanigan DC. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation--a systematic review. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. Elsevier Ltd; 2011 Jul;19(7):779–91.

52. Negrin LL, Vécsei V. Do meta-analyses reveal time-dependent differences between the clinical outcomes achieved by microfracture and autologous chondrocyte implantation in the treatment of cartilage defects of the knee? *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2013 Dec;18(6):940–8.
53. Gigante A, Bevilacqua C, Ricevuto A, Mattioli-Belmonte M, Greco F. Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy : official journal of the ESSKA*. 2007 Jan;15(1):88–92.
54. Abelow SP, Guillen P, Ramos T. Arthroscopic Technique for Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation for the Treatment of Large Chondral Defects in the Knee and Ankle. *Operative Techniques in Orthopaedics*. 2006 Oct;16(4):257–61.
55. Marlovits S, Striessnig G, Kutscha-Lissberg F, Resinger C, Aldrian SM, Vécsei V, et al. Early postoperative adherence of matrix-induced autologous chondrocyte implantation for the treatment of full-thickness cartilage defects of the femoral condyle. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2004 Oct 16;13(6):451–7.
56. Gooding CR, Bartlett W, Bentley G, Skinner J a, 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. *The Knee*. 2006 Jun;13(3):203–10.
57. Behrens P, Bitter T, Kurz B, Russlies M. Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACT/MACI)--5-year follow-up. *The Knee*. 2006 Jun;13(3):194–202.
58. Cherubino P, Grassi F. Autologous chondrocyte implantation using a bilayer collagen membrane: a preliminary report. *JOURNAL OF ....* 2003;11(1):10–5.
59. Enea D, Cecconi S, Busilacchi A, Manzotti S, Gesuita R, Gigante A. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI) in the knee. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2011 Aug 12;20(5):862–9.
60. Basad E, Ishaque B, Bachmann G, Stürz H, Steinmeyer J. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a

- 2-year randomised study. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. 2010 Apr;18(4):519–27.
61. Ebert JR, Robertson WB, Lloyd DG, Zheng MH, Wood DJ, Ackland T. Traditional vs accelerated approaches to post-operative rehabilitation following matrix-induced autologous chondrocyte implantation (MACI): comparison of clinical, biomechanical and radiographic outcomes. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2008 Oct;16(10):1131–40.
  62. Bartlett W, Skinner J a, Gooding CR, Carrington RWJ, Flanagan a M, Briggs TWR, et al. Autologous chondrocyte implantation versus matrix-induced autologous chondrocyte implantation for osteochondral defects of the knee: a prospective, randomised study. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2005 May;87(5):640–5.
  63. Ossendorf C, Kaps C, Kreuz PC, Burmester GR, 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. *Arthritis research & therapy*. 2007 Jan;9(2):R41.
  64. Choi N-Y, Kim B-W, Yeo W-J, Kim H-B, Suh D-S, Kim J-S, et al. Gel-type autologous chondrocyte (Chondron) implantation for treatment of articular cartilage defects of the knee. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010 Jan;11:103.
  65. Kim MK, Choi SW, Kim SR, Oh IS, Won MH. Autologous chondrocyte implantation in the knee using fibrin. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. 2010 Apr;18(4):528–34.
  66. Kon E, Filardo G, Matteo B Di, Perdisa F, Marcacci M. Matrix assisted autologous chondrocyte transplantation for cartilage treatment A SYSTEMATIC REVIEW. 2013;2(2):18–25.
  67. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)*. 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
  68. Caplan A. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*. 1991 Sep;9(5):641–50.
  69. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent

- mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. Elsevier; 2006 Jan;8(4):315–7.
70. Cordeiro-Spinetti E, de Mello W, Trindade LS, Taub DD, Taichman RS, Balduino A. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2014 Jan;2(March):7.
71. 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 engineering*. 2001 Apr;7(2):211–28.
72. Shaer A, Azarpira N, Aghdaie MH, Esfandiari E. Isolation and characterization of Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Placental Decidua Basalis; Umbilical cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane. *Pakistan journal of medical sciences*. 2014 Sep;30(5):1022–6.
73. Jurgens WJFM, Kroeze RJ, Zandieh-Doulabi B, van Dijk A, Renders G a P, Smit TH, et al. One-step surgical procedure for the treatment of osteochondral defects with adipose-derived stem cells in a caprine knee defect: a pilot study. *BioResearch open access*. 2013 Aug;2(4):315–25.
74. De Girolamo L, Bertolini G, Cervellin M, Sozzi G, Volpi P. Treatment of chondral defects of the knee with one step matrix-assisted technique enhanced by autologous concentrated bone marrow: in vitro characterisation of mesenchymal stem cells from iliac crest and subchondral bone. *Injury*. Elsevier Ltd; 2010 Nov;41(11):1172–7.
75. Drago J, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, Zhu M, Zuk P a, et al. Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue engineering*. 2007 Jul;13(7):1615–21.
76. Narbona F, Martín JV, Santos MF. Concentración de células mononucleares como predictor de la población de células madre mesenquimales en aspirado de médula ósea. Estudio comparativo entre cresta ilíaca, metáfisis distal de fémur y metáfisis proximal. *Trauma*. 2012;23:91–6.
77. Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, et al. Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny. *Blood*. 1980 Aug;56(2):289–301.

78. Filardo G, Madry H, Jelic M, Roffi A, Cucchiarini M, Kon E. Mesenchymal stem cells for the treatment of cartilage lesions: from preclinical findings to clinical application in orthopaedics. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. 2013 Aug;21(8):1717–29.
79. Fortier LA, Potter HG, Rickey EJ, Schnabel L V, Foo LF, Chong LR, et al. Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2010 Aug 18;92(10):1927–37.
80. Løken S, Jakobsen RB, Arøen a, Heir S, Shahdadfar a, Brinchmann JE, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells in a hyaluronan scaffold for treatment of an osteochondral defect in a rabbit model. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. 2008 Oct;16(10):896–903.
81. McIlwraith CW, Frisbie DD, Rodkey WG, Kisiday JD, Werypy NM, Kawcak CE, et al. Evaluation of intra-articular mesenchymal stem cells to augment healing of microfractured chondral defects. *Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. 2011 Nov;27(11):1552–61.
82. 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 and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2002 Mar;10(3):199–206.
83. Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, et al. Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2007 Feb;15(2):226–31.
84. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B. One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clinical orthopaedics and related research*. 2009 Dec;467(12):3307–20.
85. Haleem A, Singergy A El, Sabry D. Culture-Expanded Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Transplanted on Platelet-Rich Fibrin Glue in the Treatment of Articular Cartilage Defects A Pilot. *Cartilage*. 2010;1(4):253–61.

86. Emadedin M, Aghdami N, Taghiyar L, Fazeli R, Moghadasali R, Jahangir S, et al. Intra-articular injection of autologous mesenchymal stem cells in six patients with knee osteoarthritis. *Archives of Iranian medicine*. 2012 Jul;15(7):422–8.
87. Davatchi F, Abdollahi BS, Mohyeddin M, Shahram F, Nikbin B. Mesenchymal stem cell therapy for knee osteoarthritis. Preliminary report of four patients. *International journal of rheumatic diseases*. 2011 May;14(2):211–5.
88. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells. *Pain physician*. 2008;11(3):343–53.
89. Wakitani S, Nawata M. articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five. *Journal of tissue ...* 2007;74–9.
90. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, et al. “In vitro” and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *Journal of translational medicine*. 2007 Jan;5:55.
91. Zuk P, Zhu M, Ashjian P. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of ...* 2002 Dec;13(12):4279–95.
92. Almeida K, Campa A. Fracción vascular estromal de tejido adiposo: cómo obtener células madre y su rendimiento de acuerdo a la topografía de las áreas donantes: estudio. *Cirugía plástica ibero- ...* 2008;34(1):71–9.
93. Jakobsen RB, Østrup E, Zhang X, Mikkelsen TS, Brinchmann JE. Analysis of the effects of five factors relevant to in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells using factorial design and high throughput mRNA-profiling. *PloS one*. 2014 Jan;9(5):e96615.
94. Masuoka K, Asazuma T. Tissue engineering of articular cartilage with autologous cultured adipose tissue-derived stromal cells using atelocollagen honeycomb-shaped scaffold with a. ... *Research Part B: ...* 2006 Oct;79(1):25–34.
95. Han Y, Wei Y, Wang S, Song Y. Cartilage regeneration using adipose-derived stem cells and the controlled-released hybrid

- microspheres. *Joint, bone, spine: revue du rhumatisme*. 2010 Jan;77(1):27–31.
96. Wei Y, Hu H, Wang H, Wu Y, Deng L, Qi J. Cartilage regeneration of adipose-derived stem cells in a hybrid scaffold from fibrin-modified PLGA. *Cell transplantation*. 2009 Jan;18(2):159–70.
97. Zhang H, Li L, Leng P, Wang Y, Lv C-Y. Uninduced adipose-derived stem cells repair the defect of full-thickness hyaline cartilage. *Chinese journal of traumatology. The Editorial Board of Biomedical and Environmental Sciences*; 2009 Apr;12(2):92–7.
98. Oliveira JT, Gardel LS, Rada T, Martins L, Gomes ME, Reis RL. Injectable gellan gum hydrogels with autologous cells for the treatment of rabbit articular cartilage defects. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010 Sep;28(9):1193–9.
99. Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue engineering*. 2003 Aug;9(4):733–44.
100. Jung HH, Park K, Han DK. Preparation of TGF- $\beta$ 1-conjugated biodegradable pluronic F127 hydrogel and its application with adipose-derived stem cells. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society. Elsevier B.V.*; 2010 Oct 1;147(1):84–91.
101. Toghraie DF. Scaffold-free Adipose-derived Stem Cells (ASCs) Improve Experimentally Induced Osteoarthritis in Rabbits. *Archives of Iranian ...*. 2012 Aug;15(8):495–9.
102. Ter Huurne M, Schelbergen R, Blattes R, Blom A, de Munter W, Grevers LC, et al. Antiinflammatory and chondroprotective effects of intraarticular injection of adipose-derived stem cells in experimental osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2012 Nov;64(11):3604–13.
103. Desando G, Cavallo C, Sartoni F, Martini L, Parrilli A, Veronesi F, et al. Intra-articular delivery of adipose derived stromal cells attenuates osteoarthritis progression in an experimental rabbit model. *Arthritis research & therapy. BioMed Central Ltd*; 2013 Jan;15(1):R22.
104. Langer R. Tissue engineering: a new field and its challenges. *Pharmaceutical research*. 1997 Jul;14(7):840–1.

105. Chung C, Burdick J. Engineering cartilage tissue. *Advanced drug delivery reviews*. 2008 Jan 14;60(2):243–62.
106. Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000 Dec;21(24):2529–43.
107. Lietman SA, Miyamoto S, Brown PR, Inoue N, Reddi AH. The temporal sequence of spontaneous repair of osteochondral defects in the knees of rabbits is dependent on the geometry of the defect. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 2002 May 1;84(4):600–6.
108. Ishida O, Tanaka Y, Morimoto I, Takigawa M, Eto S. Chondrocytes are regulated by cellular adhesion through CD44 and hyaluronic acid pathway. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1997 Oct;12(10):1657–63.
109. Frost SJ, Weigel PH. Binding of hyaluronic acid to mammalian fibrinogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1990 Apr;1034(1):39–45.
110. Park S-H, Park SR, Chung S II, Pai KS, Min B-H. Tissue-engineered cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation. *Artificial organs*. 2005 Oct;29(10):838–45.
111. Park S-H, Cui JH, Park SR, Min B-H. Potential of fortified fibrin/hyaluronic acid composite gel as a cell delivery vehicle for chondrocytes. *Artificial organs*. 2009 Jun;33(6):439–47.
112. Yamskova VP, Krasnov MS, Yamskov IA. On mechanisms underlying regeneration and reparation processes in tissues. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2010 Jul;149(1):140–3.
113. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, de Souza P, John T, Shakibaei M. Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2004 Jun;12(6):448–58.
114. Darling EM, Athanasiou K a. Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2005 Mar;23(2):425–32.
115. Pelttari K, Steck E, Richter W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury*. 2008 Apr;39 Suppl 1:558–65.

116. Mobasheri A, Kalamegam G, Musumeci G, Batt ME. Chondrocyte and mesenchymal stem cell-based therapies for cartilage repair in osteoarthritis and related orthopaedic conditions. *Maturitas*. 2014 Jul;78(3):188–98.
117. Friedenstein A. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology ....* 1966 Dec;16(3):381–90.
118. Cui L, Wu Y, Cen L, Zhou H, Yin S, Liu G, et al. Repair of articular cartilage defect in non-weight bearing areas using adipose derived stem cells loaded polyglycolic acid mesh. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2009 May;30(14):2683–93.
119. Park JS, Yang HN, Woo DG, Jeon SY, Park K-H. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells in fibrin constructs evaluated in vitro and in nude mouse and rabbit defects models. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2011 Feb;32(6):1495–507.
120. De Vries-van Melle ML, Tihaya MS, Kops N, Koevoet WJLM, Murphy JM, Verhaar J a N, et al. Chondrogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a simulated osteochondral environment is hydrogel dependent. *European cells & materials*. 2014 Jan;27:112–23; discussion 123.
121. Solchaga L a, Yoo JU, Lundberg M, Dennis JE, Huijbregtse B a, Goldberg VM, et al. Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2000 Sep;18(5):773–80.
122. Patrascu JM, Krüger JP, Böss HG, Ketzmar A-K, Freymann U, Sittinger M, et al. Polyglycolic acid-hyaluronan scaffolds loaded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells show chondrogenic differentiation in vitro and cartilage repair in the rabbit model. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2013 Oct;101(7):1310–20.
123. Ye K, Felimban R, Traianedes K, Moulton SE, Wallace GG, Chung J, et al. Chondrogenesis of infrapatellar fat pad derived adipose stem cells in 3D printed chitosan scaffold. *PloS one*. 2014 Jan;9(6):e99410.
124. Ahearne M, Kelly DJ. A comparison of fibrin, agarose and gellan gum hydrogels as carriers of stem cells and growth factor delivery microspheres for cartilage regeneration. *Biomedical materials (Bristol, England)*. 2013 Jun;8(3):035004.
125. Ramos Pascua LR, Saldaña Díaz A, López Laguna M, Iglesias Muñoz FJ, Rodríguez-Altonaga Martínez JA, Gonzalo Orden JM.

- MÉTODO PARA PRODUCIR CELULAS TRONCALES MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO, ASÍ COMO LAS CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES OBTENIDAS POR DICHO MÉTODO. España; ES-2372239, 2012.
126. R Development Core Team R. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing. 2011. p. 409.
  127. Widuchowski W, Widuchowski J, Trzaska T. Articular cartilage defects: study of 25,124 knee arthroscopies. *The Knee*. 2007 Jun;14(3):177–82.
  128. Loeser RF. The effects of aging on the development of osteoarthritis. *HSS journal: the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*. 2012 Feb;8(1):18–9.
  129. Ahmed T, Hincke M. Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. *Histology and histopathology*. 2014 Jun;29(6):669–89.
  130. Kock L, van Donkelaar CC, Ito K. Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell and tissue research*. 2012 Mar;347(3):613–27.
  131. Whittaker J-P. Early results of autologous chondrocyte implantation in the talus. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*. 2005 Feb 1;87-B(2):179–83.
  132. Goessler UR, Bieback K, Bugert P, Heller T, Sadick H, Hörmann K, et al. In vitro analysis of integrin expression during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes upon dedifferentiation in cell culture. *International journal of molecular medicine*. 2006 Feb 1;17(2):301–7.
  133. Goessler UR, Bugert P, Bieback K, Deml M, Sadick H, Hormann K, et al. In-vitro analysis of the expression of TGFbeta - superfamily-members during chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells and chondrocytes during dedifferentiation in cell culture. *Cellular & molecular biology letters*. 2005 Jan;10(2):345–62.
  134. Buschmann MD, Gluzband YA, Grodzinsky AJ, Kimura JH, Hunziker EB. Chondrocytes in agarose culture synthesize a mechanically functional extracellular matrix. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1992 Nov;10(6):745–58.

135. Homicz M, Chia S. Human septal chondrocyte redifferentiation in alginate, polyglycolic acid scaffold, and monolayer culture. *The ...*. 2003 Jan;113(1):25–32.
136. An YH, Webb D, Gutowska A, Mironov V a, Friedman RJ. Regaining chondrocyte phenotype in thermosensitive gel culture. *The Anatomical record*. 2001 Aug 1;263(4):336–41.
137. English a, Jones E a, Corscadden D, Henshaw K, Chapman T, Emery P, et al. A comparative assessment of cartilage and joint fat pad as a potential source of cells for autologous therapy development in knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2007 Nov;46(11):1676–83.
138. Barbero A, Grogan S, Schäfer D, Heberer M, Mainil-Varlet P, Martin I. Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2004 Jun;12(6):476–84.
139. Tallheden T, Bengtsson C, Brantsing C, Sjögren-Jansson E, Carlsson L, Peterson L, et al. Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients. *Arthritis research & therapy*. 2005 Jan;7(3):R560–8.
140. Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Experimental cell research*. 2001 Aug 15;268(2):189–200.
141. Johnstone B, Hering TM, Caplan a I, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research*. 1998 Jan 10;238(1):265–72.
142. Sekiya I, Vuoristo JT, Larson BL, Prockop DJ. In vitro cartilage formation by human adult stem cells from bone marrow stroma defines the sequence of cellular and molecular events during chondrogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Apr 2;99(7):4397–402.
143. Dashtdar H, Rothan H a, Tay T, Ahmad RE, Ali R, Tay LX, et al. A preliminary study comparing the use of allogenic chondrogenic pre-differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells for the repair of full thickness articular cartilage defects in rabbits.

- Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2011 Sep;29(9):1336–42.
144. Stolzing a, Jones E, McGonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. Mechanisms of ageing and development. 2008 Mar;129(3):163–73.
  145. Zaim M, Karaman S, Cetin G, Isik S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. Annals of hematology. 2012 Aug;91(8):1175–86.
  146. Khan WS, Adesida a B, Tew SR, Andrew JG, Hardingham TE. The epitope characterisation and the osteogenic differentiation potential of human fat pad-derived stem cells is maintained with ageing in later life. Injury. 2009 Feb;40(2):150–7.
  147. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F. Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. Clinical orthopaedics and related research. 2003 Jul;(412):196–212.
  148. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. The Journal of bone and joint surgery British volume. 2003 Jul;85(5):740–7.
  149. Manferdini C, Maumus M, Gabusi E, Piacentini A, Filardo G, Peyrafitte J-A, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells exert antiinflammatory effects on chondrocytes and synoviocytes from osteoarthritis patients through prostaglandin E2. Arthritis and rheumatism. 2013 May;65(5):1271–81.
  150. Pires de Carvalho P, Hamel KM, Duarte R, King AGS, Haque M, Dietrich MA, et al. Comparison of infrapatellar and subcutaneous adipose tissue stromal vascular fraction and stromal/stem cells in osteoarthritic subjects. Journal of tissue engineering and regenerative medicine. 2014 Oct;8(10):757–62.
  151. Lopa S, Colombini A, Stanco D, de Girolamo L, Sansone V, Moretti M. Donor-matched mesenchymal stem cells from knee infrapatellar and subcutaneous adipose tissue of osteoarthritic donors display differential chondrogenic and osteogenic commitment. European cells & materials. 2014 Jan;27:298–311.
  152. Fossett E, Khan WS, Longo UG, Smitham PJ. Effect of age and gender on cell proliferation and cell surface characterization of synovial fat pad derived mesenchymal stem cells. Journal of

- orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2012 Jul;30(7):1013–8.
153. Khan WS, Adesida B, Tew SR, Longo UG, Hardingham TE. Fat pad-derived mesenchymal stem cells as a potential source for cell-based adipose tissue repair strategies. *Cell proliferation*. 2012 Apr;45(2):111–20.
  154. Jurgens WJFM, van Dijk A, Doulabi BZ, Niessen FB, Ritt MJPF, van Milligen FJ, et al. Freshly isolated stromal cells from the infrapatellar fat pad are suitable for a one-step surgical procedure to regenerate cartilage tissue. *Cytherapy*. Elsevier; 2009 Jan;11(8):1052–64.
  155. 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 research & therapy*. 2008 Jan;10(4):R74.
  156. Khan WS, Adesida AB, Hardingham TE. Hypoxic conditions increase hypoxia-inducible transcription factor 2alpha and enhance chondrogenesis in stem cells from the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients. *Arthritis research & therapy*. 2007 Jan;9(3):R55.
  157. O'hEireamhoin S, Buckley CT, Jones E, McGonagle D, Mulhall KJ, Kelly DJ. Recapitulating aspects of the oxygen and substrate environment of the damaged joint milieu for stem cell-based cartilage tissue engineering. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2013 Feb;19(2):117–27.
  158. Liu Y, Buckley CT, Downey R, Mulhall KJ, Kelly DJ. The role of environmental factors in regulating the development of cartilaginous grafts engineered using osteoarthritic human infrapatellar fat pad-derived stem cells. *Tissue engineering Part A*. 2012 Aug;18(15-16):1531–41.
  159. Martínez-Lorenzo MJ, Royo-Cañas M, Alegre-Aguarón E, Desportes P, Castiella T, García-Alvarez F, et al. Phenotype and chondrogenic differentiation of mesenchymal cells from adipose tissue of different species. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009 Nov;27(11):1499–507.
  160. Mochizuki T, Muneta T, Sakaguchi Y, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, et al. 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 and rheumatism*. 2006 Mar;54(3):843–53.
161. Wu C-L, Diekman BO, Jain D, Guilak F. Diet-induced obesity alters the differentiation potential of stem cells isolated from bone marrow, adipose tissue and infrapatellar fat pad: the effects of free fatty acids. *International journal of obesity (2005)*. 2013 Aug;37(8):1079–87.
162. Buckley CT, Vinardell T, Thorpe SD, Haugh MG, Jones E, McGonagle D, et al. Functional properties of cartilaginous tissues engineered from infrapatellar fat pad-derived mesenchymal stem cells. *Journal of biomechanics*. Elsevier; 2010 Mar 22;43(5):920–6.
163. Vinardell T, Rolfe RA, Buckley CT, Meyer EG, Ahearne M, Murphy P, et al. Hydrostatic pressure acts to stabilise a chondrogenic phenotype in porcine joint tissue derived stem cells. *European cells & materials*. 2012 Jan;23(23):121–32; discussion 133–4.
164. Buckley CT, Vinardell T, Kelly DJ. Oxygen tension differentially regulates the functional properties of cartilaginous tissues engineered from infrapatellar fat pad derived MSCs and articular chondrocytes. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. Elsevier Ltd; 2010 Oct;18(10):1345–54.
165. Zhang N, Dietrich M a, Lopez MJ. Canine intra-articular multipotent stromal cells (MSC) from adipose tissue have the highest in vitro expansion rates, multipotentiality, and MSC immunophenotypes. *Veterinary surgery: VS*. 2013 Feb;42(2):137–46.
166. Lee SY, Nakagawa T, Reddi a H. Induction of chondrogenesis and expression of superficial zone protein (SZP)/lubricin by mesenchymal progenitors in the infrapatellar fat pad of the knee joint treated with TGF-beta1 and BMP-7. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008 Nov 7;376(1):148–53.
167. Toghraie FS, Chenari N, Gholipour M a, Faghieh Z, Torabinejad S, Dehghani S, et al. Treatment of osteoarthritis with infrapatellar fat pad derived mesenchymal stem cells in Rabbit. *The Knee*. Elsevier B.V.; 2011 Mar;18(2):71–5.
168. Arrigoni E, Lopa S, de Girolamo L, Stanco D, Brini AT. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-

- derived stem cells: from small to large animal models. *Cell and tissue research*. 2009 Dec;338(3):401–11.
169. Slaughter B V, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas N a. Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla). 2009 Sep 4;21(32-33):3307–29.
170. Meinhart J, Fussenegger M, Höbling W. Stabilization of fibrin-chondrocyte constructs for cartilage reconstruction. *Annals of plastic surgery*. 1999 Jun;42(6):673–8.
171. Lee H-R, Park KM, Joung YK, Park KD, Do SH. Platelet-rich plasma loaded hydrogel scaffold enhances chondrogenic differentiation and maturation with up-regulation of CB1 and CB2. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. Elsevier B.V.; 2012 May 10;159(3):332–7.
172. Grigolo B, Roseti L, Fiorini M, Fini M, Giavaresi G, Aldini NN, et al. Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits. *Biomaterials*. 2001 Sep;22(17):2417–24.
173. Wu S-C, Chen C-H, Chang J-K, Fu Y-C, Wang C-K, Eswaramoorthy R, et al. Hyaluronan initiates chondrogenesis mainly via CD44 in human adipose-derived stem cells. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md: 1985). 2013 Jun;114(11):1610–8.
174. Iwasa J, Ochi M, Uchio Y, Katsube K, Adachi N, Kawasaki K. Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Artificial organs*. 2003 Mar;27(3):249–55.
175. Khoshfetrat AB, Kino-Oka M, Takezawa Y, Yamamoto T, Sugawara K, Taya M. Seeding density modulates migration and morphology of rabbit chondrocytes cultured in collagen gels. *Biotechnology and bioengineering*. 2009 Jan 1;102(1):294–302.
176. Concaro S, Nicklasson E, Ellowsson L, Lindahl A, Brittberg M, Gatenholm P. Effect of cell seeding concentration on the quality of tissue engineered constructs loaded with adult human articular chondrocytes. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2008 Jan;2(1):14–21.
177. Cooper G. *Cell Proliferation in Development and Differentiation. The cell: A molecular approach* 2nd edition. Sinauer As. Sunderland (MA); 2000 Jan;26(1).

178. Im G, Ko J, Lee J. Chondrogenesis of adipose stem cells in a porous polymer scaffold: influence of the pore size. *Cell transplantation*. 2012 Jan;21(11):2397–405.
179. Wu S-C, Chang J-K, Wang C-K, Wang G-J, Ho M-L. Enhancement of chondrogenesis of human adipose derived stem cells in a hyaluronan-enriched microenvironment. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2010 Feb;31(4):631–40.
180. Jakobsen RB, Shahdadfar A, Reinholt FP, Brinchmann JE. Chondrogenesis in a hyaluronic acid scaffold: comparison between chondrocytes and MSC from bone marrow and adipose tissue. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. 2010 Oct;18(10):1407–16.
181. Choi JW, Choi BH, Park S-H, Pai KS, Li TZ, Min B-H, et al. Mechanical stimulation by ultrasound enhances chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a fibrin-hyaluronic acid hydrogel. *Artificial organs*. 2013 Jul;37(7):648–55.
182. Chu CR, Szczodry M, Bruno S. Animal models for cartilage regeneration and repair. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010 Feb;16(1):105–15.
183. Chen H, Chevrier A, Hoemann CD, Sun J, Picard G, Buschmann MD. Bone marrow stimulation of the medial femoral condyle produces inferior cartilage and bone repair compared to the trochlea in a rabbit surgical model. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2013 Nov;31(11):1757–64.
184. DAVIES D V, BARNETT CH, COCHRANE W, PALFREY AJ. Electron microscopy of articular cartilage in the young adult rabbit. *Annals of the rheumatic diseases*. 1962 Mar 1;21(1):11–22.
185. Telhag H. Experimental osteoarthritis in rabbits. *Acta orthop Scandinav*. 1970;41:522–30.
186. Garcia Paíno, L.; Carranza Bencano, A.; Armas Padrón JR. Long-term analysis of articular cartilage formation induced by tibial periostium free grafts in chondral defects of the medial femoral condyle in the rabbits. *REVISTA ESPAÑOLA DE CIRUGÍA OSTEOARTICULAR*. 1999;34(199):162–70.
187. Oda K, Mori K, Imai S, Uenaka K, Matsusue Y. Comparison of repair between cartilage and osteocartilage defects in rabbits using similarly manipulated scaffold-free cartilage-like constructs. *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2014 Jul;19(4):637–45.

188. Shao X, Goh JCH, Hutmacher DW, Lee EH, Zigang G. Repair of large articular osteochondral defects using hybrid scaffolds and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. *Tissue engineering*. 2006 Jun;12(6):1539–51.
189. Salter RB, Simmonds DF, Malcolm BW, Rumble EJ, MacMichael D, Clements ND. The biological effect of continuous passive motion on the healing of full-thickness defects in articular cartilage. An experimental investigation in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1980 Dec;62(8):1232–51.
190. Cheuk Y-C, Wong MW-N, Lee K-M, Fu S-C. Use of allogeneic scaffold-free chondrocyte pellet in repair of osteochondral defect in a rabbit model. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011 Sep;29(9):1343–50.
191. Wei X, Messner K. Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint. *Journal of biomedical materials research*. 1999 Sep 15;46(4):539–48.
192. Kuhn J, Goldstein S, Ciarelli M, Matthews L. The limitations of canine trabecular bone as a model for human: a biomechanical study. *Journal of biomechanics*. 1989 Jan;22(2):95–107.
193. Qiu Y. Observations of subchondral plate advancement during osteochondral repair: a histomorphometric and mechanical study in the rabbit femoral condyle. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2003 Nov;11(11):810–20.
194. Gushue DL, Houck J, Lerner AL. Rabbit knee joint biomechanics: motion analysis and modeling of forces during hopping. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2005 Jul;23(4):735–42.
195. Brittberg M, Sjögren-Jansson E, Lindahl A, Peterson L. Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee. *Biomaterials*. 1997 Feb;18(3):235–42.
196. Filová E, Jelínek F, Handl M, Lytvynets A, Rampichová M, Varga F, et al. Novel composite hyaluronan/type I collagen/fibrin scaffold enhances repair of osteochondral defect in rabbit knee. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2008 Nov;87(2):415–24.
197. Lohan A, Marzahn U, El Sayed K, Haisch A, Müller RD, Kohl B, et al. Osteochondral articular defect repair using auricle-derived autologous chondrocytes in a rabbit model. *Annals of anatomy*

- = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft. Elsevier GmbH.; 2014 Sep;196(5):317–26.
198. Reyes R, Pec M, Sanchez E. Comparative, osteochondral defect repair: stem cells versus chondrocytes versus bone morphogenetic protein-2, solely or in combination. *Eur Cell ...* 2013 Jan;25:351–65; discussion 365.
199. Che JH, Zhang ZR, Li GZ, Tan WH, Bai XD, Qu FJ. Application of tissue-engineered cartilage with BMP-7 gene to repair knee joint cartilage injury in rabbits. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA*. 2010 Apr;18(4):496–503.
200. Xie X, Wang Y, Zhao C, Guo S, Liu S, Jia W, et al. Comparative evaluation of MSCs from bone marrow and adipose tissue seeded in PRP-derived scaffold for cartilage regeneration. *Biomaterials*. Elsevier Ltd; 2012 Oct;33(29):7008–18.
201. Cao Z, Hou S, Sun D, Wang X, Tang J. Osteochondral regeneration by a bilayered construct in a cell-free or cell-based approach. *Biotechnology letters*. 2012 Jun;34(6):1151–7.
202. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, Ju Y-J, Mochizuki T, et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell and tissue research*. 2008 Aug;333(2):207–15.
203. Im G-I, Lee JH. Repair of osteochondral defects with adipose stem cells and a dual growth factor-releasing scaffold in rabbits. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2010 Feb;92(2):552–60.
204. Bartis D, Pongrácz J. Three dimensional tissue cultures and tissue engineering. Pécs, Hungary: University of Pécs, Hungary; 2011 p. 1–133.

X- ANEXOS

---



<b>ANEXO-I-MATERIAL</b>
-------------------------

<u>MATERIAL</u>	<u>CASA COMERCIAL</u>	<u>REFERENCIA</u>
Ácido acético.....	Sigma-Aldrich.....	A9967
Ácido acético glacial .....	Fluka .....	1005706
Ácido ascórbico .....	Sigma-Aldrich.....	534064
Ácido clorhídrico .....	Sigma-Aldrich.....	H1758
Ácido fosfotungstico .....	Merck.....	1.00583.0100
Ácido hialurónico .....	Bioibérica .....	864389
Ácido tranexámico.....	Rottapharm .....	672018
Agua destilada 1 L.....	Laboratorio Farmac.....	346189
Alizarina.....	Sigma-Aldrich.....	A3882
Anfotericina B .....	Sigma-Aldrich.....	A9528
Anticuerpo colágeno II.....	Calbiochem .....	CP18
Azul alcian.....	Sigma-Aldrich.....	A3157
Azul tripán 0,4%.....	Sigma-Aldrich.....	T8154
Calceína .....	Sigma-Aldrich.....	CO875
Cámara Neubauer .....	Paul Marienfeld GmbH .....	-
Cassette de histología 1 celda .....	Deltalab.....	554143
Cassette de histología 2 celdas.....	Labbox .....	127300
Clorhidrato de cisteína.....	Sigma-Aldrich.....	C1276-10G
Cloruro cálcico (CaCl <sub>2</sub> ).....	Braun Medical .....	635656
Colagenasa tipo I.....	Serva .....	1745401
Colistimetato sódico .....	GES .....	838185.2
Criovial 1,5 ml.....	Deltalab.....	409105.1
Cristal violeta- (kit tinción Gram) .	Sigma-Aldrich.....	HT90A
Cubreobjetos de vidrio (24X50) ..	Menzel-Glaser.....	AC1575
Demeclociclina .....	Sigma-Aldrich.....	D6140
Dexametasona.....	Sigma-Aldrich.....	D4902
Eosina Y .....	Sigma-Aldrich.....	HT110216
Etanol 96° .....	Panreac.....	121085.1211

<b><u>MATERIAL</u></b>	<b><u>CASA COMERCIAL</u></b>	<b><u>REFERENCIA</u></b>
Etanol absoluto .....	Panreac.....	121086.1211
Filtro de vacío 150 ml- 0,22µm....	Millipore .....	SCGPU01RE
Filtro de vacío 250 ml- 0,22µm ...	Millipore .....	SCGPU02RE
Filtro de vacío 50 ml- 0,22µm .....	Millipore .....	SCGP00525
Frasco de cultivo 25 cm2 .....	TPP .....	TPP90026
Frasco de urocultivo .....	Soria Genlab .....	FRM100EU
Glutaraldehído .....	Sigma-Aldrich.....	G5882-50ML
Hams's-F12 .....	PAA Laboratories GmbH.....	E15-016
Hematoxilina de Gills, 3 .....	Sigma-Aldrich.....	GHS316
Hematoxilina de Mayer .....	Sigma-Aldrich.....	51275
Hematoxilina férrica de Weigert ..	Sigma-Aldrich.....	HT1079
Histofix .....	Panreac.....	256,462
Hojas de bisturí N°22 .....	Braun Medical .....	BB522
Indometacina .....	Sigma-Aldrich.....	I7378
Insulina .....	Sigma-Aldrich.....	I0516
Isobutilmetilxantina .....	Sigma-Aldrich.....	I7018
Jeringa 10 ml .....	Braun Medical .....	4606108V
Kit Life/Dead® .....	Life Technologies .....	L-3224
L-Glutamina.....	PAA Laboratories GmbH.....	M11-004
Mango de bisturí N°4 .....	Nopa.....	AD010/04
Medio base de cultivo (DMEM) ..	PAA Laboratories GmbH.....	E15-005
Medio de montaje (DPX).....	Sigma-Aldrich.....	44581
Metanol .....	Sigma-Aldrich.....	534013
Metilmetacrilato .....	Merck.....	8.00590.1000
Nitrato de plata.....	Merck.....	1.01512.0100
Nuclear fast red .....	Sigma-Aldrich.....	N3020
Oil red-O .....	Sigma-Aldrich.....	O0625
Paño estéril.....	Medline .....	15212CEB
Parafilm.....	Pechiney .....	PM-966
Parafina.....	Merck.....	1151619025
Paraformaldehido 4% .....	Panreac.....	252931.1211

<u>MATERIAL</u>	<u>CASA COMERCIAL</u>	<u>REFERENCIA</u>
Penicilina/Estreptomicina (P/S) .....	Sigma-Aldrich.....	P4333-100ML
Pipeta serológica 1 ml estéril .....	Labclinics .....	PN1E1
Pipeta serológica 10 ml estéril .....	Labclinics .....	PN10E1
Pipeta serológica 5 ml estéril.....	Labclinics .....	PN5E1
Placa multipocillo 24 .....	TPP .....	TPP92024
Placa multipocillo 96 .....	Labclinics .....	256510
Placa Petri 96 mm .....	Deltalab.....	200209
Placas multipocillo 6 .....	BD Biosciences .....	353046
Ponceau de xilidina.....	Merck.....	1.15927.0025
Portaobjetos.....	Menzel-Glaser .....	J3800AMNZ
Propilenglicol .....	Sigma-Aldrich.....	134,468
Punch quirúrgico.....	Stiefel .....	006-0004
Puntas 0,5-10 $\mu$ l.....	Labbox .....	TIPP-011-1k0
Puntas 100-1000 $\mu$ l .....	Labbox .....	TIPP-1K1-1K0
Puntas 2-200 $\mu$ l .....	Labbox .....	TIPP-200-1K0
Recipiente plástico 1 L.....	Deltalab.....	241013
Revelado inmunohistoquímica .....	Vectorlabs.....	PK-4002
Rojo alizarina .....	Sigma-Aldrich.....	A5533
Safranina-O .....	Sigma-Aldrich.....	S8884
Suero bovino fetal .....	LINU .....	50181
Suero fisiológico estéril 250 ml.....	Braun Medical .....	3570380
Suero fisiológico estéril 500 ml.....	Braun Medical .....	3570470
Sulfametoxazol-Trimetoprima .....	Almofarma .....	656754.8
Sulfato de sodio.....	Prolabo .....	28111.296
Tampón fosfato salino (PBS) .....	Sigma-Aldrich.....	P5493-1L
TGF- $\beta$ 1.....	Sigma-Aldrich.....	L3408
Tobramicina .....	Braun Medical .....	600551
Tripsina/EDTA 0.25% (T/E) .....	Sigma-Aldrich.....	T4049-100ML
Tubo de 15 ml .....	Deltalab.....	429946
Tubo de 50 ml .....	Deltalab.....	429926
Tubo de citrato trisódico.....	BD Vacutainer Systems .....	367704

<u>MATERIAL</u>	<u>CASA COMERCIAL</u>	<u>REFERENCIA</u>
Vancomicina.....	Normon .....	618694.7
Verde luz.....	Sigma-Aldrich.....	B4014
Verde rápido .....	Sigma-Aldrich.....	F7258
Naranja de xilenol .....	Sigma-Aldrich.....	33,825
Xilol.....	Sigma-Aldrich.....	S34056
$\beta$ -Glicerolfosfato .....	Sigma-Aldrich.....	G9891

<b>ANEXO-II- PROTOCOLOS</b>
-----------------------------

---

**PROTOCOLO ANESTÉSICO**


---

S.E.A. animalario omg	TEL- 9.1.1
Anestesia de roedores y Lagomorfos	Rev: 31/5/2012
PNSEA#2	Página 1 de 7

**1- PROPÓSITO**

Describir los procedimientos de anestesia general utilizados en los roedores y lagomorfos más comunes de experimentación, que sirvan de guía a los investigadores.

**2- ÁMBITO**

Aplicable a todo animal sometido a cualquier proceso experimental o quirúrgico que provoque dolor en los animales, a menos que su uso este contraindicado por razones científicas, argumentadas por escrito por el investigador.

**3-INFORMACIÓN REQUERIDA**

Todo investigador cuyo proyecto necesite utilizar agentes anestésicos deberá rellenar un formulario de solicitud de utilización de agentes anestésicos, para facilitarle posteriormente el suministro de fármacos (ej. ketamina, pentobarbital, etc) que requieran receta veterinaria. El investigador será responsable del uso y conservación adecuada del mismo, llevando un registro de utilización y solicitando con antelación su reposición.

**4- SEGURIDAD**

Todas los agentes anestésicos deberán almacenarse en lugares con acceso exclusivo a personal autorizado y manipularse de forma adecuada.

## 5- PROTOCOLOS DE ANESTESIA PARENTERAL ACEPTADOS PARA ROEDORES ADULTOS

### 5.1 Consideraciones:

- Utilizar en procedimientos que requieran una anestesia de corta duración (< 1 hora).
- Evaluar el estado sanitario. No emplear en animales con problemas hepáticos o renales.
- No usar en hembras gestantes o con camadas, estas drogas pueden difundir a través de la barrera placentaria y de las glándulas mamarias.
- Pesar los animales antes de administrar el agente anestésico para su correcta dosificación.
- Utilizar la mitad de la dosis inicial si se requiere una nueva administración.
- Asegurarse de la correcta administración; retraer el embolo de la jeringa,(ejercer una presión negativa) para descartar la salida de sangre, contenido intestinal, etc.
- Emplear una jeringuilla estéril con cada animal.  
La duración de la anestesia puede ser variable, según el individuo.
- Emplear una manta calefactora durante y después de la cirugía, para controlar la hipotermia debida al anestésico.

Vías de administración

Especie	IM (intramuscular)	IP (intraperitoneal)	SC (subcutánea)	IV (intravenoso)
<b>Ratón</b> 20-25 g	Músculos posteriores del muslo Aguja de 25-27 G x 5/8"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja de 25 G x 5/8"	Pellizco piel del cuello Aguja de 25 G x 5/8"	Vena de la cola, coccígea Aguja de 30 G x 1/2"
<b>Rata</b> 200 g	Músculos posteriores del muslo Aguja de 25 G x 5/8"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja de 23 x 1"	Pellizco piel del cuello Aguja de 23 G x 1"	Vena de la cola, femoral, yugular Aguja de 25 G x 5/8"
<b>Conejo</b> 2,5 kg	Músculos posteriores del muslo y lumbares Aguja 23 G x 1"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja 21 G x 1"	Pellizco piel del cuello Aguja 21 G x 1"	Vena marginal de la oreja Aguja 21 G x 1"
<b>Cobaya</b> 350 g	Músculos posteriores del muslo Aguja de 25 G x 5/8"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja de 23 x 1"	Pellizco piel del cuello Aguja de 23 G x 1"	Vena femoral Vena safena Aguja de 30 G x 1/2"
<b>Hámster</b> 80-120 g	Músculos posteriores del muslo Aguja de 25 G x 5/8"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja de 25 G x 5/8"	Pellizco piel del cuello Aguja de 25 G x 5/8"	Vena yugular Aguja de 27 G x 5/8"

Vías	P.O (oral)	IP	IV	IM	SC	ID
Vol. máx.	10 ml/kg	10 ml/kg	5 ml/kg	0,05 (ml/kg/ lugar)	2-5 (ml/kg/ lugar)	0,05-1 (ml/lugar)

- IV: inyección del inóculo en período relativamente corto de tiempo (aproximadamente 1 minuto)
- SC: el volumen depende de la flacidez de la piel del animal y por lo tanto, del potencial del espacio subcutáneo. En caso de

utilizar volúmenes mayores habrá que utilizar múltiples puntos de inoculación.

- ID: el volumen depende del espesor de la piel que varía con el lugar y la especie. El número máximo de puntos de inoculación es 6.
- IM: este es volumen para un único punto. La utilización de más de un punto en más de un miembro puede producir cojera múltiple.

## 5.2 Anestésicos

ANESTÉSICO	ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	VIA	DURACIÓN (minut)
Ketamina/Diazepam/Atropina	Ratón	50/5/1	IP	20-40
Ketamina/medetomidina	Ratón	75/1	IP	20-60
	Rata	75/0,5	IP	20-60
	Coba	40/0,5	IP	20-60
	Conej	25/0,5	IM	
Ketamina/Xilacina/	Ratón	50/5/1	IM,	20-40
	Rata	50/5/1	IM,	20-40
Ketamina/Xilacina	Ratón	50-	IM,	20-60
	Rata	40-	IM,	20-60
	Coba	40/5	IP	20-60
	Conej	35/5	IM	20-60
	Háms	200/10	IP	20-60
Pentobarbital	Ratón	30-50	IP	20-60
	Rata	40-60	IP	20-60
	Coba	37	IP	20-60
	Conej	45	IV	20-60
	Háms	50	IP	20-60
Propofol	Ratón	26	IV	5-10
	Rata	1 mg/Kg/min	IV IV	5-10 infu.cont ínua
	Conej	1	IV	5-10

### 5.2.1 Anestésicos:

### 5.2.2 Marcas comerciales de anestésicos más comunes:

- Ketamina: Imalgene 1000 (100 mg/ml) Imalgene 500 ( 50 mg/ml)
  - Diazepam: Valium 10 (5 mg/ml) (Roche). (Ampollas de 10 mg/2ml).
  - Xilacina: Rompun 2% (20 mg/ml) (Bayer)
  - Acepromacina: Combelem (10 mg/ml) (Bayer)
- Otras fármacos o sustancias empleadas:
- Atropina: Atropina (1 mg/ml) (Bayer).
  - Suero salino fisiológico (0.9%)

### 5.2.3 Preparación:

#### 5.2.3.1 Ketamina/Diazepam/Atropina

Para 10 ratones: mezclar 0.5 ml de Imalgene 500, 0.4 ml de valium 10 y 1 ml de atropina. (Si se utiliza Imalgene 1000 coger 0.25 ml y diluir con 0.25 ml de suero salino fisiológico). Administrar 0.1 ml IP a un ratón de 25 gr.

#### 5.2.3.2 Ketamina/Xilacina/Acepromacina:

Mezclar 5 ml de Imalgene 1000 (el doble si es Imalgene 500), 2.5 ml de Rompun y 1 ml de Combelem. Añadir 1.5 ml de suero salino estéril. Almacenar a temperatura ambiente protegido de la luz (la acepromacina es sensible a la luz). Almacenar hasta 2 semanas.

## 6- PROTOCOLOS DE ANESTESIA INHALATORIA ACEPTADOS PARA ROEDORES ADULTOS

### 6.1 Consideraciones:

- Para procedimientos de cualquier duración
- Adsorción y eliminación a través de pulmones.
- Fases: Inducción, mantenimiento y recuperación.

### 6.2 Material:

- Regulador de flujo de gases
- Fuente de oxígeno.
- Cámara de anestesia.
- Mascarilla facial para roedores
- Vaporizador anestésico.
- Anestésico (isoflurano).

### 6.3 Procedimiento

- 6.3.1 Comprobar el nivel de isoflurano en el vaporizador y llenarlo en caso necesario. Abrir la válvula general de la botella de oxígeno.
- 6.3.2 Inducción: colocar el animal en la cámara de inducción anestésica regulando el vaporizador al 4-5% de isoflurano y flujo de oxígeno a (0.5-1.0 l/min). Cuando el animal pierda la consciencia, cerrar la llave de entrada a la misma, sacarlo de la cámara y colocarle la mascarilla.
- 6.3.3 Mantenimiento: regular el vaporizador de anestésico al 2% y oxígeno al 100% con un flujo de oxígeno de (0,5-1 l/min).
- 6.3.4 Recuperación: desconectar el vaporizador de isoflurano y después el oxígeno (0,5 l/min). Durante la fase de recuperación, se puede dejar al animal ventilando con oxígeno al 100%, en función de su recuperación.

## 7. VIGILANCIA INTRA Y POSTOPERATORIA

### 7.1 Vigilancia intraoperatoria

- Establecer una monitorización del animal cada 10 minutos, y anotar la administración de fármacos, dosis y reacciones adversas que se produzcan durante el procedimiento experimental.
- Comprobar los parámetros de profundidad anestésica y analgésica (realizar cada 10-15 minutos): ausencia de movimientos o ausencia de respuesta a estímulos externos o ausencia de reflejos (pellizcar la pata y la nariz, tirar de las vibrisas, ausencia de reflejo corneal y palpebral, etc), ritmo respiratorio regular y relajado, sin apnea respiratoria.
- Mantener el animal sobre una manta térmica para evitar la hipotermia.
- En caso de parada respiratoria aplicar ventilación artificial (ver punto 12.Ventilación artificial) o administrar 5-10 mg/kg de doxapram IP o IV. En caso de repetirse nuevos episodios de parada respiratoria a intervalos de 10-15 minutos.
- En caso de utilizar medetomidina o xilacina se puede administrar 0.1-1 mg/kg de atipamezole SC o IP para contrarrestar los efectos de estos (más administrar estas mismas dosis efectivo para la medetomidina).

## 7.2 Vigilancia postoperatoria

- Mantener el animal o la cubeta sobre una manta térmica hasta su recuperación.
- Rehidratar con suero salino fisiológico estéril templado (1-2 ml por 100 g de peso vía SC). Para comprobar el grado de deshidratación se coge un pliegue de piel de la zona lateral del tórax y se evalúa si esta se retrae o permanece en pliegue, en este segundo caso se debe administrar fluidoterapia.
- Vigilar el estado fisiológico de los animales dos veces al día durante la primera semana.
- Evitar molestar los animales durante los primeros días tras el proceso experimental.

## 8- RECOMENDACIONES DE PREANESTESIA EN NEONATOS

Para reducir el riesgo de canibalismo de las crías por parte de las progenitoras se recomienda el manejo y acondicionamiento olfativo de las madres. Para ello se establecerán períodos de manejo diarios en intervalos de 5 minutos.

## 9-PROCEDIMIENTOS DE ANESTESIA PARENTERAL ACEPTADOS PARA ROEDORES NEONATOS

### 9.1

#### Consideraciones:

- Ver punto 5.1
- Vías de administración ver punto 5.1.

### 9.2

#### Anestésicos

ANESTÉSICO	ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	VIA	DURACIÓN
Ketamina/Xilacina	Ratón (+ 7 días)	50-150/5-10	IP	20-30
	Rata (+ 7 días)	40-90/5-10	IP	20-30

## 10 - PROTOCOLOS DE ANESTESIA INHALATORIA ACEPTADOS PARA ROEDORES NEONATOS

Ver punto 6. Protocolos de anestesia inhalatoria aceptados para roedores adultos.

## 11- VIGILANCIA INTRA Y POSTOPERATORIA

Ver punto 7. Vigilancia intra y postoperatoria.

## 12- VENTILACIÓN ARTIFICIAL

### 12.1 Consideraciones

- Los métodos para realizar la ventilación artificial son mediante un ventilador mecánico (diseñado para animales de laboratorio) o mediante presión manual.
- Es aconsejable utilizar ventilación artificial durante la toracotomía o cuando se utiliza un relajante muscular.
- También se debe aplicar ventilación artificial durante la cirugía prolongada.
- Durante la ventilación artificial mecánica las presiones de inflado no deben sobrepasar los 10 cm de H<sub>2</sub>O en animales pequeños.
- En caso de disponer de un capnógrafo/capnómetro (diseñado para animales de laboratorio) se medirá el contenido de anhídrido carbónico en el gas expirado, este se debe mantener dentro del intervalo normal de 4-5%, esto indica una correcta ventilación artificial.

### 12.2 Parámetros

ESPECIE	FRECUENCIA/ MINUTO	VOLUMEN VENTILACIÓN PULMONAR	TIEMPO EXPIRACIÓN (%)	PRESIÓN (cm H <sub>2</sub> O)
Ratón	100-130	0.5-1	35/65	5-15
Rata	50-80	3-10	35/65	5-15
Cobaya	30-50	8-20	35/65	5-15
Conejo	30-50	40-60	35/65	5-15

**13- PARÁMETROS FISIOLÓGICOS**

ESPECIE	T <sup>a</sup> CORPORAL (°C)	FREC. CARDIACA (LAT/MIN)	FREC. RESPIRATORIA (RESP/MIN)
Ratón	36,5-38	300-800	100-200
Rata	37.5-38.5	300-500	70-110
Cobaya	37.2-39.5	230-380	42-104
Conejo	38-39.6	130-325	30-60
Hámster	37-38	250-500	40-120

NOTA: Los rangos de las dosis indican grados variables de profundidad anestésica o el ajuste necesario para cada linaje o variación genética del individuo. Antes de aplicar una dosis considerada en una población homogénea de animales, deben ajustarse estas mediante pruebas piloto en algunos de ellos.

## PROTOCOLO ANALGÉSICO

S.E.A. animalario omg	TEL- 9.3.1
Analgesia en animales de	Revisado: 30-
PNSEA#3	Página 1 de 5

### **1-PROPÓSITO**

Describir los principales fármacos y su utilización para realizar pautas analgésicas en animales experimentación, que sirvan como guía a los investigadores.

### **2-ÁMBITO**

Aplicable a todo animal sometido a cualquier proceso experimental que cause dolor en los animales, a menos que su uso este contraindicado por razones científicas, debidamente argumentadas por escrito por el investigador.

### **3-INFORMACIÓN REQUERIDA**

Todo investigador cuyo proyecto necesite utilizar agentes analgésicos deberá rellenar un formulario de solicitud de los mismos, para facilitarles el suministro de aquellos (ej. buprenorfina, morfina, etc), que requieran receta veterinaria. El investigador llevará un registro de uso de los analgésicos al objeto de solicitar su reposición cuando sea preciso. El SEA suministrará bajo petición, la cantidad de fármaco necesaria para acometer el experimento siendo esta como mínimo la que se disponga en la presentación del fármaco y quedando esta en custodia por el usuario.

### **4-SEGURIDAD**

Todas los agentes analgésicos deberán almacenarse con acceso restringido a personal autorizado. En el caso de almacenarse en el animalario, se deberán guardar en cajas individuales de usuario.

---

## 5- PROTOCOLOS DE ANALGESIA ACEPTADOS PARA ROEDORES Y CONEJOS ADULTOS

### 5.1 Consideraciones:

- Administrar antes de la anestesia, durante y/o al final de la anestesia u otros procedimientos que causen dolor al animal así como en los casos que se constate dolor crónico.
- Agentes utilizados: opiáceos (narcóticos): buprenorfina, butorfanol, codeína, fentanilo, morfina, nalbufina, pentazocina; antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): Ácido acetil salicílico, Flunixin meglubine, naloxona, meloxicam, paracetamol, petidina. Los AINEs no producen suficiente efecto analgésico en el control del dolor intenso procedente de la cirugía o el trauma, debiéndose utilizar solo con dolor ligero o moderado.
- Fármacos
  - Buprenorfina, en caso de administración vía IM y SC considerar que el inicio de acción es lento (más de 45 minutos), por lo tanto se debe administrar en la premedicación. Recomendado para la analgesia intraoperatoria y control del dolor postoperatorio.
  - Fentanilo, analgésico muy potente pero de duración corta (20-30 minutos). Provoca aumento de la salivación y disminución de la frecuencia cardíaca y presión arterial.
  - Nalbufina: agonista-antagonista utilizado para el tratamiento del dolor entre severo y moderado. Este fármaco no parece inducir depresión respiratoria.
  - Morfina: alivio del dolor agudo o crónico moderado o grave, y también se utiliza como sedante preoperatorio y como suplemento a la anestesia general, inicio de acción lento vía IM e

IV). Recomendable para el dolor postoperatorio severo. Asociar con atropina para contrarrestar los efectos adversos que produce (cardiovasculares y gastrointestinales).

- Butorfanol: más potente que la morfina. Emplear en el postoperatorio, su absorción vía IM es rápida, administrar 5-10 minutos antes de terminar la cirugía.
- Codeína: posee propiedades similares a la morfina, pero su acción comienza antes y su duración es menor.
- Pentazozina: opiáceo menos potente que la morfina. Por vía IM o SC tiene pocos efectos cardiorrespiratorios.
- Petidina: similar a la morfina. Acción rápida pero de duración corta. Es adecuado en el preoperatorio y en el postoperatorio. Por vía IV produce hipotensión y bradicardia, por lo que debe administrarse lentamente.
- Anestesia local y regional: Los anestésicos locales (lidocaina, mevipacaina, buvipacaina, etc.) no afectan el nivel de consciencia bloqueando la conducción nerviosa a nivel local por lo que su uso se debe restringir para aliviar el dolor en punciones, o junto con otras drogas tranquilizantes para pequeñas intervenciones quirúrgicas.

- Vías de administración:

Especie	IM (intramuscular)	IP (intraperitoneal)	SC (subcutánea)	IV (intravenoso)
<b>Ratón</b> 20-25 g	Musculatura posterior del muslo Aguja de 25-27 G x 5/8"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja de 25 G x 5/8"	Pellizco piel del cuello Aguja de 25 G x 5/8"	Vena de la cola, coccígea Aguja de 30 G x 1/2"
<b>Rata</b> 200 g	Musculatura posterior del muslo Aguja de 25 G x 5/8"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja de 23 x 1"	Pellizco piel del cuello Aguja de 23 G x 1"	Vena de la cola, femoral y yugular Aguja de 25 G x 5/8"
<b>Conejo</b> 2,5 kg	Musculatura posterior del muslo Aguja 23 G x 1"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja 21 G x 1"	Pellizco piel del cuello Aguja 21 G x 1"	Vena marginal de la oreja Aguja 21 G x 1"
<b>Cobaya</b> 350 g	Musculatura posterior del muslo Aguja de 25 G x 5/8"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja de 23 x 1"	Pellizco piel del cuello Aguja de 23 G x 1"	Vena femoral Aguja de 30 G x 1/2"
<b>Hámster</b> 25-30 g	Musculatura posterior del muslo Aguja de 25 G x 5/8"	Cavidad abdominal, lateral a la línea media Aguja de 25 G x 5/8"	Pellizco piel del cuello Aguja de 25 G x 5/8"	Vena yugular Aguja de 27 G x 5/8"

## 5.2 Analgésicos

ANALGÉSICO	ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	VIA	DURACIÓN (horas)
Ácido acetil salicílico (Aspirina)	Ratón	120-300	PO	4
	Rata	100	PO	4
	Cobaya	85	PO	4
	Conejo	100	PO	4
	Hámster	240 (día)	PO	
Buprenorfina	Ratón	0.05-0.1	SC, IM	8-12
	Rata	0.01-0.05	SC, IM,	8-12
	Cobaya	0.05	SC, IM	8-12
	Conejo	0.01-0.05	SC, IV	8-12
	Hámster	0.05-0.1	SC, IM	8-12
Butorfanol	Ratón	1-5	SC, IM	4
	Rata	2	SC, IM	4
	Conejo	0.1-0.5	IV	4
Codeína	Ratón	60-90-20	PO, SC	4
	Rata	60	SC	4
Fentanilo	Ratón	0,3		0,5
Flunixin	Ratón	2.5	SC, IM	12
	Rata	2.5	SC, IM	12
	Conejo	1.1	SC, IM	12
Meloxicam	Ratón	1-2	PO, SC	12-24
	Rata	1-2	PO, SC	12-24
Morfina	Ratón	2-5	SC, IM	2-4
	Rata	2.5	SC, IM	2-4
	Cobaya	2.5	SC, IM	4
	Conejo	2.5	SC, IM	2-4
Nalbufina	Ratón	4-8	IM	4
	Rata	1-2	IM	3
	Conejo	1-2	IV	4-5
Paracetamol	Ratón	300	PO	4
	Rata	100-300	PO	4
Pentazocina	Ratón	10	SC	3-4
	Rata	10	SC	4
	Conejo	5	IV	2-4
Petidina	Ratón	10-20	SC, IM	2-3
	Rata	10-20	SC, IM	2-3
	Cobaya	10-20	SC, IM	2-3

	Conejo	10	SC, IM	2-3
<b>Bupivacaína/ Lidocaína</b>	Ratón	1-2/1-4	SC	
	Rata	1-2/1-4	SC	
	Cobaya	1-2/1-4	SC	
	Conejo	1-2/1-4	SC	
	Hámster	1-2/1-4	SC	

### 5.3 Analgésicos (neonatos)

ANALGÉSICO	ESPECIE	DOSIS (mg/kg)	VIA	DURACIÓN (horas)
<b>Buprenorfina</b>	Ratón	0.05-0.1	SC, IM	8-12
	Rata	0.01-0.05	SC, IM,	8-12
<b>Acetaminofeno (paracetamol) (AINES)</b>	Rata	1 gota	PO	4-6

### 5.4 Antagonistas opiáceos

- Naloxona: administrar con precaución Se utiliza para revertir los efectos adversos y de sedación de los opiáceos. Sólo debería utilizarse en casos de emergencia.

## 6- BIBLIOGRAFÍA

Morton B., Abbot D., Barclay R., Close B.S., Ewbank R., Heath M., Mattic S., Poole T., Seamer J., Southee J., Thompson A., Trusel B., West C and Jennings M. 1998. Extracción de sangre en los mamíferos y aves de laboratorio. Primer informe del grupo de Trabajo. 35, 1-41.

Morton B., Jennings M., Buckwell A., Ewbank R., Godfrey C., Holgate B., Inglis I., James R., Page C., Sharman I., Verschoyle R., Westall L. and Wilson A.B. 2001. Refining procedures for the administration of substances. BVA/FRAME/RSPCA/UFAW sobre refinamiento. ed. laboratory animals. 1-24.

Van Zutphen L.F.M., Baumans V., Beynen A.C. 1993. Principles of Laboratory Animal Science. A contribution to the humane use and care of animal and to the quality of experimental results. Ed. ELSEVIER.

## PROTOCOLO EUTANÁSICO

---

S.E.A. animalario omg	
EUTANASIA (rata, ratón, hámster y	Rev 10/2005
PNSEA#4	Página 1 de 4

### 1-PROPÓSITO

Utilizar métodos de sacrificio humanitarios y no dolorosos, seguros para el personal, de acción rápida, apropiados para la edad, especies y nº de individuos, irreversibles, y que no produzcan cambios en los órganos o tejidos que interfieran con los estudios.

Los requisitos para una muerte indolora, son en general, aquellos procedimientos que causan una rápida pérdida de conciencia seguida de parada cardíaca o respiratoria.

### 2. MÉTODOS

Para roedores de pequeña talla se recomiendan los siguientes métodos en general:

- Inhalación de CO<sub>2</sub>.
- Dislocación cervical.
- Sobredosis anestésica.

Las eutanasias deben ser llevadas a cabo en habitaciones donde no haya animales estabulados y en un lugar alejado del resto de animales experimentales

#### 2.1 EUTANASIA DE ANIMALES ADULTOS

##### 2.1.1. EUTANASIA POR INHALACIÓN DE CO<sub>2</sub>.

a) Especificaciones:

Queda prohibido el uso de hielo seco como fuente de dióxido de carbono, teniendo que proceder este de conducciones centralizadas o bombonas a presión, para que el flujo pueda ser regulado de forma precisa. Se debe asegurar la muerte del animal después de la exposición de CO<sub>2</sub> por un método físico (ej. exanguinación o dislocación cervical), o por

una exposición prolongada con CO<sub>2</sub> una vez observado el cese de la respiración (20 minutos en ratones menores de 7 días de edad y 5 minutos para ratones mayores de 7 días). También en neonatos 60-70 % de CO<sub>2</sub> durante un tiempo de exposición de 5 minutos mínimo.

La cámara de eutanasia debe cerrarse adecuadamente, ser transparente e introducir un número de animales que no exceda las recomendaciones europeas respecto al n° de animales/cm<sup>2</sup>

b) Procedimiento:

- Introducir los animales en la cámara de CO<sub>2</sub> (caja), y cerrar la tapa.
- Abrir la válvula reguladora de la salida del CO<sub>2</sub> (flujo aproximado 20% del volumen de la cámara por minuto).
- Los animales tardan unos 30-60 segundos en quedarse inmóviles. En caso de que tarden más de 60 segundos se debe incrementar el flujo de CO<sub>2</sub>.
- Esperar al menos 30 segundos después de la última respiración. Asegurar la muerte del animal mediante un método físico.

## 2.1.2. EUTANASIA POR DISLOCACIÓN CERVICAL

a) Especificaciones:

El uso de este método sin una previa sedación requiere de una justificación científica que demuestre que esta es esencial para el experimento a realizar debiendo ser realizada siempre por una persona con experiencia. Esta técnica no está recomendada en ratas de más de 125 g de peso ni en cobayos.

b) Procedimiento:

- Colocar el animal en decúbito prono sobre una superficie.
- Dejar que el animal se agarre en una superficie rugosa o en la rejilla de la jaula.
- Sujetar el animal colocando el dedo índice o una pinza en la región cervical ejerciendo presión y con la otra mano tirar de la cola o extremidades posteriores bruscamente para provocar la separación de las vértebras cervicales con el cráneo. Confirmar la separación de la vértebra cervical con el cráneo.

- Realizar la exanguinación o destrucción del cerebro para confirmar la muerte.

### 2.1.3 EUTANASIA POR DECAPITACIÓN

a) Especificaciones:

El uso de este método sin una previa sedación requiere de una justificación científica que demuestre que esta es esencial para el experimento a realizar. Debe ser realizada siempre por una persona técnicamente competente y con experiencia, asegurando el uso de una guillotina adecuada y en buen estado.

b) Procedimiento:

- Sujetar el animal de una forma segura e introducir la cabeza hasta exponer la región cervical a la zona de corte de la guillotina.
- Bajar la palanca de la guillotina con cuidado de no exponer los dedos.

### 2.1.4 EUTANASIA POR SOBREDOSIS ANESTESICA

a) Pentobarbital sódico:

- Utilizar una dosis de 100-150 mg/kg IV o IP. (como norma general el triple de la dosis anestésica). Se puede utilizar la inyección intracardiaca únicamente cuando el animal este totalmente anestesiado, ya que es muy doloroso.
- Asegurar la muerte mediante métodos físicos o por exanguinación

b) Agentes anestésicos inhalatorios: halotano, enflurano, isofluorano...

- Exponer al animal al anestésico al 5% hasta que se confirme la parada respiratoria y circulatoria.
- Asegurar la muerte mediante métodos físicos o por exanguinación.

---

## 2.2 EUTANASIA DE FETOS Y NEONATOS

### 2.2.1 FETOS.

a) Fetos hasta 14 días de gestación:

En este estadio el desarrollo neuronal es mínimo, por lo que la percepción del dolor es despreciable. La eutanasia de la madre o la extracción de los fetos provoca una muerte rápida de estos por una falta del aporte de sangre y por la inviabilidad de los mismos en este estadio de desarrollo.

b) Fetos de 15 días de gestación hasta el nacimiento:

En este estadio se ha descrito cierta percepción del dolor. Son aceptables los métodos de eutanasia por dislocación cervical, congelación rápida en nitrógeno líquido o decapitación. También se pueden utilizar anestésicos inyectables mientras que a esta edad los animales son poco sensibles a los anestésicos inhalatorios.

### 2.2.2 NEONATOS

a) Hasta los 14 días de edad:

Son válidos la eutanasia con anestésicos inyectables e inhalatorios y la dislocación cervical. En el caso de utilizar CO<sub>2</sub> se deben exponer durante un periodo mayor de tiempo que en el caso de animales adultos dada la mayor resistencia de estos animales a la hipoxia.

c) Mayores de 14 días:

Aplicar los métodos eutanásicos descritos para animales adultos. En el caso de utilizar CO<sub>2</sub> se deben exponer durante un periodo mayor de tiempo que en el caso de animales adultos dada la mayor resistencia de estos animales a la hipoxia

## 2.3 APÉNDICE: MÉTODOS RECOMENDADOS POR ESPECIES

Método	Roedores < 125 g	Roedores 125 g - 1 kg	Roedores 1 – 5 kg	Anfibios y peces
CO2	A	A (no en conejos)	A (no en conejos)	A
Sobredosis barbitúricos (IV)	A	A		A
Sobredosis barbitúricos (IP)	A	A	A	A
Anestesia y exanguinación	A	A	A	A
Anestesia y KCl intravenoso (1-2 meq/kg)	A	A	A	A
Anestesia y decapitación	A	A	AJC	A
Anestesia y dislocación cervical	A	A	NA	
Decapitación en animal despierto	AJC <sup>a</sup>	AJC	AJC	AJC
Dislocación cervical en animal despierto	AJC <sup>a</sup>	NA	NA	
Inmersión en benzocaína (2 g/L agua)				A

A: Aceptado

AJC: Aceptado con justificación científica

NA: No aceptado



