

Universidad
de Oviedo

Programa de doctorado: Investigación en
Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas

**“EFECTO DEL USO COMBINADO DE
ÁCIDO HIALURÓNICO,
PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y
CÉLULAS MADRE ADULTAS
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO EN
LA REPARACIÓN DE LOS DEFECTOS
OSTEOCONDRALES”**

Francisco Javier Cervero Suárez



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Efecto del uso combinado de ácido hialurónico, plasma rico en plaquetas y células madre mesenquimales de origen adiposo en la reparación de defectos osteocondrales.	Inglés: Effect of the combined use of hyaluronic acid, platelet-rich plasma and mesenchymal adipose derived stem cells in the repair of the <u>osteocondral</u> lesions.
2.- Autor	
Nombre: Francisco Javier <u>Cervero</u> Suárez	
Programa de Doctorado: Investigación en Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	
Órgano responsable: Universidad de Oviedo, Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas	

RESUMEN (en español)

El cartilago articular es un tejido que permite la trasmisión de fuerzas y el movimiento, y para ello presenta unas características entre las que destacan la baja celularidad y la ausencia de aporte sanguíneo, de terminaciones nerviosas y de drenaje linfático. Sin embargo, estas características son a la vez una limitación crucial para la reparación de los daños. En consecuencia, se han ido desarrollando en los últimos años diferentes terapias que tratan de mejorar la baja capacidad de regeneración que tiene el cartilago.

Teniendo en cuenta las limitaciones que presenta la artroplastia de rodilla, se han desarrollado diferentes técnicas quirúrgicas menos agresivas para tratar las afectaciones del cartilago aún incipientes. Los métodos reparativos (perforaciones y microfracturas) ayudan a la formación del nuevo tejido fibrocartilaginoso facilitando el acceso de los vasos y las células progenitoras capaces de producir la condrogénesis mediante la perforación del hueso subcondral mecánicamente. Los métodos reconstructivos tratan de llenar el defecto con tejido autólogo o aloinjertos (injertos osteocondrales, mosaicoplastia o aloinjertos). Por último, los métodos regenerativos aprovechan técnicas de bioingeniería (injerto de condrocitos autólogos, de células madre mesenquimales o de matrices celulares) para desarrollar un tejido de cartilago hialino que sustituya al dañado. Sin embargo, ninguna de estas técnicas ha resuelto los principales problemas que surgen a la hora de tratar este tipo de lesiones, y el tratamiento definitivo de la lesiones del cartilago articular está aún por venir.

Las técnicas regenerativas basadas en la bioingeniería tisular son probablemente las que más esperanzas están creando a la hora de solucionar el problema del daño articular. En el caso del cartilago articular, las células utilizadas son células madre mesenquimales. Pero dado que su aporte por sí solas produce un tejido fibrocartilaginoso sin las propiedades mecánicas y funcionales del cartilago hialino, su uso combinado con matrices busca conseguir un tejido de mejor calidad. Sin embargo, el uso y diseño de matrices para la reparación del cartilago da lugar a la aparición de otros problemas de difícil solución. Si a esto le sumamos el hecho de que los resultados clínicos no demuestran una evidencia superior de mejores resultados al compararla con otras técnicas reparativas, hay autores que sugieren que el uso de las matrices complica aún más la búsqueda de un tratamiento para la reparación articular.

Con el fin de sortear estos problemas, se han desarrollado técnicas que buscan promover la formación de un neocartilago resistente sin necesidad de implantar una matriz exógena. En esta línea, el uso de ácido hialurónico, factores de crecimiento de origen plaquetario y de células madre mesenquimales aplicados en forma de inyección intraarticular es un campo actual de estudio. Las principales ventajas de estos tratamientos es la facilidad para su aplicación, su bajo coste y la ausencia comorbilidad



en su obtención.

Dadas las evidencias que hacen pensar que la aplicación intraarticular por separado de factores de crecimiento de origen plaquetario, ácido hialurónico y células madre de origen mesenquimal tiene un efecto beneficioso en el tratamiento de la patología del cartilago articular, el propósito de nuestro estudio es tratar de dilucidar si la aplicación intraarticular combinada de estas sustancias puede tener un efecto sinérgico, y en consecuencia mejorar la capacidad regenerativa del propio cartilago lesionado. Asimismo, nos propusimos como objetivo secundario estudiar el efecto que producía la aplicación de estas sustancias individualmente y en diferentes combinaciones sobre el cartilago lesionado experimentalmente.

Para ello diseñamos un estudio experimental con 24 conejos de la raza Nueva Zelanda a los que se les realizarían dos lesiones osteocondrales experimentales en cada rodilla y posteriormente se les aplicarían las diferentes combinaciones de tratamientos que queríamos estudiar. La edad de los conejos en el momento de la intervención fue de 24 semanas para evitar que la inmadurez esquelética interfiriera en la reparación del defecto cartilaginoso. El tiempo de seguimiento de las lesiones fue de 2 y 4 semanas, divididos en dos grupos de 12 conejos cada uno.

Las lesiones del grupo control, al que no se le aplicó ninguna sustancia, presentaron en nuestro estudio la reacción cicatricial esperable en este tipo de lesiones del cartilago articular. La aplicación por separado de ácido hialurónico y plasma rico en plaquetas produjo una mejora de las características morfológicas del cartilago de reparación, y un aumento de su capacidad de regeneración. La aplicación combinada de ácido hialurónico y plasma rico en plaquetas tuvo un efecto sinérgico en la regeneración osteocondral al acelerar y mejorar el proceso reparativo, siendo el que mejor resultado global presentó al compararlo con el grupo control y con el resto de los grupos estudiados. Asimismo, observamos que para que la regeneración cartilaginosa fuera más eficaz y completa, era indispensable que antes se restableciera correctamente la arquitectura del hueso subcondral, de tal forma que los grupos que mostraron mejor respuesta reparadora presentaron un restablecimiento de la arquitectura del hueso subcondral más temprana y de mejor calidad morfológica. La aplicación intraarticular de células madre mesenquimales de origen adiposo, sin soporte matricial o depósito directo en la cavidad lesionada, no produjo un efecto acelerador en la reparación de las lesiones osteocondrales. Y finalmente, la aplicación combinada de ácido hialurónico, células madre y plasma rico en plaquetas no produjo un efecto sinérgico a la hora de promover la reparación de las lesiones osteocondrales.



RESUMEN (en Inglés)

Articular cartilage is the smooth glistening white and remarkably durable tissue that covers the articulating bone surfaces in our joints and supports the movement of them by greatly reducing friction between bones and distributing stress. Unfortunately, when cartilage is damaged due to injury or disease, it has a limited capacity to heal. Adult articular cartilage contains no blood supply, neural network or lymphatic drainage. As a result, partial-thickness defects that do not reach the **subchondral** bone stimulate only a transient induction of chondrocyte replication and matrix production in the area adjacent to the wound. An inflammatory response that is typical of wound healing in other tissues is only observed in full-thickness defects that penetrate the **subchondral** bone. In this case, the defect is exposed to bone marrow and cells are recruited to fill the defect with new tissue. However, complete restoration of the hyaline articular cartilage and the **subchondral** bone to a normal status is rarely seen, and, to date, no treatment has been **shown** to be predictable in this regard. Therefore, there is considerable interest in the development of techniques to regenerate or reconstruct damaged articular cartilage.

Total joint **arthroplasty** is the gold standard treatment in case of severe affectation of articular cartilage. However, the important aggression of this treatment and the limited life of the implants, make necessary the development of new therapies. Different surgical techniques have been developed to treat the early articular lesions. All of them have the aim of extend the period without the need of an **arthroplasty** surgery. Currently, there are three general strategies for restoration of the joint surface: enhancement of the intrinsic healing capacity of cartilage by osteochondral stimulation, replacement of the damaged articular cartilage with **osteochondral** plugs (**mosaicplasty**) or an **osteochondral** transplant and regeneration of the articular cartilage surface with the growth of new cartilage. However, no treatment has shown definitive success.

Novel approaches using adipose derived **mesenchymal** stem cells as an alternative cell source to patient derived chondrocytes are currently on trial. **Mesenchymal** stem cells have shown significant potential for **chondrogenesis** in animal models and have been used in several studies for **osteochondral** lesions repair combined with scaffolds. However, the use of scaffolds adds new and important questions to its clinical application and makes more complicated to carry out a definitive solution.

Platelet-rich plasma (PRP) is emerging as a biological therapy for the treatment of cartilage injuries and for intra-articular application to address knee pain. Basic science studies indicate that PRP stimulates cell proliferation and the production of cartilage matrix by chondrocytes and bone marrow derived **mesenchymal** stromal cells and increases the production of hyaluronic acid by **synoviocytes**. In preclinical animal model studies, PRP slows the progression of osteoarthritis, but there are mixed results after the use of PRP to facilitate the repair of **chondral** or **osteochondral** defects. Clinical studies indicate that PRP-bone marrow derived stromal cell constructs aid in the repair of **chondral** defects.

Exogenous hyaluronic acid (HA) has analgesic, **chondroprotective**, and disease-modifying effects. **Viscosupplements** of HA are useful in the treatment of osteoarthritis in conjunction with other methods of conservative treatment. Recent researches have shown that HA plays an important role in **chondrogenesis** and promotes cartilage reparation.

Given the evidences that mesenchymal adipose derived stem cells, platelet rich plasma and hyaluronic acid can help to the repair of the **osteochondral** lesions, we performed a research to elucidate if the intra-articular application of a combination of these three products could improve the result by synergy.



An experimental research was developed with 24 New Zealand rabbits, widely used to develop and evaluate tissue-engineering techniques for the reconstruction of damaged human articular cartilage. The animals were divided in two groups depending on the time of the sacrifice, 2 and 4 weeks. An experimental lesion was done in the condyles of the knee and, after that, a different combination of HA, PRP and mesenchymal stem cells was left in the articular cavity. After the sacrifice, the histological preparations were analyzed to determine the degree of reparation.

Compared all the groups, those that have been treated with PRP had the best results in terms of reconstruction of the articular cartilage surface. Moreover, the PRP and HA group had the best global results. The new cartilage formed had cartilage hyaline appearance, with plenty of chondrocytes with a basophilic pericellular matrix organized in the typical orientation of the articular cartilage. This new tissue formed was avascular and had a relative maturity, and the basal layer was in contact with a tidemark and new subcondral bone. The lateral edges of the new tissue had a correct integration. In relation to the group where mesenchymal stem cells, HA and PRP were added in conjunction, the combination had not synergic effects

SR. DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIRUGIA Y ESPECIALIDADES MEDICO-QUIRURGICAS

ÍNDICE

- 1.1 Biología y biomecánica del cartílago articular
 - 1.1.1 Introducción
 - 1.1.2 El cartílago y sus variedades
 - 1.1.3 Estructura histológica general del cartílago
 - 1.1.4 El cartílago articular
 - 1.1.5 Desarrollo embrionario del cartílago articular
 - 1.1.6 Estructura histológica del cartílago articular
 - 1.1.7 Bioquímica del cartílago articular
 - 1.1.8 Metabolismo del cartílago articular
 - 1.9 Fisiología del cartílago articular.

- 1.2 Lesión, cicatrización y reparación del cartílago articular.
 - 1.2.1 Introducción
 - 1.2.2 El daño del cartílago articular asociado al desgaste: la artrosis
 - 1.2.3 El daño del cartílago articular asociado a causas traumáticas
 - 1.2.4 La osteocondritis disecante
 - 1.2.5 La respuesta cicatricial
 - 1.2.6 Epidemiología de las lesiones condrales

- 1.3 Estado actual del tratamiento de las lesiones condrales
 - 1.3.1 Introducción
 - 1.3.2 Técnicas quirúrgicas paliativas
 - 1.3.2.1 Lavado articular
 - 1.3.2.2 Desbridamiento
 - 1.3.2.3 Estimulación de la reparación mediante el aporte de células pluripotenciales mesenquimales y fibroblastos procedentes del hueso subcondral y trabecular.

 - 1.3.3 Técnicas quirúrgicas regenerativas
 - 1.3.3.1 Aloinjertos osteocondrales
 - 1.3.3.2 Autoinjertos osteocondrales
 - 1.3.3.3 Injertos de periostio
 - 1.3.3.4 Injertos de pericondrio
 - 1.3.3.5 Cultivo de condrocitos
 - 1.3.3.6 Scaffolds

- 1.4 Nuevas perspectivas en el tratamiento de las lesiones osteocondrales
 - 1.4.1 Introducción
 - 1.4.2 Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica
 - 1.4.2.1 Las células troncales del adulto
 - 1.4.2.2 Las células troncales del adulto derivado del tejido adiposo.
 - 1.4.3 Aplicación de los factores de crecimiento de origen plaquetario en la regeneración de las lesiones del cartílago articular.
 - 1.4.4 Utilización terapéutica de las infiltraciones imtraarticulares en ácido hialurónico.

2 JUSTIFICACIÓN 59

- 2.1 Las patologías del cartílago articular.

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 63

- 3.1 Hipótesis y objetivos

4 MATERIAL Y MÉTODOS 67

- 4.1 El animal de experimentación.
- 4.2 Lugar de estabulamiento y de realización de las intervenciones quirúrgicas.
- 4.3 Planificación y ejecución quirúrgica
- 4.4 Obtención de los factores de crecimiento
- 4.5 Cultivo de las células madre
- 4.6 Descripción del ácido hialurónico utilizado
- 4.7 Distribución de los grupos
- 4.8 Sacrificio de los animales y obtención de las muestras
- 4.9 Preparación y estudio histológico de las muestras.

5 RESULTADOS	83
5.1	Introducción
5.2	Grupo I
5.3	Grupo II
5.4	Grupo III
5.5	Grupo IV
5.6	Grupo V
5.7	Grupo VI
5.8	Grupo VII
5.9	Grupo VIII
6 DISCUSIÓN	135
6.1	La reparación de las lesiones del cartílago
6.2	Uso de sustancias intraarticulares
6.3	Diseño del estudio
6.4	Resultados de la aplicación aislada de ácido hialurónico, plasma rico en plaquetas y células madre mesenquimales de origen adiposo.
6.5	Resultados de la aplicación combinada de ácido hialurónico, plasma rico en plaquetas y células madre mesenquimales de origen adiposo.
7 CONCLUSIONES	155
8 BIBLIOGRAFÍA	159

AGRADECIMIENTOS

A Daniel Hernández Vaquero, profesor titular de Traumatología y Cirugía Ortopédica de la Universidad de Oviedo y a Antonio Pérez-Caballer, profesor asociado del Área de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Francisco de Vitoria, codirectores de esta tesis, por su estímulo, apoyo y promoción para la realización de la misma.

A Francisco Collía, del Departamento de Anatomía e Histología Humanas de la Universidad de Salamanca, por sus recomendaciones y consejos para la elaboración de la misma, así como por su paciencia infinita a la hora de superar las dificultades que surgieron durante el proyecto y su insistente persistencia en que era posible llevarlo a cabo.

A Javier Iglesias, director del Banco de Tejidos Fundación San Francisco, y a Marta López y Jennifer Castro por su trabajo durante el proceso de realización de las intervenciones quirúrgicas a los animales de experimentación.

Al personal del Hospital Clínico Veterinario y de la Facultad de Veterinaria de Castilla y León por su amabilidad y profesionalidad.

A los compañeros de los Servicios de Traumatología y Cirugía Ortopédica del Hospital Universitario Infanta Elena de Madrid y del Hospital San Agustín de Avilés por su apoyo durante todo el proyecto.

A todo el grupo INIBSA y en especial a Ramón Roca, Arturo Ladaosa y Andrés Martínez por creer desde el principio en nuestro equipo de investigación y por su apoyo continuo en todos los ámbitos hasta la conclusión de este estudio.

A Adela Peláez, del Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-Quirúrgicas por su paciencia y guía por los innumerables trámites administrativos que fueron necesarios para presentar esta tesis.

A Laura González por su inestimable ayuda en el proceso de maquetación.

Y, finalmente, a mi familia y todos los buenos amigos que creyeron en mi proyecto y me acompañaron en las horas bajas.

1

INTRODUCCIÓN

1.1

BIOLOGIA Y BIOMECANICA DEL CARTILAGO ARTICULAR

1.1.1 INTRODUCCIÓN

Todos los movimientos que los animales vertebrados pueden desarrollar, son posibles gracias al diseño que tienen las articulaciones sinoviales. Las articulaciones sinoviales son estructuras anatómicas cuya función depende de distintos tejidos conectivos: huesos, ligamentos, tendones, sinoviales y cartílago articular. De todos esos tejidos, el cartílago articular es el tejido con mayor grado de superespecialización en cuanto a propiedades biomecánicas, pues a lo largo de la evolución ha tenido que centrarse en dos tareas antagónicas como son, por un lado, permitir con el deslizamiento de los huesos para provocar movimiento, y por otro, ser extremadamente resistente para poder transmitir las fuerzas que se provocan durante las diferentes actividades físicas. Para ello, su estructura presenta una capa superficial

lubrificada que permite el deslizamiento con un mínimo rozamiento, y una estructura subyacente tremendamente resistente que actúa como un colchón deformable que distribuye y atenúa los picos de fuerza producidos durante las distintas actividades físicas.

Para conseguir esta superespecialización, el cartílago articular presenta una composición y una estructura histológica común a todas las especies. En ella destaca una organización estratificada compuesta por pocos elementos celulares, abundantes fibras, entre las que destaca una proteína denominada colágeno, y una matriz extracelular que lo engloba todo dando volumen y consistencia al tejido.

El cartílago articular es, desde el punto de vista histológico una variedad del tejido conectivo junto con otros tipos de cartílago como son el cartílago elástico y el fibrocartílago.

1.1.2 EL CARTÍLAGO Y SUS VARIEDADES

El cartílago pertenece al grupo histológico del tejido conectivo, que es un tejido ampliamente distribuido por el organismo y una de cuyas funciones es la estructural. Dentro del tejido conectivo, en función de su composición, distinguimos tres tipos de cartílago: hialino, elástico y fibrocartílago. En la fase embrionaria, existe una cuarta variedad, el cartílago epiteloide, que deriva del mesénquima, y que madura hacia las otras tres variantes en función de su topografía y de las exigencias funcionales⁽¹¹⁾⁽¹²⁾.

El cartílago hialino es el más común de los cartílagos. La mayoría de los huesos del esqueleto axial y todos los huesos del esqueleto apendicular se forman a partir de la osificación de un molde de cartílago hialino durante el desarrollo embrionario. En el adulto, el cartílago hialino se encuentra presente en la superficies articulares de los huesos, denominándose también cartílago articular⁽¹³⁾.

El cartílago elástico y el fibrocartílago presentan predominancia de fibras elásticas y colágeno tipo I respectivamente en su composición, hallándose en aquellas regiones que necesiten elasticidad o gran resistencia a la tracción.

Todas estas variantes de cartílago tienen en común una estructura histológica general formada por células embebidas en una matriz extracelular.

1.1.3 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA GENERAL DEL CARTÍLAGO

Los elementos celulares que forman el cartílago pueden ser de tres tipos: condrocitos, condroblastos y condroclastos.

Los condrocitos son células muy especializadas en la producción y el mantenimiento de la matriz extracelular. Representan en torno al 10% del volumen tisular total, con variaciones dependiendo del tipo de cartílago y de la localización del mismo. Al conjunto formado por el condrocito y la zona de matriz extracelular que lo rodea, se le denomina condrona, y constituye la unidad anatómica, y funcional del cartílago. La forma, el tamaño y, probablemente, la actividad metabólica de los condrocitos es diferente en cada uno de los estratos del cartílago, si bien todos contienen las organelas necesarias para sintetizar cada uno de los componentes de la matriz extracelular. Tienen forma redondeada u ovalada. Contienen un Retículo Endoplásmico Rugoso abundante y Complejos de Golgi bien desarrollados. La superficie celular presenta cortas microvellosidades. El núcleo de estas células es redondeado u oval y contiene de uno a varios nucléolos.

Los condroblastos son células alargadas, fusiformes, con gran desarrollo de las organelas citoplasmáticas y con activa función secretora. Se los encuentra en los cartílagos en formación de los fetos y animales jóvenes, y en la capa interna del pericondrio de los cartílagos adultos. Son los precursores de los condrocitos.

Los condroclastos son células que aparecen durante la histogénesis del cartílago. Son gigantes y multinucleadas. Tienen función fagocítica, siendo las encargadas de destruir las células y la sustancia intercelular durante la condrogénesis.

Toda la masa de cartílago que no son células, está constituido por la matriz extracelular cartilaginosa (MEC). Su composición varía entre los diferentes tipos de cartílago y entre los estratos y zonas articulares en el caso del cartílago articular⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾. Diversos estudios biológicos y mecánicos han demostrado que la organización zonal tiene importancia funcional⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾. Además, sufre remodelación constantemente por la acción de diferentes factores anabólicos y catabólicos. La MEC está formada por agua (entre el 60 y el 80% del peso total) y macromoléculas de las que las más importantes son el colágeno y los proteoglicanos. Las macromoléculas estructurales (colágeno, proteoglicanos y proteínas no colágenas) representan el 20-40% del peso total. Su función es dar resistencia y cohesión al tejido, así como retener agua.

1.1.4 EL CARTÍLAGO ARTICULAR

Como ya hemos comentado anteriormente, el cartílago articular es una variante del cartílago hialino. El cartílago articular se encuentra recubriendo todos los huesos en aquellas zonas donde forman parte de una articulación, cubriendo la superficie susceptible de fricción durante el movimiento articular. Se trata de un tejido consistente, ligeramente depresible y elástico que presenta una superficie lisa y

de color blanco amarillento. Es avascular y su nutrición se lleva a cabo por difusión de los metabolitos desde los vasos sanguíneos que lo rodean.

El espesor del cartílago articular muestra considerables variaciones entre las diferentes especies. Incluso dentro del mismo animal, el grosor del mismo varía entre las diferentes articulaciones, incluso entre las diferentes áreas de una misma articulación. Asimismo, las articulaciones más congruentes disponen de un cartílago de menor espesor que las articulaciones menos congruentes. Existen estudios que confirman que existen diferentes estímulos externos que pueden modificar el grosor y el desarrollo del cartílago articular⁽¹⁸⁾, tales como la inmovilización⁽¹⁹⁾ y las cargas⁽²⁰⁾ a las que se ve sometido.

1.1.5 DESARROLLO EMBRIONARIO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago se desarrolla a partir del mesénquima, en la 5ª semana de vida fetal, cuando las células comienzan a formar acúmulos densos denominados centros de condricación. Estas células, llamadas condroblastos, a medida que se diferencian, empiezan a crecer y a producir una matriz extracelular metacromática. Con el paso de los días, los condroblastos se quedan aislados individualmente en unas cavidades inmersas en la matriz, que se denominan lagunas o condroplasmáticas, y poco a poco, van adquiriendo las propiedades definitivas de los condrocitos maduros.

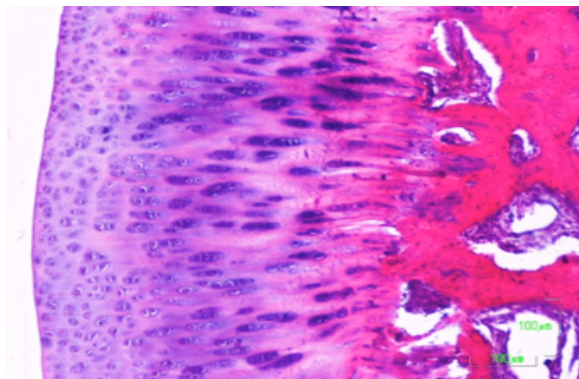
A partir del mesénquima también se desarrolla el pericondrio, que es una envoltura de tejido conectivo que rodeará al tejido cartilaginoso. El crecimiento del cartílago se efectúa de dos maneras: crecimiento intersticial, en donde el centro de condricación se hace por medio de divisiones mitóticas de las células ya diferenciadas (este tipo de crecimiento se produce sólo en el cartílago joven), y crecimiento aposicional, que se produce por diferenciación de las células mesenquimáticas a condrocitos. Durante toda la vida fetal (y a velocidad más reducida en el período de la infancia y la pubertad), se produce crecimiento aposicional constante desde el pericondrio, con aumento del tamaño de la masa del cartílago.

1.1.6 ESTRUCTURA HISTOLÓGICA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

La estructura histológica del cartílago articular se caracteriza por presentar cuatro zonas morfológicamente diferentes:

Zona superficial: también llamada zona de deslizamiento, es la capa más fina y superficial del cartílago. En su superficie existe una capa conocida como lamina splendens, acelular y compuesta fundamentalmente por haces planos de fibrillas de colágeno dispuestas al azar aparentemente⁽²¹⁾⁽²²⁾⁽²³⁾. En otra capa inmediatamente inferior a ésta, se encuentran condrocitos aplanados y con aspecto fusiforme que se orientan de manera paralela a la superficie articular, y que están intercalados entre fibras de colágeno apretadas. Sintetizan una matriz que tiene una

proporción relativamente alta de colágeno frente a proteoglicanos, y un mayor contenido de agua y fibronectina en comparación con otras zonas. Las fibras de colágeno de la zona también se orientan para formar una delgada capa paralela a la superficie articular⁽²⁴⁾⁽²⁵⁾. Las fibras proporcionan a la zona superficial una extrema rigidez a las fuerzas de tensión, que puede llegar a ser varias veces el módulo de compresión del tejido. La capa superficial contribuye enormemente a la capacidad de sustentación de las cargas por el cartílago, al evitar la pérdida de líquido intersticial manteniendo el líquido presurizado. La gran resistencia en tensión de esta capa también sirve para proteger el tejido subyacente de las fuerzas de indentación.



Cartílago articular. Se observan las distintas capas del cartílago, así como el hueso subcondral y la "tidemark" o línea limitante. Obsérvese asimismo la disposición variable de los condrocitos y la matriz extracelular del cartílago. Nótese la disposición del tejido conectivo y los vasos sanguíneos dispuestos entre las trabéculas el hueso subcondral

Zona de transición: tiene las propiedades a medio camino entre la zona radial y la zona superficial. Los condrocitos son de pequeño tamaño

y tienen una forma esférica. Presentan más retículo endoplasmático, complejo de Golgi y mitocondrias, y algún filamento intracitoplasmático, lo que indica una elevación de la función de síntesis de la matriz. Bioquímicamente, la zona de transición tiene un mayor contenido de proteoglicanos y un porcentaje menor de agua y colágeno que la zona superficial. Sus fibras están orientadas formando arcos que recuerdan a la disposición de los de las catedrales góticas.

Zona radial: ocupa el 95% del volumen del cartílago articular. Esta capa contiene las fibras colágenas de mayor diámetro, la mayor concentración de proteoglicanos y la concentración de agua más baja, lo que proporciona al cartílago sus propiedades ante las fuerzas de compresión. Las fibras de colágeno de la zona radial profunda muestran una disposición perpendicular al hueso subcondral. Estas fibras proporcionan un anclaje al cartílago calcificado subyacente y a las capas de hueso subcondral. Las células de la zona radial son las más grandes de todas y las más activas en cuanto a la síntesis. Los condrocitos en esta zona a menudo se orientan en un patrón columnar perpendicular a la superficie articular encuentran rodeadas de una matriz cartilaginosa incrustada de cristales de hidroxapatita. La franja de la marea (tidemark) es una línea ondulada y eosinófila que marca la transición entre la zona profunda y la zona calcificada, estando el grosor de la misma en relación directa con las cargas que tiene que soportar el cartílago⁽²⁶⁾.

El tejido subarticular mineralizado que se extiende desde la línea de marea hasta el inicio de la médula ósea se conoce como hueso subcondral. Sus funciones principales consisten en dar soporte al cartílago articular, absorber y distribuir las cargas mecánicas que éste le trasmite y nutrir las capas profundas del cartílago hialino, especialmente durante el crecimiento⁽²⁷⁾. Incluye al menos tres estructuras mineralizadas bien diferenciadas que desde la superficie a la profundidad son: el cartílago calcificado, un hueso subcondral que recuerda la cortical de los huesos, y el hueso subcondral trabecular. El cartílago calcificado, junto con el hueso cortical subcondral, son conocidos como la placa subcondral⁽²⁷⁾. El espesor del hueso subcondral varía en función de la especie animal, la edad, la masa corporal, la localización y el tipo de articulación. Se encuentra muy vascularizado, aunque la mayoría de los vasos no alcanzan el cartílago calcificado, y excepto en la enfermedad, ninguno penetra en el cartílago hialino⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾⁽³⁰⁾.

1.1.7 BIOQUÍMICA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

La bioquímica del cartílago articular tiene su origen en las moléculas que lo contienen, las cuales son principalmente colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas y proteasas.

Colágeno: el colágeno es la proteína más ubicua y abundante del mundo animal, constituyendo alrededor de un tercio del total de

las proteínas corporales⁽³¹⁾. Aparece prácticamente en todos los tejidos, pero su presencia es más numerosa en los tejidos conjuntivos fibrosos. En el caso del cartílago, es una trama fibrilar que le aporta su resistencia a la tensión⁽³²⁾. Se encuentra muy concentrada en la zona tangencial superficial, aunque su distribución es más uniforme en el resto del cartílago. Se trata de una proteína formada por tres cadenas polipeptídicas (cadenas alfa) que conforman una hélice levógira mediante puentes de hidrógeno. En cada una de las tres cadenas hay una secuencia tripeptídica característica (gly-x-y). Los aminoácidos prolina e hidroxiprolina son los más frecuentes, conteniendo también hidroxiprolina, hidroxilixina e hidroxilisina glicosilada. En cada molécula de colágeno, las tres cadenas alfa se enroscan entre sí formando una estructura de soga que se estabiliza por puentes de hidrógeno gracias a la glicina. Por otra parte, la hidroxilisina participa en la formación del ensamblaje fibrilar del colágeno a través de uniones covalentes. Su síntesis ocurre a partir del procolágeno fabricado por los condrocitos. Las cadenas alfa pasan al Retículo Endoplasmático Rugoso y al Aparato de Golgi, donde se lleva a cabo la glicosilación de algunos radicales para formar la triple hélice. Finalmente, mediante vesículas de secreción, el colágeno es expulsado a la matriz extracelular.

Existen diferentes tipos de colágeno dependiendo de los aminoácidos x-y de cada cadena alfa, habiéndose establecido diversos tipos y familias de colágeno dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas⁽³³⁾.

Cada uno de ellos es una especie diferente desde el punto de vista genético, presumiblemente desarrollada para cumplir funciones mecánicas específicas de la matriz extracelular⁽³¹⁾.

En el cartílago articular hay varios tipos de colágeno⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾, siendo el más frecuente es el tipo II, el cuál está formado por tres cadenas alfa iguales entre sí. Representa el 90-95 % del total, aunque también contiene los tipos I, V, VI, IX, X y XI. En general, la función principal del colágeno en el cartílago articular es proporcional al tejido sus propiedades tensiles e inmovilizar los proteoglicanos de la MEC, aunque los diferentes tipos de colágeno presentes en el cartílago articular parece ser que tienen funciones específicas en función de su diferente estructura tridimensional.

Proteoglicanos: son macromoléculas complejas que están formadas por un núcleo proteico con varios dominios globulares, al que se unen largas cadenas de polisacáridos denominados glicosaminoglicanos. Estos, están formados por una cadena larga, no ramificada, de unidades repetidas de polisacáridos. El 80-90% de los proteoglicanos del cartílago son grandes²⁶, y se denominan agreganos debido a sus propiedades de agregación. Están formados por un centro proteico con 3 dominios globulares (G1, G2 y G3) al que se adhieren cadenas de condroitín sulfato y queratán sulfato. El extremo N-terminal del dominio G1 se une al hialuronato a través de una proteína de unión específica. Los principales agreganos son el condroitín sulfato

en sus distintas isoformas (principalmente el condroitín-6-sulfato), el queratán sulfato y el dermatán sulfato.

El ácido hialurónico es un glicosaminoglicano, pero se diferencia de los demás en que no está sulfatado, no está ramificado y no posee proteína central. Esto hace que se unan a él los otros proteoglicanos, formando grandes macromoléculas que permanecen inmobilizadas dentro de la matriz del cartílago.

Existen otros proteoglicanos de menor tamaño en el cartílago articular, como son el biglicano, la decorina y la fibromodulina. Actúan interactuando con el colágeno II, organizando y estabilizando el entramado.

La síntesis de los proteoglicanos se realiza en los condrocitos, en un proceso similar al del colágeno.

Glicoproteínas: algunas son transductores transmembrana, actuando como receptores para moléculas de adhesión, factores de crecimiento o interleucinas. Otras son extracelulares y tienen funciones de unión y ensamblaje entre los diferentes componentes de la MEC y los condrocitos. En general, todas están constituidas por una base proteica a la que se unen algunos mono o oligosacáridos. Las principales glicoproteínas estructurales son la ancorina CII, la fibronectina, la laminina y, sobre todo, las integrinas⁽¹⁴⁾.

La ancorina CII se encuentra en la superficie del condrocito, y tiene la capacidad de ligar el

colágeno para anclar las células a las fibras de la matriz⁽³⁷⁾.

La fibronectina también se encuentra en la superficie de los condrocitos, y tiene afinidad para unirse a la fibrina, el colágeno II, la heparina y el ácido hialurónico⁽³⁸⁾.

Otras proteínas del mismo tipo son la laminina y la proteína oligomérica del cartílago, esta última presente directamente en la matriz extracelular cerca del condrocito⁽³⁹⁾.

Proteasas: son una serie de enzimas responsables de la degradación y renovación permanente del tejido cartilaginoso. Actúan tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Existen tres grupos principales de proteasas: metaloproteasas, serinaproteasas y captasinas. La metaloproteasas son las que más importancia tienen para el metabolismo del cartílago, pues son las encargadas de degradar proteoglicanos, glicoproteínas y algunos tipos de colágeno⁽⁴⁰⁾. De forma general, las proteasas pueden ser sintetizadas por los condrocitos, o bien fuera del tejido cartilaginoso. Primariamente, llegan a la matriz extracelular como proenzimas, necesitando de activación para poder ejercer su acción. Tras su activación, las proteasas son bloqueadas de forma irreversible por factores sintetizados por el propio condrocito que reciben el nombre de TIMPs (Inhibidores Tisulares de las Metaloproteasas)⁽⁴¹⁾. En condiciones fisiológicas, los niveles de estos inhibidores han de estar elevados en el cartílago articular⁽⁴²⁾.

1.1.8 METABOLISMO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

El cartílago articular, de forma global, presenta una baja actividad metabólica debido a su escasa celularidad. Sin embargo, los condrocitos presentan una actividad metabólica importante al ser los encargados de mantener la homeostasis de todo el tejido. Para llevar a cabo estas funciones, están sometidos a una serie de estímulos inhibidores o activadores que han de llegar junto con los nutrientes a la superficie de la membrana celular para producir una respuesta en la célula.

La llegada de los nutrientes y de las moléculas de mediación de respuestas se realiza a partir del líquido sinovial y también por difusión desde el estrato óseo subyacente⁽⁴³⁾. Tantas dificultades para el transporte de nutrientes y oxígeno a las células, hacen que el metabolismo de los condrocitos sea básicamente anaerobio.

El paso de los nutrientes a través de la matriz extracelular depende de la concentración, composición y organización de los proteoglicanos grandes, así como del tamaño y composición y la carga eléctrica de las moléculas que deben difundir. Además de la difusión, existe otro mecanismo que contribuye a la llegada de nutrientes. Se trata de la convección, que es el flujo del líquido intersticial a través de la matriz porosa cuando el cartílago se somete a carga.

Los condrocitos son células glucolíticas (metabolizan la glucosa en lactato mediante glicólisis anaerobia). Están capacitados para ajustar el metabolismo celular según las concentraciones de glucosa y de oxígeno en la matriz extracelu-

lar. En consecuencia, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones de baja presión de oxígeno y déficit de nutrientes. Así pueden expresar diferentes isoformas de la familia GLUT/SLCA de transportadores de glucosa según la presión de oxígeno, el metabolismo hormonal o la presencia de citoquinas proinflamatorias⁽⁴⁴⁾.

Sin embargo, los condrocitos también pueden usar la vía oxidativa aerobia para producir energía, llevada a cabo en las mitocondrias presentes en su citoplasma. Por último, existe una tercera vía para obtener energía a partir de la glucosa, la vía de los pentosafosfatos. En esta vía se sintetizan, a partir de la glucosa, la ribosa (necesaria para la síntesis de nucleótidos) y NADPH (coenzima propio del metabolismo anaeróbico) Aparte de glucosa, los condrocitos también requieren aminoácidos para su metabolismo. Es el caso de la glutamina, que es necesaria como donante de grupos amino para la síntesis de Glicosaminoglicanos⁽⁴⁵⁾.

1.1.9 FISIOLÓGÍA DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Se puede considerar que el papel primordial del cartílago articular es la interposición entre dos estructuras resistentes, con el objetivo de disipar las fuerzas que pasan a través de una articulación. Y en la mayoría de los casos, tendrá además la función añadida de contribuir al movimiento eficiente de dicha articulación. Y mientras realiza estas atribuciones, el cartílago humano estará sometido a cargas que sobrepasan en cinco veces el peso corporal durante la realización de actividades normales de la vida diaria. Para poder soportar estas cargas, presenta unas propiedades mecánicas especiales.

Las propiedades mecánicas del cartílago articular dependen de la composición y de la organización estructural de la matriz extracelular. Al igual que la mayoría de los tejidos biológicos, el cartílago muestra un comportamiento anisotrópico, lo que significa que las propiedades mecánicas dependen de la fuerza aplicada, de la dirección y de la orientación. La mayor parte de este comportamiento se atribuye a su naturaleza bifásica: el cartílago está compuesto por una zona porosa permeable (proteoglicanos y colágeno) y el relleno de los poros por líquido intersticial. Las propiedades del cartílago se relacionan con el movimiento del líquido a través de esa red de poros. Esto se conoce como permeabilidad o capacidad de fluir el agua a través del cartílago cuando se aplica un gradiente de presión. Los experimentos de permeabilidad han demostrado que existe una relación directa entre la permeabilidad y el contenido de agua, y una relación inversa entre la permeabilidad y el contenido de proteoglicanos⁽³⁶⁾.

Otra propiedad mecánica característica del cartílago es la viscoelasticidad o capacidad del cartílago para deformarse cuando se aplica una carga constante en relación al tiempo que actúa la carga. Los mecanismos responsables de esta propiedad pueden ser dependientes o independientes del flujo. En el primer caso es el movimiento del flujo intersticial de agua

y la presurización de éste el que permite y determina la cantidad de viscoelasticidad. En el segundo caso es la propia arquitectura del entramado de colágeno la que influye en la viscoelasticidad mediante el estiramiento de sus fibras al aplicar una carga⁽⁴⁷⁾.

En cuanto a las propiedades mecánicas de cartílago relacionadas con la capacidad de deslizamiento, este posee un escaso coeficiente de fricción (relación entre la fuerza necesaria para desplazar una sobre otra dos superficies y la fuerza aplicada). Ese bajo coeficiente viene dado por las características del líquido sinovial, presente en la cavidad articular, y por la propia porosidad del cartílago articular para el agua y los solutos de bajo peso molecular. Al ser expulsados de las regiones sometidas a una carga, se desplazan a zonas vecinas y trasudan hacia la superficie por debajo y por delante del área de presión, mientras que por detrás de la misma, se reabsorben. Este proceso se denomina lubricación rezumante. Por último, señalar que en el líquido sinovial se ha aislado una lubricina⁽⁴⁸⁾ que se adhiere a cada una de las superficies articulares opuestas, manteniéndolas separadas entre ellas gracias a una fuerza de repulsión intermolecular recíproca, capaz de resistir altas presiones: es el mecanismo de lubricación límite.

1.2

LESION, CICATRIZACIÓN Y REPARACIÓN DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

1.2.1 INTRODUCCIÓN

El proceso de destrucción del cartílago articular está originado por un desequilibrio de la homeostasis del mismo. En condiciones normales, las rutas anabólicas y catabólicas que dirigen la síntesis y el mantenimiento de la MEC se encuentran en equilibrio. La ruptura de este equilibrio debido a alteraciones de origen genético, mecánico o bioquímico conduce hacia un proceso de destrucción que lleva siempre asociada la inducción de factores de inflamación que desempeñan un papel central dentro del mismo proceso destructivo⁽⁴⁹⁾⁽⁵⁰⁾⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾.

Los procesos que pueden alterar el equilibrio del cartílago sano son muy numerosos, pero en todos los casos existe un mecanismo inicial que compromete la estructura de la MEC, las células o ambos. Este daño puede ocurrir de manera lenta y progresiva o, por el contrario, ocurrir de forma aguda. El primer caso viene dado por el desgaste que conlleva su uso, y es el que ocurre en la artrosis. El segundo caso suele ser consecuencia de traumatismos articulares. Existe un tercer tipo de lesiones del cartílago articular en el que la causa hay que buscarla en el hueso subcondral (necrosis avascular y osteocondritis disecante)⁽⁵⁴⁾.

1.2.2 EL DAÑO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR ASOCIADO AL DESGASTE: LA ARTROSIS

Este tipo de daño articular puede ocurrir sin factores predisponentes, simplemente como parte del proceso fisiológico involutivo que ocurre en todos los tejidos de los organismos con el envejecimiento. Sin embargo, hay factores predisponentes externos que pueden acelerar este proceso, tales como la ausencia de meniscos o las desalineaciones axiales, que provocaran sobrecarga del cartílago articular y desgaste precoz del mismo; e internos de tipo genético⁽⁵⁵⁾.

El desgaste mecánico provoca la pérdida de pequeñas partículas desde las superficies articulares y ocurre en cualquier articulación, sea cual sea su localización. Este desgaste viene dado por un componente mecánico, a través de mecanismos de desgaste interfacial y de fatiga, y por el impacto de la carga. Sin embargo, también existe un proceso de base biológica.

El desgaste interfacial está causado por el contacto de las superficies de soporte entre sí, a través de dos mecanismos: la abrasión y la adhesión. Hay datos que sugieren que este desgaste ocurre en articulaciones con un cartílago dañado o patológico.

El desgaste por fatiga es el resultado de la acumulación de presiones repetidas que se traducen en un daño microscópico. Esta fatiga puede aparecer tanto por la aplicación breve de cargas elevadas, como por la aplicación prolongada de cargas ligeras. Con la aplicación de cargas el

líquido de la MEC se encuentra en un flujo continuo de entrada y salida del cartílago articular. Dado que las moléculas estructurales están sometidas constantemente a la presión, el daño por presión puede producirse en los componentes de la matriz debido a la acumulación de estas presiones. Otro posible mecanismo de lesión de la matriz es secundario al arrastre de los proteoglucanos ocasionado por el flujo repetido de líquido tisular a través de la MEC⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾.

Por otra parte, el papel del hueso subcondral durante el proceso artrósico ha captado la atención de los investigadores durante los últimos años al poder tratarse de una llave para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para tratar la artrosis. Desde hace tiempo se sabe que en las fases iniciales de la artrosis el hueso subcondral sufre una remodelación, especialmente en aquellas áreas donde aparece el daño del cartílago, apareciendo una proliferación ósea con un aumento de grosor de esas áreas subcondrales.

Además, aparecen otros procesos patológicos tales como microedemas, microgrietas y microsangrados⁽⁵⁶⁾. Un estudio reciente en animales de experimentación pone de relevancia que el hueso subcondral se va volviendo frágil antes de que aparezca la degeneración establecida del cartílago⁽⁵⁷⁾. Por tanto, una vez que la osteoartritis es visible no hay duda de que el hueso subcondral ha jugado ya un papel importante. Numerosas investigaciones actuales que tratan de entender como es exactamente esta relación, pues su conocimiento podría abrir nuevas vías diagnósticas y terapéuticas para la artrosis.

1.2.3 EL DAÑO DEL CARTÍLAGO ARTICULAR ASOCIADO A LESIONES TRAUMÁTICAS

Son aquellas lesiones que aparecen a consecuencia de traumatismos articulares. Según el grado de afectación del tejido, se pueden clasificar como microscópicas, fisuras condrales o fracturas osteocondrales.

Las lesiones microscópicas pueden ser causadas por un único y leve impacto, o por reiteración de impactos mínimos. El daño microscópico de los condrocitos y de la matriz extracelular, provoca disminución de los proteoglicanos y aumenta la rigidez y permeabilidad condral. Si el traumatismo no se repite de manera continuada, los condrocitos pueden ser capaces de reparar la lesión al ser ésta de poca importancia. No se puede diagnosticar en la práctica clínica.

Las fisuras condrales son producidas por traumatismos de mayor energía. Se afecta macroscópicamente el cartílago en forma de fisura o fragmento libre condral, pero la lesión no afecta al hueso subcondral. La ausencia de un sistema vascular limita la respuesta inflamatoria y reparadora del cartílago, así como la emigración de nuevas células pluripotenciales o fagocíticas hasta el área de la cicatrización. Además los condrocitos están atrapados en una densa red de colágeno y proteoglicanos, que restringe su capacidad para migrar desde el cartílago sano adyacente hasta la zona lesionada⁽⁵⁸⁾.

Las fracturas osteocondrales ocasionan la alteración de todas las capas del cartílago articular, con penetra-

ción hasta el hueso subcondral. En este caso, se afectan los vasos presentes en el hueso subcondral, y en consecuencia habrá sangrado, activándose una respuesta inflamatoria. Las plaquetas presentes en el coágulo liberan mediadores vasoactivos y factores de crecimiento que contribuyen a que se desencadenen los procesos de reparación⁽⁵⁹⁾⁽⁶⁰⁾.

1.2.4 LA OSTEOCONDritis DISECANTE

Se trata de una lesión localizada del cartílago articular que afecta a la superficie articular y se acompaña de la separación de un fragmento de cartílago y hueso subcondral. Se presenta con más frecuencia en las articulaciones de carga, como son la rodilla y el tobillo⁽⁶¹⁾. Existen diferentes teorías para tratar de explicar el origen, pero ninguna ha sido aceptada de forma universal. Así, se ha hablado de la posible implicación de traumatismos repetidos o fenómenos isquémicos por defectos estructurales del hueso subcondral. Algunos autores han propuesto que la osteocondritis disecante en pacientes jóvenes es consecuencia de anomalías de la osificación. En todo caso, numerosos estudios han documentado la existencia de una predisposición genética a la hora de padecer este trastorno⁽⁶²⁾⁽⁶³⁾.

La historia natural de este trastorno depende la edad del paciente en el momento de la aparición. Las lesiones que aparecen en niños, en los que las fisis aún permanecen abiertas, generalmente consolidan sin consecuencias. Pero aquellas lesiones que aparecen en la vida adulta, raramente consolidan sin tratamiento quirúrgico. En el caso de que la lesión no

cure, probablemente progresará hacia una artrosis establecida, y si ocurre en la superficie de carga, aparecerán lesiones espejo en la superficie articular contraria.

La osteocondritis disecante debe de ser reparada siempre que sea posible, pero siempre teniendo en cuenta que las lesiones estables en adolescentes con la fisis abierta pueden curar con tratamiento no quirúrgico⁽⁶⁴⁾. En el caso de que no sea este el caso, las lesiones estables y no desplazadas pueden ser tratadas con perforaciones con el objetivo de estimular la consolidación de la porción ósea. Si la lesión es inestable o está desplazada, es mejor tratarla mediante fijación con tornillos de compresión. Pueden utilizarse para ello tanto tornillos reabsorbibles como metálicos, pero siempre han de quedar enterrados en el cartílago articular con el fin de no dañar la superficie articular de la meseta tibial. La exéresis del fragmento sin reparación da buen resultado a corto plazo en cuanto a disminución del dolor, pero tiene altas tasas de artrosis a medio-largo plazo, por lo que debe de reservarse para lesiones muy pequeñas o para cuando no es posible aplicar ninguna de las técnicas antes descritas.

1.2.5 LA RESPUESTA CICATRICIAL

Uno de los factores más cruciales que determina el tipo de respuesta que se pone en marcha tras una lesión del cartílago articular es la profundidad de la misma⁽⁶⁵⁾. Las lesiones de grosor parcial generalizadas habitualmente se encuentran en las artritis inflamatorias, y provocan la muerte superficial de condrocitos y la disminución de los proteoglicanos. Siempre

que no exista una destrucción pronunciada de la matriz estructural, los condrocitos pueden dividirse y acelerar la velocidad de síntesis, de forma que se restablezcan los proteoglicanos. En la artritis destructiva, al ser la agresión continua, la reparación es incompleta. Sin embargo, a pesar de esta lesión permanente, los condrocitos siguen dividiéndose y producen colágeno y proteoglicanos a velocidades mayores.

En las lesiones superficiales y localizadas, los condrocitos del área adyacente mueren y se crea un defecto cuneiforme en la matriz. Muchas veces se ve proliferar a los condrocitos de las áreas vecinas que no han muerto, y formar conglomerados celulares. Sin embargo, estos no emigran hacia el defecto. En estos tipos de lesión no se observa una respuesta inflamatoria. El aumento de la matriz sintetizada es transitorio, y normalmente no basta para llenar el defecto. Diversos trabajos han demostrado que las lesiones aisladas de grosor parcial no muestran una cicatrización apreciable con el tiempo pero, no obstante, parecen estables y rara vez progresan hasta una artrosis.

Si la lesión es de espesor completo, la irrigación vascular del hueso subcondral accede al foco de lesión. En consecuencia, se desencadena una respuesta inflamatoria y participan las células madre de la médula y las de la matriz ósea. Estos defectos se llenan en principio con un coágulo de fibrina y permiten la infiltración por células mesenquimatosas indiferenciadas de la médula. Estas células acaban diferenciándose siguiendo la línea de condroblastos. La porción más profunda de la lesión se reconstruye con hueso y se restablece la lámina subcondral. Sin embargo, el defecto se llena de fibrocartílago, cuyas

propiedades biomecánicas son inferiores a las del cartílago articular. Este tejido tiene una concentración mayor de colágeno tipo I, y menos proteoglicanos que el cartílago articular, y no se regeneran las capas de colágeno tangenciales de la zona superficial. Los estudios a largo plazo han demostrado que este cartílago sufre un proceso de fibrilación y degeneración⁽⁶⁶⁾.

Pero, aparte de la profundidad de la lesión, existen otros factores que también pueden modular la respuesta reparadora del cartílago ante la lesión. El movimiento pasivo continuo aumenta la capacidad de cicatrización de los defectos de cartílago de grosor completo, con alguna mejora de las cualidades morfológicas e histoquímicas del nuevo cartílago formado. Los condrocitos procedentes de animales con un esqueleto inmaduro también han exhibido una mayor capacidad de proliferación y síntesis de proteoglicanos. Y por último, los defectos menores de 3 mm parece ser que tienen mayores posibilidades de cicatrización⁽⁶⁷⁾.

1.2.6 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS LESIONES CONDRALES

Las patologías del cartílago articular tienen una amplia repercusión en la población mundial tanto por su alta prevalencia como por la merma de la calidad de vida que suponen. En el caso de las lesiones degenerativas, se considera que la osteoartritis es la enfermedad articular más común en Estados Unidos, afectando a veintisiete millones de personas⁽⁶⁸⁾. En el caso de la rodilla, se estima que afecta al 10% de los hombres y al 13%

de las mujeres por encima de los sesenta años⁽⁶⁹⁾. También en Estados Unidos, la patología artrósica es la segunda causa de limitación laboral en mayores de cincuenta años tras la cardiopatía isquémica⁽⁷⁰⁾, y desde el punto de vista económico, supone un coste anual en este país de unos sesenta billones de dólares al año⁽⁷¹⁾. En el caso de las lesiones osteocondrales, pueden llegar a encontrarse hasta en un 10-12% de la población⁽⁷²⁾, con la gravedad añadida que suele afectar a personas jóvenes y que muchas de estas lesiones desembocan en artrosis.

Además, dada la estrecha relación que existe entre la patología del cartílago y el incremento de la esperanza de vida y de la obesidad, el número de gente afectada por esta patología tiende a aumentar continuamente.

Por otra parte, las lesiones cartilagosas postraumáticas o por patología del hueso subcondral (como en el caso de la osteocondritis disecante o la osteonecrosis) se detectan en más del 10-20 % de la población. Widuchowsky, en un estudio de más de cinco mil artroscopias de rodilla, encuentra lesiones cartilagosas en el 57% de los casos⁽⁷³⁾.

La alta prevalencia de las lesiones cartilagosas, así como los múltiples estudios sobre sus causas y tratamientos, quedan reflejados en el ingente número de publicaciones relacionadas con el tema. Si hacemos una búsqueda bibliográfica en PUBMED bajo los criterios de búsqueda "articular cartilage injuries" nos saldrán 4851 resultados desde 1948 hasta la actualidad.

1.3

ESTADO ACTUAL DEL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES CONDRALES

1.3.1 INTRODUCCIÓN

En general, se recomienda que antes de plantearse cualquier tipo de intervención quirúrgica, se lleve a cabo un tratamiento mediante terapia física seguido de un periodo de al menos tres meses de modificación de la actividad física y pérdida de peso. Esto, es especialmente importante para el caso de lesiones femoropatelares. La terapia rehabilitadora debe de incluir ejercicios centrados en el fortalecimiento de la musculatura cuadricepsital.

En los pacientes ancianos, o aquellos a los que previsiblemente en pocos años se les va a implantar una prótesis de rodilla, la inyección intrarticular de es-

teroides o de viscosuplementadores puede ser una opción.

La cirugía solamente se considerará en el caso de lesiones de espesor completo en las que se haya llevado a cabo un tratamiento ortopédico previo y no haya habido una remisión en la clínica dolorosa, o bien si existe una clínica de derrames de repetición o bloqueos articulares. En todo caso, los pacientes deben de entender que tras la cirugía también precisarán rehabilitación y que tardarán un tiempo considerable en poder volver a sus actividades previas después de la reparación quirúrgica⁽⁷⁴⁾.

Entre las contraindicaciones para el tratamiento quirúrgico se incluyen los

pacientes fumadores, la obesidad con un índice de masa corporal mayor de 35 kg/m² y las rodillas con problemas de alineación axial o con deficiencias meniscales. Por otra parte, una disminución mayor del 50% del espacio interarticular se considera una contraindicación, a excepción de pacientes muy jóvenes con dolor de rodilla intolerable refractario a tratamientos no quirúrgicos⁽⁷⁵⁾.

A continuación se describen las diferentes técnicas quirúrgicas que se emplean en el tratamiento de las lesiones osteocondrales.

1.3.2 TÉCNICAS QUIRÚRGICAS PALIATIVAS

1.3.2.1 Lavado articular

Consiste en realizar una limpieza quirúrgica del líquido articular mediante la utilización de suero de lavado. Generalmente se lleva a cabo mediante la realización de una artroscopia, en la que el líquido articular es evacuado y sustituido por la solución salina de irrigación. La eliminación del líquido articular permite evacuar las citoquinas proinflamatorias (IL1, TNF,...) así como los posibles fragmentos libres de cartílago que tienen un papel irritante⁽⁷⁶⁾⁽⁷⁷⁾⁽⁷⁸⁾. Lógicamente, el efecto es solo temporal, y la patología subyacente no se resuelve. Los pacientes mayores pueden beneficiarse temporalmente, pero los más jóvenes no se benefician.

1.3.2.2 Desbridamiento

El desbridamiento artroscópico está dirigido a eliminar los síntomas mecánicos, desde colgajos libres a cuerpos libres y cartílago degenerado hasta sinovitis hipertrófica y osteofitos que interfieren en la función articular.

El alivio sintomático inicialmente es bueno, pero los resultados buenos disminuyen progresivamente con el tiempo, pues no resuelve la causa subyacente de la lesión⁽⁷⁹⁾.

Para la realización del desbridamiento de la lesión puede realizarse mediante el uso de pinzas artroscópicas, fresa motorizada o bien mediante radiofrecuencia. La radiofrecuencia para el tratamiento de las lesiones condrales comienza a generalizarse a partir de los años noventa⁽⁸⁰⁾. Autores como Vangness o Yetkinler describen dos tipos: la térmica (monopolar) y la ablativa (bipolar). Lo que se consigue con ellas es la retracción del tejido sobre el que se aplica.

1.3.2.3 Estimulación de la reparación mediante el aporte de células pluripotenciales mesenquimales y fibroblastos procedentes del hueso subcondral y trabecular

Se trata de un conjunto de técnicas que lo que buscan es la perforación del hueso subcondral del fondo de la lesión, para que los fibroblastos y las células mesenquimales presentes en él tengan acceso a la lesión condral. De esta forma se originará un nuevo tejido que ocupará la lesión. Pero este tejido de reparación, aunque al principio tiene una apariencia

condroide, con el tiempo degenerará en fibrocartilago⁽⁸¹⁾.

Las siguientes técnicas se incluyen en este grupo: perforaciones múltiples, artroplastia de abrasión y microfracturas. La técnica de Perforaciones Múltiples fue inicialmente introducida por Pridie en 1959, e Insall continuo aplicándola más adelante⁽⁸²⁾. La realización de las perforaciones se hace bajo visión artroscópica, utilizando una aguja de Kistchner y un motor. Existe cierta limitación para la utilización de esta técnica en función de la localización de la lesión, pues la perforación ha de hacerse de forma perpendicular a la placa ósea subcondral, lo cual puede ser imposible en algunas localizaciones, tales como son las zonas posteriores de los condilos femorales o de las mesetas tibiales. Los resultados obtenidos con esta técnica en animales⁽⁸³⁾ demuestran que el estímulo de hueso subcondral logra generar un tejido cartilaginoso en el que predomina el cartilago I durante las tres primeras semanas, siendo a partir de entonces el cartilago tipo II el que va cobrando importancia progresivamente. Sin embargo, el cartilago tipo I sigue persistiendo de forma crónica en la lesión, por lo que prácticamente nunca es igual al cartilago articular normal. La profundidad de las lesiones es otro punto controvertido en la literatura, pues el estímulo de la reparación solo se consigue si las perforaciones son superficiales manteniendo la cortical intacta⁽⁸⁴⁾.

Aunque esta técnica aun se sigue utilizando, actualmente es más común la utilización de otras técnicas de perforación.

La Artroplastia de Abrasión fue introducida por Jonson⁽⁸⁵⁾⁽⁸⁶⁾, que informó de un índice de éxito del 77% a los dos años de seguimiento. Implica el raspado superficial del hueso subcondral con una fresa mecánica bajo visión artroscópica, eliminando de uno a dos milímetros de la superficie ósea. El sangrado resultante forma un coágulo que ocupa la lesión y le aporta las células pluripotenciales. Se consigue, al igual que en las perforaciones de Pridie, un tejido fibrocartilaginoso de menos calidad que el cartilago articular. Sin embargo, algunos estudios propugnan que los resultados se mantienen un plazo aproximado de unos 5 años tras la cirugía⁽⁸⁷⁾⁽⁸⁸⁾.

La técnica de Microfracturas fue descrita por Steadman y Rodrigo⁽⁸⁹⁾ en 1994. Es una técnica similar a las perforaciones de Pridie, pero con penetración solamente de la placa de hueso subcondral, después del desbridamiento del defecto hasta conseguir cartilago sano. Se practican múltiples microfracturas separadas de tres a cuatro mm., permitiendo a las células mesenquimales invadir la lesión⁽⁹⁰⁾. Se recomienda la no utilización de fresas o motores para evitar la lesión térmica, por lo que el instrumental consiste en punzones de diferentes tamaños y curvaturas para acceder a las diferentes localizaciones e las que podemos encontrar las lesiones. El movimiento pasivo de la articulación en descarga parece ayudar a la diferenciación del tejido de granulación. El seguimiento de la evolución de las lesiones mostró a los siete años un índice de éxito de alrededor del 75%⁽⁹¹⁾.

1.3.3 TÉCNICAS QUIRÚRGICAS REGENERATIVAS

Son un conjunto de técnicas que buscan que el defecto cartilagosos se rellene con cartílago hialino, a diferencia de las técnicas paliativas que buscan el relleno con fibrocartílago.

1.3.3.1 Aloinjertos osteocondrales

Su utilización se remonta a Lexer en 1908⁽⁹²⁾. Se trata de la implantación de un injerto de donante en el lecho sangrante preparado en el receptor. Su utilización tiene varios inconvenientes. En primer lugar el riesgo de reacciones inmunológicas y de transmisión de enfermedades todavía no está del todo eliminado. En segundo lugar, la viabilidad celular del aloinjerto osteocondral es solo de entre el 10 % y el 30%, lo que condiciona en gran manera el éxito del trasplante. Sin embargo, presenta numerosas ventajas, entre las que destacan la ausencia de morbilidad en la zona donante, la disminución del tiempo quirúrgico y la buena disponibilidad de tejido en el caso de lesiones cartilaginosas amplias. Desde el punto de vista clínico, los mejores resultados se obtienen con los aloinjertos de pequeño tamaño en lesiones post-traumáticas y utilizando injertos microvasculares de peroné en trasplantes osteocondrales para reconstrucciones masivas⁽⁹³⁾.

1.3.3.2 Autoinjertos osteocondrales

Matsusue fue el primero en informar sobre injertos autólogos osteocondrales múltiples, extraídos con forma cilíndrica de la cara lateral del fémur para

tratar lesiones osteocondrales⁽⁹⁴⁾. Hangody desarrolla esta técnica a principio de los años noventa utilizando el sistema de la mosaicoplastia⁽⁹⁵⁾.

La mosaicoplastia osteocondral autóloga consiste en la obtención de injertos osteocondrales cilíndricos de pequeño tamaño (de 2,7 mm. a 8,5 mm. de diámetro) de la zona periférica de los cóndilos femorales que soporta menos carga, a nivel de la articulación patelofemoral, y su trasplante a un área defectuosa preparada en las superficies de soporte de carga. Puede realizarse como procedimiento abierto, por miniartrotomía o por artroscopia.

Las ventajas que presenta la mosaicoplastia frente a otros procedimientos es que la utilización de múltiples injertos de pequeño tamaño permite que una mayor cantidad de tejido sea trasplantado, preservando a la vez la integridad de la zona donante. Además, su implante en un patrón de mosaico permite un acoplamiento más efectivo a la superficie del defecto⁽⁹²⁾⁽⁹⁶⁾⁽⁹⁷⁾.

Los buenos resultados clínicos obtenidos a largo plazo hacen que esta técnica sea una alternativa a considerar para el tratamiento de las lesiones pequeñas y medianas, condrales u osteocondrales, en zonas de carga de las articulaciones⁽⁹⁸⁾. El tamaño ideal del defecto a tratar oscila entre 1 y 4 cm. cuadrados, ya que zonas de mayor tamaño pueden asociarse con una mayor morbilidad sobre la zona donante. Igualmente, se establece la edad de cincuenta años como el límite superior para la realización de este procedimiento. Para conseguir un resultado óptimo es aconsejable corregir cualquier anomalía asociada a la articulación, tales como desalineacio-

nes axiales o inestabilidades. Las infecciones, los tumores y las artropatías reumáticas constituyen contraindicaciones para el empleo de esta técnica.

Desde el punto de vista histológico, a las ocho semanas de evolución se mantienen las características del cartílago hialino implantado y la integración de éste en el cartílago circundante⁽⁹⁹⁾.

1.3.3.3 Injertos de periostio

El injerto de periostio es conocido desde 1940. El periostio reúne las tres características principales requeridas para la ingeniería tisular del cartílago articular: es una fuente de células, permite el mantenimiento in situ de las células aplicadas a la lesión y es capaz de producir numerosos factores de crecimiento locales que regulan la condrogénesis de los condrocitos. Entre estos factores de crecimiento destacan: beta-1, insulina-like 1, factor 5 de diferenciación y la proteína morfogenética ósea BMP 2⁽¹⁰⁰⁾. Sin embargo, varios inconvenientes han llevado a que esta técnica haya caído en desuso. Por un lado la posibilidad de calcificación del cartílago a medio plazo a consecuencia, probablemente del colágeno X, y por otro la importante disminución del número de células en la zona donante dadora que aparece con la edad. Asimismo, hay estudios que corroboran el potencial artrógeno de las suturas utilizadas para unir el parche de periostio al cartílago circundante⁽¹⁰¹⁾.

1.3.3.4 Injertos de pericondrio

Introducidos en la práctica clínica por Homminga en 1990 basándose en estudios previos sobre lesiones experimentales creadas en rodillas de conejos,

que cubría con pericondrio costal, y mantenía adherido con fibrina⁽¹⁰²⁾.

Al igual que en el caso de injertos periósticos, en los de pericondrio también existe riesgo de osificación endocondral durante el primer mes postoperatorio, además de posibilidades de delaminación del cartílago, de arrancamiento del implante o de crecimiento de tejido conjuntivo en lugar de cartílago hialino. Desde el punto de vista clínico, Bruns obtiene resultados satisfactorios a largo plazo, e histológicamente confirma en todos los casos biopsiados el crecimiento de cartílago tipo hialino⁽¹⁰³⁾. Para mejorar estos datos, propone una corrección sistemática de las alteraciones articulares asociadas (inestabilidades, deaxaciones,...). Este autor describe el fenómeno de “flujo de cartílago” en los injertos de pericondrio, consistente en un salto de las fibras de colágeno hacia el centro de los defectos cartilaginosos, reducción de la metacromasia, formaciones celulares en grupos y reducción de la densidad celular. Se trataría de un fenómeno mecánico producido desde los bordes de la lesión, que contribuye escasamente a la reducción de los grandes defectos osteocondrales.

1.3.3.5 Cultivo de condrocitos

En 1965 Smith⁽¹⁰⁴⁾ consiguió el aislamiento y crecimiento de condrocitos en un medio de cultivo por primera vez. Fueron inyectados condrocitos epifisarios, desarrollados en cultivos, en defectos de la articulación tibial en la rodilla del conejo, pero no se produjo reparación alguna. Hubo que esperar hasta 1982 para que apareciera el primer resultado experimental exitoso con este tipo de técnica. En el Hospital para Enfermedades Articulares

de Nueva York demostraron la aparición de cartílago similar al hialino con un relleno del 80% de la lesión en defectos creados experimentalmente en la rótula del conejo. No se observó relleno en el grupo control, en el que el defecto se trató con recubrimiento perióstico, pero sin aporte de células⁽¹⁰⁵⁾⁽¹⁰⁶⁾. Desde entonces múltiples estudios han reportado resultados satisfactorios con esta técnica.

La intervención se desarrolla en tres fases. En la primera, habitualmente mediante artroscopia, se establecen las características de la lesión cartilaginosa a tratar, se confirma la indicación y se toma una muestra de cartílago sano (150-300 mg.) de zonas no sometidas a cargas. En un segundo tiempo de laboratorio, los condrocitos de la muestra son separados de su MEC por digestión enzimática. Estos condrocitos son inestables desde el punto de vista fenotípico y se diferenciarán tomando el aspecto de fibroblastos capaces de sintetizar fibras de colágeno tipos I y II, y proteoglicanos. Por último, en una nueva cirugía por lo general mediante artrotomía, se regularizan los bordes de la lesión y se expone la superficie subcondral de la misma. Se extrae un injerto de periostio de la misma extremidad intervenida y se sutura a los bordes de la lesión de la manera más estanca posible. Se sellan estos bordes con adhesivo de fibrina y se inyectan los condrocitos cultivados bajo el injerto perióstico. El TGF-beta producido por los condrocitos implantados, estimularía las células condrogénicas del periostio de cobertura para iniciar una condrogénesis perióstica que, junto con la MEC sintetizada por los condrocitos, formarían el nuevo tejido cartilaginoso⁽¹⁰⁷⁾. Estas mismas células controlarían la composición y estructura de la MEC gracias

al mantenimiento del balance entre las actividades anabólicas y catabólicas⁽¹⁰⁸⁾. La supervivencia de la gran mayoría de los condrocitos implantados en el lecho de la lesión se estima en cuatro semanas, tiempo al final del cual se puede detectar tejido regenerativo similar al cartílago hialino en el defecto osteocondral⁽¹⁰⁹⁾. Este procedimiento tiene ciertos inconvenientes como son: la posible fuga de los condrocitos del interior de los defectos condrales, a través de la zona de unión entre el injerto de periostio y el cartílago al que se sutura; la desdiferenciación del fenotipo celular; la distribución desigual de las células en el seno de la lesión en la que se depositan; el riesgo de complicaciones del propio implante perióstico (inestabilidad con posible desprendimiento del injerto o hipertrofia del mismo) y la necesidad de suturar sus bordes al del CA sano⁽¹¹⁰⁾.

Para evitar estas contrariedades, se plantea una segunda generación, que utiliza una membrana de colágeno bicapa en lugar del fragmento de periostio para sellar la lesión condral. Con esta modificación se evitan las complicaciones atribuibles al periostio implantado y se simplifica el procedimiento quirúrgico, disminuyendo su morbilidad. Sin embargo, sigue siendo necesaria la sutura de la membrana de colágeno a los bordes del cartílago articular intacto, lo que supone un inconveniente, como hemos mencionado anteriormente.

Los sucesivos avances tecnológicos han llevado a la tercera generación de ACI, en la que se utilizan biomateriales sembrados de condrocitos como transportadores y andamios scaffolds como estructuras para el crecimiento celular. Así mediante ingeniería tisular, se combina

el soporte tridimensional biocompatible, con los condrocitos cultivados para conseguir un neot Tejido cartilaginoso funcional (en terminología anglosajona es el método denominado MACI o matrix-induced autologous chondrocyte implantation). Tras desbridar la lesión cartilaginosa, el biomaterial con las células incluidas, se coloca perfectamente adaptado al defecto condral, sin necesidad de suturas en los bordes de la lesión ni de, incluso, utilizar adhesivos de fibrina.

1.3.3.6 Scaffolds

A pesar de los resultados prometedores obtenidos con las técnicas expuestas anteriormente, no se deben menospreciar algunas de las complicaciones o inconvenientes que se les atribuyen (el volumen de tejido de reparación necesario, la morbilidad de la zona donante o la dificultad para cubrir exactamente el área lesionada de cartílago). La ingeniería tisular de los compuestos sintetizados in vitro, está encaminada a evitar estas limitaciones. Los scaffolds, o matrices macroporosas de biomateriales, proporcionan a las células condrogénicas un alojamiento temporal en el que sobreviven, se multiplican, y producen MEC para constituir el cartílago regenerado. Estos biomateriales actúan como un vehículo de transferencia celular y por lo tanto, deben de ser biocompatibles con el tejido primitivo sobre el que se produzca la lesión (y por ende, con el tejido de alrededor de la zona en la que se implante la matriz biosintética)⁽¹¹¹⁾.

El polímero natural más ampliamente estudiado para las lesiones condras es el colágeno. Los condrocitos proliferan en geles de colágeno⁽¹¹²⁾, y está demostrado que los condrocitos mantie-

nen su fenotipo más tiempo con colágeno II que con colágeno I. Sin embargo, el colágeno únicamente puede extraerse de organismos vivos, lo que encarece su producción y conlleva un potencial riesgo de transmisión de enfermedades por priones. Otro problema que presenta el colágeno, es que los condrocitos humanos cultivados en contacto con él pueden expresar moléculas inductoras de respuesta inmune, provocando de esta manera la pérdida completa del implante.

Otros scaffolds naturales utilizados son la azarosa, geles de fibrina, ácido hialurónico y el citosan. Muchos de estos compuestos son hidrogeles y se diseñan como inyectables en su forma líquida, mezclándose adecuadamente con las células condrogénicas. Una vez inyectadas en la zona receptora, estas sustancias tienden a rellenar cualquier defecto cartilaginoso sea cual sea su forma y tamaño⁽¹¹³⁾.

Existen también polímeros sintéticos cuya biocompatibilidad ha sido ampliamente estudiada⁽¹¹⁴⁾⁽¹¹⁵⁾ y que eliminan algunos de los problemas que aparecen con los naturales. Estos son el ácido poli DL-láctico (PLA) y el ácido poliglicólico (PGA). El PLA es menos cristalino y más estable que PGA, y se tiene más experiencia en su uso en el campo de la cirugía ortopédica. Sin embargo, los esfuerzos para generar cartílago hialino con PLA han sido infructuosos a causa de la baja síntesis de GAG sulfatado y por la formación de fibras de colágeno tipo I por las células cultivadas en él. Existe un copolímero de PLA y PGA, el ácido poli DL-láctico-glicólico (PLGA). Se trata de un polímero ampliamente estudiado⁽¹¹⁶⁾⁽¹¹⁷⁾⁽¹¹⁸⁾, pero aún no existen estudios que lo muestren como claramente superior a todos los de-

más. Otros polímeros sintéticos en vías de desarrollo para su aplicación en los cultivos de condrocitos son el Polietileno, el óxido de Propileno y el Polipropileno fumarato^(119,120).

Por otra parte, el éxito clínico de la mosaicoplastia con injertos osteocondrales ha hecho que se plantee la idea de generar compuestos osteocondrales bifásicos (hueso-cartilago) mediante ingeniería tisular para la reparación de lesiones osteocondrales. La reparación osteocondral presenta numerosas ventajas respecto a la reparación únicamente cartilaginosa, entre las que cabe destacar la estabilidad del implante durante los movimientos articulares. El componente óseo del compuesto osteocondral sintetizado constituye un soporte rígido para el componente cartilaginoso, de manera que esta estructura puede introducirse a presión o pressfit en el lecho de lesión. Muchos estudios han utilizado fosfato tricálcico para sintetizar el componente óseo¹⁴⁰. Cuando las células de la médula ósea contactan con la fracción ósea del implante bifásico, se convierten en osteogénicas y favorecen la integración del implante al hueso huésped. Las mismas circunstancias se dan en la interfase entre el cartilago huésped y la fracción cartilaginosa del scaffold⁽¹²¹⁾⁽¹²²⁾.

Respecto al tipo celular que se elige para implantar en la lesión del cartilago junto con su scaffold correspondiente, la elección más obvia es el condrocito diferenciado, pues es capaz de producir MEC. Dado que las subpoblaciones de condrocitos presentan diferencias dependiendo del estrato en el que se encuentren, es importante tratar de mantener estas diferencias en el implante⁽¹²³⁾⁽¹²⁴⁾. Otro aspecto a tener en cuenta es que dependiendo del estrato

en el que se encuentren, los condrocitos responden a la producción de GAG y a la proliferación de manera diferente ante las mismas cargas mecánicas⁽¹²⁵⁾.

Un problema que surge con la utilización de condrocitos diferenciados es que estos, con la edad, disminuyen de manera importante en número en las capas superficiales. Es por esta razón que también se esté intentado reparar lesiones de profundidad completa con células mesenquimales de médula ósea, de músculo y de periostio.

Dependiendo del tipo celular elegido, varios factores de crecimiento han sido estudiados para tratar de utilizar su influencia en la regulación del crecimiento celular y en la producción de MEC. El TGF-beta se sabe que promueve la proliferación y diferenciación de células inmaduras. Sin embargo, en el caso de los condrocitos se ha visto que decrece la producción de PG y provoca el cambio de expresión de colágeno II a I, ambos hechos signos de desdiferenciación⁽¹²⁶⁾. Por otra parte, hay estudios que demuestran que este factor de crecimiento provoca el estímulo de la producción de ambos tipos de colágeno y de GAG bajo ciertas condiciones al ser utilizado junto con PLG, aumentando así la formación de MEC y de tejido cartilaginoso de mejores características al compararlo con lesiones control sin tratamiento. Por tanto, los resultados ante el uso de TGF-beta aún son contradictorios.

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas se ha observado que mantienen el fenotipo de cartilago articular a la vez que aceleran la formación de hueso subcondral y mejoran el aspecto de la superficie articular formada⁽¹²⁷⁾. Por último, los Insu-

lin Growth Factors se cree que son favorecedores de que los condrocitos osteoartríticos formen matriz extracelular⁽¹²⁸⁾.

Desde hace tiempo ya es sabido que las fuerzas mecánicas aplicadas sobre el cartílago contribuyen al mantenimiento del fenotipo, a regular la biosíntesis y a organizar la MEC en función de las necesidades mecánicas⁽¹²⁹⁾⁽¹³⁰⁾. La presión hidrostática sobre los condrocitos es uno de los tipos de fuerzas mecánicas más estudiadas, y también ha sido empleada en bioreactores para cultivo de tejidos. La presión hidrostática se ha demostrado que altera la organización del citoesqueleto, e induce la expresión de interleucina y factor de necrosis tumoral. Smith ha demostrado que un régimen intermitente de cargas cada 4 horas durante 4 días provoca

un incremento de nueve veces del ARNm para colágeno tipo II y un incremento de 20 veces para el ARNm de agreganos⁽¹³¹⁾. Estos hallazgos han hecho que se hayan diseñado sistemas de perfusión para cultivo de condrocitos que aplican de manera intermitente una presión fisiológica determinada. De esta manera se consigue un aumento del contenido de proteoglicanos en el tejido cultivado, que conlleva un aumento correlativo del módulo compresivo y la mejora en las características mecánicas del modelo cultivado. Otros efectos mecánicos que están siendo estudiados son la compresión y el cultivo dentro de un flujo turbulento con resultados variables en cuanto a estimulación de la biosíntesis de nuevo tejido.

1.4

NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL TRATAMIENTO DE LAS LESIONES OSTEOCONDRALES

1.4.1 INTRODUCCIÓN

Además del desarrollo y perfeccionamiento de las técnicas quirúrgicas explicadas anteriormente, existen numerosas líneas de investigación centradas en encontrar tratamientos que sean menos agresivos y más efectivos a la hora de enfrentarse a las lesiones osteocondrales. En esta línea, encontramos tres grupos bien diferenciados. El primero consiste en la utilización de elementos celulares indiferenciados que deriven hacia el tejido celular que necesitamos reparar, como es el caso de las células troncales pluripotenciales⁽¹³²⁾. El segundo grupo consiste en el

aporte a la lesión de factores bioquímicos que induzcan o potencien la capacidad autorregeneradora del tejido lesionado, como es el caso de los factores de crecimiento de origen plaquetario⁽¹³³⁾. Y por último el tercer grupo, que consiste en aportar a la lesión compuestos orgánicos sintéticos presentes en el organismo sano, pero que con el proceso de envejecimiento se van perdiendo, como es el caso del ácido hialurónico⁽¹³⁴⁾.

1.4.2 INGENIERÍA TISULAR: APLICACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENCIALES EN CIRUGÍA ORTOPÉDICA.

La ingeniería tisular es un campo interdisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de la biología para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función articular mediante la utilización de células, combinadas con biomateriales o con factores bioquímicos que mejoren sus capacidades reparadoras⁽¹³⁵⁾⁽¹³⁶⁾⁽¹³⁷⁾⁽¹³⁸⁾. Los criterios que se deben de seguir a la hora de elegir entre los diferentes estirpes celulares que se pueden utilizar, son que la estirpe elegida pueda producir un número suficiente de células y tejido para conseguir la reparación completa, éstas puedan diferenciarse y mantenerse con el fenotipo correspondiente y que, tanto las células como los tejidos, adopten la organización tridimensional necesaria y produzcan la matriz extracelular⁽¹³⁹⁾⁽¹⁴⁰⁾.

Por último, las células y los tejidos aportados deben de poder adaptarse e integrarse a las demandas del tejido que van a reparar, conseguir una integración completa y una vascularización adecuada con el tejido local y, todo ello, sin provocar un rechazo inmunológico⁽¹⁴¹⁾⁽¹⁴²⁾.

Las células troncales pluripotenciales se caracterizan por tres propiedades: autorrenovación, capacidad de desarrollarse en múltiples líneas celulares y potencial de proliferar sin límite⁽¹⁴³⁾, lo que las hacen unas excelentes candidatas para su uso en la ingeniería tisular. Dentro de las células troncales pluripotenciales se

incluyen células autólogas, alogénicas y xenogénicas. Cada una de estas categorías se puede dividir dependiendo del estado de diferenciación celular. En primer lugar están las células indiferenciadas de origen embrionario o umbilical, frente a aquellas células diferenciadas que caracterizan a cada uno de los tejidos del organismo. Entre ambos grupos, podemos incluir un grupo intermedio de células sin diferenciar conocido como células troncales del adulto, que pueden dirigirse hacia distintas líneas celulares⁽¹⁴⁴⁾.

1.4.2.1 Las células troncales del adulto.

Las células troncales del adulto tienen ventajas y son más utilizadas que las embrionarias pues no plantean ninguna barrera ética al encontrarse en muchos lugares del organismo, ser relativamente fáciles de obtener, no dar lugar a problemas inmunológicos y al haber demostrado una efectividad superior a las células embrionarias, sin observarse los tumores de nueva aparición relacionados con el uso de estas últimas⁽¹⁴⁵⁾.

Las células troncales del adulto pueden obtenerse de reservorios del organismo como son el hueso trabecular, el periostio, la membrana sinovial, el músculo, la dermis, la sangre, la médula ósea y el tejido adiposo. Permanecen en el organismo tras el nacimiento, disminuyendo los reservorios con la edad.

1.4.2.2 Las células troncales del adulto derivado del tejido adiposo.

El descubrimiento de que era posible la obtención de células troncales desde el tejido adiposo del adulto supuso una

revolución, ya que podían ser así obtenidas en grandes cantidades y con un mínimo discomfort para el paciente, teniendo unas características fenotípicas y un potencial de diferenciación muy similares a las células troncales adultas derivadas de la médula ósea⁽¹⁴⁶⁾.

El tejido adiposo posee la habilidad de cambiar de volumen durante la vida del individuo. Los cambios menores son por hipertrofia celular, pero los cambios mayores son mediados por hiperplasia y aumento de la vascularización. Estos cambios están mediados por una población de células troncales multipotenciales con propiedades similares a las obtenidas desde la médula ósea⁽¹⁴⁷⁾.

El tejido adiposo deriva de la capa mesodérmica del embrión y tiene desarrollo pre y postnatal. La formación de células adiposas en la especie humana tiene lugar durante el segundo trimestre de gestación⁽¹⁴⁸⁾. Las células adiposas se caracterizan por su aspecto fibroblástico, con un abundante retículo endoplasmático, un alto índice núcleo/citoplasma, localización perinuclear de la mitocondria y presencia de vacuolas lipídicas⁽¹⁴⁹⁾. Su diferenciación celular proviene de la secuencia adipoblasto-preadipocito-adipocito inmaduro-adipocito maduro. En el tejido adiposo los precursores coexisten en conjunto con células adiposas maduras, fibroblastos, células sanguíneas, células endoteliales, pericitos y células mesenquimales indiferenciadas⁽¹⁴⁸⁾.

Las células troncales de origen adiposo cumplen los criterios de Grimble⁽¹⁴⁹⁾ para que las células troncales puedan ser utilizadas con fines médicos, y considerando la incidencia de obesidad

en la población actual, esta es una fuente abundante y accesible. El tejido adiposo puede ser obtenido mediante lipoaspiración en grandes cantidades y con un riesgo mínimo. La lipoaspiración es el tercer procedimiento realizado con mayor frecuencia por los cirujanos plásticos en Estados Unidos (ASPS), y con un índice muy bajo de complicaciones⁽¹⁵⁰⁾. Cada gramo de tejido adiposo contiene aproximadamente 5000 células troncales pluripotenciales, aproximadamente 500 veces más que 1 g de médula ósea⁽¹⁴⁷⁾. Otro aspecto importante es que en la articulación de la rodilla se encuentra un acúmulo de grasa prerrotuliana conocido como grasa de Hoffa. Este reservorio de grasa es de fácil abordaje durante la realización de una artroscopia, con lo que durante el mismo acto quirúrgico de exploración de una lesión osteocondral, es posible obtener una muestra de tejido graso sin necesidad de acudir a otra zona donante del organismo.

Las células troncales de origen adiposo tienen la capacidad de diferenciarse en células de origen mesodérmico, como son los adipocitos⁽¹⁴⁶⁾, miocitos⁽¹⁵¹⁾, los osteocitos⁽¹⁴⁶⁾⁽¹⁵²⁾⁽¹⁵³⁾ y los condrocitos⁽¹⁴⁶⁾⁽¹⁵⁴⁾, proceso denominado diferenciación linaje-específica. Dentro de estos tipos celulares mesodérmicos, el proceso de diferenciación puede cambiar por sobreexposición a un factor de transcripción específico. Este proceso es conocido como transdiferenciación⁽¹⁵⁵⁾. Sin embargo, cada vez hay más evidencia de que las células troncales de origen adiposo también pueden diferenciarse en tejidos de origen distinto como neuronas⁽¹⁵⁶⁾, células pancreáticas endocrinas⁽¹⁵⁷⁾, hepatocitos⁽¹⁵⁸⁾, células endoteliales⁽¹⁵⁹⁾, cardiomiocitos⁽¹⁶⁰⁾ y células epiteliales⁽¹⁶¹⁾. A este proceso se le denomina diferenciación cruzada⁽¹⁶²⁾.

La diferenciación condrogénica de estas células se consigue mediante la adición de TGF- β 1, BMP-4, BMP-6 y BMP-7⁽¹⁶²⁾. Se describen diferencias en la capacidad de diferenciación de éstas frente a las derivadas de médula ósea, pero se deberían sólo a un menor tiempo de cultivo⁽¹⁴⁷⁾.

Existen numerosas aplicaciones clínicas de su uso en diferentes patologías. Dentro de los primeros casos descritos se encuentra su utilización para tratar grandes defectos de calota asociadas al uso de fibrina y de una matriz biodegradable⁽¹⁶³⁾. Se han utilizado también en la reconstrucción de la mandíbula en un paciente sometido a hemimandibulectomía con posterior reconstrucción con colgajo y matriz ósea con BMP-2, obteniéndose formación de hueso a los 8 meses⁽¹⁶⁴⁾. García-Olmo⁽¹⁶⁵⁾ ha publicado la utilización de células troncales de origen adiposo para el cierre de fístulas enterocutáneas en pacientes con Enfermedad de Crohn, obteniendo un 75% de éxitos. También se han utilizado con éxito en 1 paciente para el cierre de una fístula traqueomediastínica producida por radioterapia⁽¹⁶⁶⁾. Rigotti⁽¹⁶⁷⁾ ha descrito el uso la inyección de lipoaspirado purificado en úlceras cutáneas secundarias a radioterapia. Finalmente, cabe mencionar que se están realizando estudios clínicos para evaluar la respuesta de las células troncales de origen adiposo en el tratamiento del infarto agudo de miocardio, en la insuficiencia cardíaca⁽¹⁶⁸⁾ y en la reparación de lesiones de músculo esquelético traumáticas apreciándose una aceleración en el tiempo de reparación y un incremento de la fuerza contráctil en el nuevo tejido formado respecto al control⁽¹⁶⁹⁾.

1.4.3 APLICACIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO DE ORIGEN PLAQUETARIO EN LA REGENERACIÓN DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Los concentrados de sangre autóloga, entre los que se encuentra el plasma rico en plaquetas, han ganado popularidad creciente entre los profesionales de la salud y entre los deportistas como resultado de la atención que le han prestado los medios de comunicación. Aparte de su uso en cirugía ortopédica, el uso de estos productos está ampliamente documentado en cirugía cardiovascular, maxilofacial y plástica y reparadora⁽¹⁷⁰⁾⁽¹⁷¹⁾⁽¹⁷²⁾⁽¹⁷³⁾. El mercado del plasma rico en plaqueta se calculó en 45 millones de dólares en 2009, y se espera que crezca hasta los 120 millones en 2016⁽¹⁷⁴⁾.

El organismo responde al daño tisular mediante un complejo mecanismo de cicatrización en el que las plaquetas tienen un papel importante. En primer lugar, son las responsables de detener el sangrado. Pero una vez que son activadas por mediadores en el lugar del daño comienzan un proceso de degranulación en el que se liberan diferentes proteínas y factores de crecimiento que contribuyen a la cicatrización de la lesión⁽¹⁷⁵⁾⁽¹⁷⁶⁾.

Para ello, las plaquetas contienen un conjunto de gránulos (llamados gránulos alfa) que están llenos de citoquinas (FGF-2, IGF-1), factores de crecimiento (PDGF), TGF β , VEGF, Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) todos ellos capaces tanto de incrementar la tasa

de proliferación de varios tipos celulares como de influir en la síntesis de tejido y en su remodelación⁽¹³²⁾⁽¹⁷⁷⁾. Estos gránulos son liberados bajo la activación de la trombina, el colágeno o por la destrucción mecánica de la propia plaqueta.

Los productos de liberación de las plaquetas han sido estudiados y utilizados desde los años setenta en el campo del tratamiento de lesiones de hueso, músculo y tendón. Los PRP son obtenidos a partir de la sangre periférica del propio paciente, que es centrifugada para obtener un concentrado de plaquetas, las cuales tras ser activadas in vitro, son administradas en el sitio de la lesión. Su uso se basa en premisa de que aporte extra de factores de crecimiento incrementará de manera substancial el proceso de cicatrización natural⁽¹⁷⁵⁾⁽¹⁷⁷⁾. Su obtención se basa en la utilización de un volumen de la fracción plasmática concentrada de sangre autóloga del propio paciente, conocida como PRP (plasma rico en plaquetas)⁽¹⁷⁵⁾.

Existen numerosos estudios que demuestran resultados prometedores con el empleo de PRP en el tratamiento de secciones crónicas tendinosas mediante inyecciones en estructuras tendinosas del hombro, del tobillo y de la rodilla. Sin embargo, cabe mencionar que muchos de esos estudios utilizaron muestras pequeñas⁽¹⁷⁸⁾. También han sido ampliamente utilizados los PRP en el campo de la ingeniería tisular ósea, pero con resultados más controvertidos. Así, los estudios de Marx⁽¹⁷⁹⁾ y Oyama⁽¹⁸⁰⁾ en el campo de las reconstrucciones maxilofaciales mostraron un fuerte efecto de los PRP en la formación de hueso, mientras que los estudios de Doriy Kassolis y Reynolds mostraron unos efectos débiles⁽¹⁸¹⁾.

En el caso del cartílago articular, los PRP poseen un impacto directo a la hora de mejorar los problemas del cartílago articular mediante la inyección directa intrarticular en la rodilla del paciente. Aunque esta aplicación no ha sido investigada aún en profundidad, los resultados preliminares que existen hasta la fecha son prometedores. Así, estudios como los de Hildner⁽¹⁸¹⁾, que abarca el resultado del tratamiento de 115 rodillas en 91 pacientes, muestran una mejora en la función articular de la rodilla con una disminución significativa del dolor, especialmente en pacientes jóvenes. Existen en esta misma línea otros estudios que hablan de un beneficio terapéutico para esta y otras indicaciones⁽¹⁸²⁾⁽¹⁸³⁾.

El mecanismo de acción a la hora de favorecer la reparación de las lesiones del cartílago articular, se cree que está en relación con la capacidad de estimulación y diferenciación que tienen los factores de crecimiento plaquetarios sobre los condrocitos⁽¹⁸⁴⁾. Sin embargo, los resultados acerca de la influencia que tienen estas sustancias sobre el incremento de la producción de matriz cartilaginosa son controvertidos. Akeda⁽¹⁸⁴⁾, a partir del uso de condrocitos aislados porcinos estimulados con PRP observó un aumento en la producción de proteoglicanos y de colágeno, siendo este último predominantemente de tipo II. Se estima que las diferencias entre los diferentes estudios pueden venir dadas por las diferentes condiciones de cultivo y de preparación de los PRP, siendo un factor clave en las diferencias de preparación el tipo de activación utilizado. Han demostrado que la activación con trombina elimina el potencial osteoinductivo y condroinductivo de los PRP. Otros estudios posteriores han corroborado estos resultados⁽¹⁸¹⁾.

1.4.4 UTILIZACIÓN TERAPEÚTICA DE LAS INFILTRACIONES INTRAARTICULARES CON ACIDO HIALURÓNICO

El ácido hialurónico es un importante componente de las matrices extracelulares corporales y está presente en unas concentraciones particularmente altas en el cartílago y en el líquido sinovial. El ácido hialurónico endógeno proporciona viscoelasticidad al líquido sinovial, fundamentalmente por sus propiedades de lubricante y amortiguador, y es esencial para la correcta estructura de los proteoglicanos en el cartílago articular. Constituye el eje central de varios agregados de proteoglicanos necesarios para la integridad funcional del cartílago y de otras matrices extracelulares⁽¹⁸⁵⁾. El ácido hialurónico es el máximo responsable de las propiedades viscoelásticas del líquido sinovial⁽¹⁸⁶⁾⁽¹⁸⁷⁾⁽¹⁸⁸⁾⁽¹⁸⁹⁾ y juega además un papel clave en actividades biológicas tan diversas como la proliferación y la actividad celular⁽¹⁹⁰⁾⁽¹⁹¹⁾.

Los mecanismos de acción demostrados del ácido hialurónico son los siguientes:

Efectos sobre la inflamación:

- Efecto neutralizador de radicales y superóxidos (óxido nítrico)⁽¹⁹⁴⁾
- Reducción del derrame⁽¹⁹⁵⁾⁽¹⁹⁶⁾
- Modulación de la actividad celular⁽¹⁹⁷⁾
- Reducción de la producción de prostaglandina E2⁽¹⁹⁸⁾

Efectos en la fisiopatología artrósica:

- Estimulación de la producción de AH endógeno⁽¹⁹⁹⁾
- Reducción de la degradación del marcador de cartílago⁽²⁰⁰⁾
- Acción biológica sobre los condrocitos humanos⁽¹⁹⁷⁾
- Inhibición de la apoptosis del condrocito en pacientes con artrosis⁽¹⁹⁷⁾

Los ácidos hialurónicos sintéticos comercializados actualmente se obtienen a partir de dos procesos, ambos aprobados por la Farmacopea Europea. Por un lado pueden obtenerse a partir de la extracción y purificación de la cresta de gallo, y por otro, a partir de cultivos bacterianos de *Streptococcus*, mediante una posterior purificación del producto.



JUSTIFICACIÓN

2.1

LAS PATOLOGÍAS DEL CARTÍLAGO ARTICULAR

Las patologías del cartílago articular tienen una amplia repercusión en la población mundial tanto por su alta prevalencia como por la merma de la calidad de vida que suponen. En el caso de las lesiones degenerativas, se considera que la osteoartritis es la enfermedad articular más común en Estados Unidos, afectando a veintisiete millones de personas⁽¹⁾. En el caso de la rodilla, se estima que afecta al 10% de los hombres y al 13% de las mujeres por encima de los sesenta años⁽²⁾. También en Estados Unidos, la patología artrósica es la segunda causa de limitación laboral en mayores de cincuenta años tras la cardiopatía isquémica⁽³⁾, y desde el punto de vista económico, supone un coste anual en este país de unos sesenta billones de dólares al año⁽⁴⁾. En el caso de las lesiones

osteocondrales, pueden llegar a encontrarse hasta en un 10-12% de la población⁽⁵⁾, con la gravedad añadida que suele afectar a personas jóvenes y que muchas de estas lesiones desembocan en artrosis.

Todas las lesiones del cartílago articular tienen en común la baja capacidad que tiene el cartílago hialino para reparar el daño una vez que la lesión se ha establecido. El cartílago es un tejido suprespecializado en la transmisión de cargas, y para ello, a lo largo de la evolución, ha ido perdiendo unas estructuras imprescindibles para su autorreparación: vasos sanguíneos⁽⁶⁾. Sin aporte vascular, no es posible que lleguen al lugar las moléculas necesarias para iniciar y continuar el proceso de reparación, y su baja celularidad

tampoco contribuye a ello. Esta es una de las principales limitaciones a la que nos enfrentamos a la hora de intentar poner solución a esta patología.

Los tratamientos que existen actualmente o se pasan o se quedan cortos. Así, en el caso de la artrosis establecida y sintomática el único tratamiento eficaz es la cirugía protésica, consistente en sustituir toda la superficie articular por una artroplastia. Este tipo de cirugía es complicada, tiene un alto coste socioeconómico⁽⁷⁾ y presenta importantes riesgos y contraindicaciones para los pacientes. En el caso de las lesiones osteocondrales, los diversos tratamientos quirúrgicos existentes en forma de trasplante de condrocitos, injertos o fijación de lesiones han tenido hasta la fecha un éxito limitado⁽⁸⁾.

En los últimos años, diversos estudios se han orientado hacia el desarrollo de técnicas que consigan mejores resultados en el tratamiento de las lesiones del cartílago hialino sin necesidad de tener que hacer intervención quirúrgica, con el ahorro en coste para la sociedad y en ries-

gos para el paciente que esto supone⁽⁹⁾ ⁽¹⁰⁾. En esta línea, nuestro estudio propone la infiltración de una combinación de factores de crecimiento de origen plaquetario, células madre de origen mesenquimal y ácido hialurónico en la cavidad articular de la rodilla de un conejo al que previamente le hemos hecho una lesión osteocondral experimental. Consideramos que sería de gran interés determinar si el aporte externo de células madre que se puedan diferenciar hacia condrocito, junto con los factores propios del plasma del conejo enriquecidos y el ácido hialurónico, puede paliar la falta de aporte sanguíneo al cartílago lesionado, y favorecer su reparación.

En caso de que así sea, nos encontraríamos ante un método sencillo y relativamente barato que se podría aplicar desde los primeros momentos en los que aparece la lesión del cartílago, favoreciendo la curación de éste y evitando su progresión hacia la artrosis.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El cartílago articular se caracteriza por ser un tejido avascular. Los nutrientes necesarios para su supervivencia le llegan a través del líquido sinovial y desde los vasos presentes en el hueso subcondral subyacente. Por otra parte, la capacidad divisional de las células que lo forman es escasa.

En consecuencia, las lesiones agudas o degenerativas del cartílago articular tienen poca capacidad de regeneración y, en todo caso, el nuevo tejido formado tiene una calidad inferior al original. Se han desarrollado numerosas técnicas quirúrgicas que buscan aumentar la capacidad de cura del cartílago y mejorar la calidad del tejido cicatricial formado, pero ninguna de ellas ha llegado a resolver el problema por completo. La aplicación de sustancias intraarticulares tiene ventajas respecto a las técnicas quirúrgicas en cuanto a coste y sencillez.

En el siguiente estudio planteamos una experiencia basada en la siguiente

hipótesis: la capacidad reparativa del ácido hialurónico, los factores de crecimiento de origen plaquetario y las células madre mesenquimales de origen adiposo se ve potenciada cuando se usan de manera conjunta en el tratamiento de las lesiones osteocondrales producidas artificialmente en la rodilla de un animal de experimentación.

Los objetivos que nos hemos planteado en nuestro trabajo son:

Comprobar el efecto beneficioso que tiene la aplicación intraarticular aislada de ácido hialurónico, plasma rico en plaquetas y células madre mesenquimales de origen adiposo en una rodilla a la que experimentalmente se le ha realizado una lesión osteocondral de espesor completo.

Analizar si la aplicación combinada de estas sustancias tiene efecto sinérgico a la hora de promover la reparación del cartílago articular dañado.

4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1

EL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN

El animal de experimentación elegido para nuestro estudio fue el conejo blanco de la raza Nueva Zelanda. Se trata de una raza creada en 1916 en California por W.S. Preshaw. Inicialmente se usó con fines del comercio de pieles y de producción de carne dado la gran velocidad a la que se desarrollaban y alcanzaban un buen estado ponderal. Entre sus ancestros posiblemente se encuentren las razas Angora, Flemish Giant y el American White. Para nuestro estudio elegimos 24 conejos machos de 12 semanas de edad y 1800 g de peso.

Morfológicamente se caracterizan por su color blanco, con un cuerpo redondeado y una cabeza ancha con ojos de

color rosado. El animal adulto pesa entre 4 y 5 kilogramos. A diferencia de la gruesa piel de sus cuerpos, las orejas presentan una piel más fina y un pelo más corto, pudiendo localizarse fácilmente en esta zona vasos sanguíneos superficiales.

Esta raza de conejo es especialmente adecuada para utilizar como animal de laboratorio debido a su tamaño medio, su docilidad y la facilidad de su manejo. Su tamaño, su fertilidad y sus hábitos alimenticios permiten la obtención de muestras estadísticamente satisfactorias, sin un coste excesivo. Otra ventaja a tener en cuenta, son las grandes venas a las que se tiene acceso en las orejas, que permiten que tanto la obtención de muestras de sangre, como la administración de medicación, sea más

sencilla que en otros animales de experimentación. En nuestro caso, otra ventaja importante es que la anatomía de la rodilla del conejo guarda bastante similitud con la del humano. En una disección previa al inicio del estudio, comprobamos que el fémur del conejo presentaba dos cóndilos de un tamaño suficiente para realizar al lesiones osteocondrales que precisábamos hacer.

Principalmente existen dos desventajas para el uso de este tipo de animal en experimentación. En primer lugar, la mayor parte de las colonias constituyen

depósitos virtuales de diversas enfermedades. Sin embargo, esto se ha ido superando gracias al desarrollo de ejemplares sanos mantenidos bajo condiciones especiales en centros especializados en la cría específica de animales de experimentación. La segunda desventaja importante es que el conejo es muy sensible a los anestésicos, teniendo reacciones extremadamente variables a la mayoría de los anestésicos generales. Por ello, para la realización de nuestro estudio se utilizó un protocolo anestésico estricto adaptado a esta raza de animal.



Conejo adulto de la raza Nueva Zelanda

4.2

LUGAR DE ESTABULAMIENTO Y DE REALIZACIÓN DE LAS INTERVENCIONES QUIRÚRGICAS

El estabulamiento y los cuidados diarios de los animales de experimentación se llevó a cabo en las instalaciones del Animalario de la Universidad de León, cumpliendo las directrices del Real Decreto 1201/2005 del 10 de Octubre de 2005 sobre “Protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos”. Previamente a la cirugía se estabularon a los animales durante 72 horas en jaulas individuales de 2200 cm cuadrados de superficie con el objetivo de aclimatarlos a su nuevo medio ambiente antes de la cirugía. La alimentación se llevó a cabo con pienso específico y agua. Cada animal y cada jaula se identificaron debidamente.

El lugar elegido para las cirugías fueron los quirófanos del Hospital Clínico Veterinario de Castilla y León, situado en León capital, perteneciente a la Universidad de León y a las Consejerías de Edu-

cación y Agricultura de la Comunidad. Este centro inició su andadura en 2009, y cuenta con aproximadamente 6000 metros cuadrados dedicados a la asistencia clínica veterinaria, la formación de veterinarios internos, el soporte permanente de actividad docente y la colaboración con proyectos de investigación que precisen de animales de investigación.

Para la realización de las intervenciones quirúrgicas se utilizaron dos pinzas de disección tipo Adson con dientes, dos separadores Senn Miller, una pinza de tracción tipo Koetcher, unas tijeras de disección tipo Metzemaum, un bisturí desechable del número 12, dos pinzas de hemostasia tipo mosquito, un porta agujas para la sutura de cierre y un punzón quirúrgico de 3 mm de ancho por 3 mm de profundidad para la realización de las lesiones osteocondrales.



Instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de Castilla y León.

4.3

PLANIFICACIÓN Y EJECUCIÓN QUIRÚRGICA

Cuarenta y cinco minutos antes de la intervención quirúrgica se sedó a cada conejo con una dosis intramuscular de 15 mg/Kg de peso de ketamina y otra de 0,1 mg/Kg de medetomidina. Como profilaxis antibiótica se utilizó cefazolina intravenosa (20 mg/Kg de peso). La anestesia utilizada fue de tipo inhalatorio mediante la administración con mascarilla de isofluorano al 1,5%.

Con el conejo sedado, se procedió a coger una vía venosa periférica a nivel auricular y a rasurar ambas rodillas y el abdomen. 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 un campo estéril con paños quirúrgicos desechables.

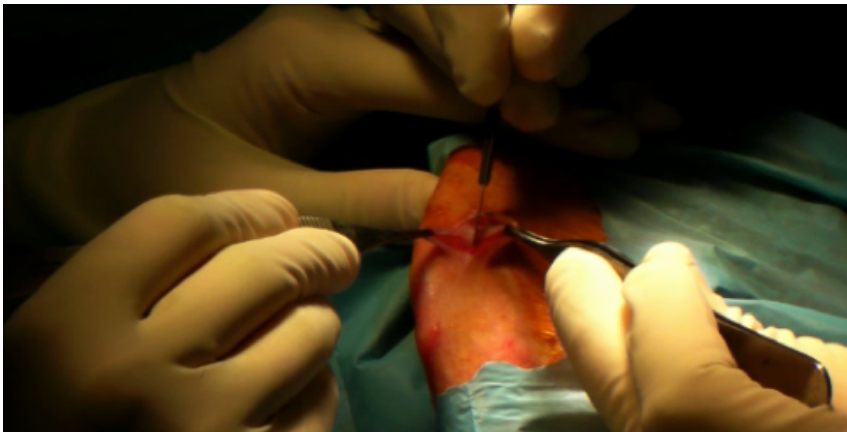
La incisión quirúrgica se realizó la cara anterior de la rodilla del conejo centrada sobre la rótula, prolongándola 2 cm distal y proximálmente. Mediante disección suave, se despegó el plano musculotendinoso del tejido celular subcutáneo, localizándose el músculo cuádriceps, el tendón cuádriceps y el tendón rotuliano. Para acceder a la articulación se realizó una artrotomía parapatelar externa, luxándose la rótula en dirección medial para exponer los cóndilos femorales. Bajo visión directa, se crearon los dos defectos osteocondrales (uno en cada cóndilo) utilizando el Puntch de biopsia y profundizando hasta el plano óseo subcondral.

Una vez creados ambos defectos, se procedió a cerrar la artrotomía mediante sutura discontinua con un hilo reabsorbible Dexon 0. Tras cerrar la cápsula articular, se procedió a infiltrar la cavidad articular con las diferentes combinaciones de sustancias estudiadas, según cual fuera el grupo que estábamos operando. Para ello se utilizó una jeringa desechable de 5 cc y una aguja intramuscular. Para aproximar el tejido subcutáneo se utilizó un hilo reabsorbible Dexon 2/0, y para la piel se aplicaron grapas. Como medida de asepsia, se aplicó a la herida un apósito en aerosol (Nobecután).

Aquellos conejos del grupo en el que se les aplicaba células madre de origen adiposo, precisaron dos semanas antes

una intervención previa con el fin de extraer el tejido adiposo a partir del cual cultivar las células madre. Para ello se realizó una incisión en la zona inferoexterna del abdomen. Tras seccionar la piel, se localizaron los depósitos grasos abdominales y se extrajo una muestra abundante de tejido graso para cultivo. El cierre de la piel y el tejido subcutáneo se realizaron de un modo similar al descrito anteriormente.

Durante postoperatorio inmediato el animal se mantuvo controlado y bajo observación en un área al efecto. Como analgesia utilizamos Meloxicam 0,5 mg/Kg cada veinticuatro horas durante los primeros tres días vía oral. Se realizaron curas diarias de la herida hasta la retirada de grapas.



Incisión cutánea sobre la cara anterior de la rodilla



Aspecto macroscópico de la lesión osteocondral provocada en el cóndilo lateral



Cierre con puntos de sutura discontinua de la cavidad articular una vez realizadas las lesiones.



Infiltración de la cavidad articular a través del tendón rotuliano con una aguja intramuscular

4.4

OBTENCIÓN DE LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Para la obtención de factores de crecimiento de origen plaquetario en nuestro estudio, se obtuvieron de cada conejo 10 ml de sangre arterial al 10% durante la preinducción anestésica. Esta sangre se almacenó en tubos con interior estéril utilizando el citrato sódico como anticoagulante. Posteriormente los tubos

se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm. Se obtuvo así un sobrenadante plaquetario de 3 ml al que se le añadió 1 ml de cloruro cálcico. Este concentrado fue el que se administró bajo condiciones estériles dentro del espacio articular de la rodilla del conejo.



4.5

CULTIVO DE LAS CÉLULAS MADRE

El tejido adiposo obtenido en la intervención abdominal, se preservó en solución salina a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Para el aislamiento de las células madre mesenquimales en él contenidas, se sometió a una minuciosa digestión mecánica seguida de una digestión enzimática con colagenasa tipo II hasta la completa disgregación del tejido.

La muestra digerida fue centrifugada a 720 g durante 10 minutos y posteriormente se eliminó el sobrenadante (que contiene el componente lipídico) y se re-

cuperó el pellet, que compone la denominada fracción del estroma vascular (FSV).

Las células obtenidas fueron cuantificadas mediante el método azul triptán y se sembraron en superficies plásticas y fueron mantenidas en cultivo durante 5-7 días hasta alcanzar el estado de preconfluencia, momento en el cual fueron tripsinizadas para su posterior implante en la cavidad articular de los animales de experimentación.

4.6

DESCRIPCIÓN DEL ÁCIDO HIALURÓNICO UTILIZADO

El ácido hialurónico que se utilizó en nuestro estudio es el principio activo del HYALGAN (Biofarma), nombre comercial de un medicamento aprobado por la Agencia Española del Medicamento y comercializado en 39 países para el tratamiento de las afecciones del cartílago articular.

HYALGAN es una solución acuosa tamponada, no pirogénica y estéril,

que contiene una fracción de sal de sodio del ácido hialurónico de peso molecular alto (entre 500.000 y 730.000 Daltons), con un elevado grado de pureza y definición molecular. Hyalgan se presenta en jeringas precargadas monodosis con 2 ml de solución para uso inmediato mediante inyección intrarticular, que administramos bajo estrictas condiciones de asepsia una vez cerrada la articulación.



4.7

DISTRIBUCIÓN DE LOS GRUPOS

Se operaron un total de 24 conejos, a razón de 2 rodillas por cada animal, el total fue de 48 rodillas, distribuidas de la siguiente manera.

	AH	AH + CMM	FC	FC + CMM	AH + FC	AH+FC +CMM	Suero +CMM	Control	TOTAL
2 semanas	2	3	3	3	3	3	2	1	20
4 semanas	3	2	3	2	3	3	3	3	22
TOTAL	5	5	6	5	6	6	5	4	42

AH: Ácido Hialurónico
CMM: Células madre mesenquimales
FC: Plasma rico en plaquetas



SACRIFICIO DE ANIMALES Y OBTENCION DE LAS MUESTRAS

Para el sacrificio de los animales se siguió un protocolo de sedación similar al utilizado en la preinducción anestésica con ketamina y medetomidina. Posteriormente se les administró 500 mg de tiopental sódico intravenoso para la eutanasia.

Tras el fallecimiento del animal, realizamos una disección de la rodilla,

hasta dejar al descubierto todo el extremo distal del fémur y la zona metafisaria. Con una sierra metálica seccionamos a nivel de la zona metafisaria y con ayuda del bisturí desprendimos toda la epífisis femoral de los tejidos blandos que la rodeaban. Los bloques obtenidos fueron fijados en formol al 10% hasta su posterior manipulación.

4.9

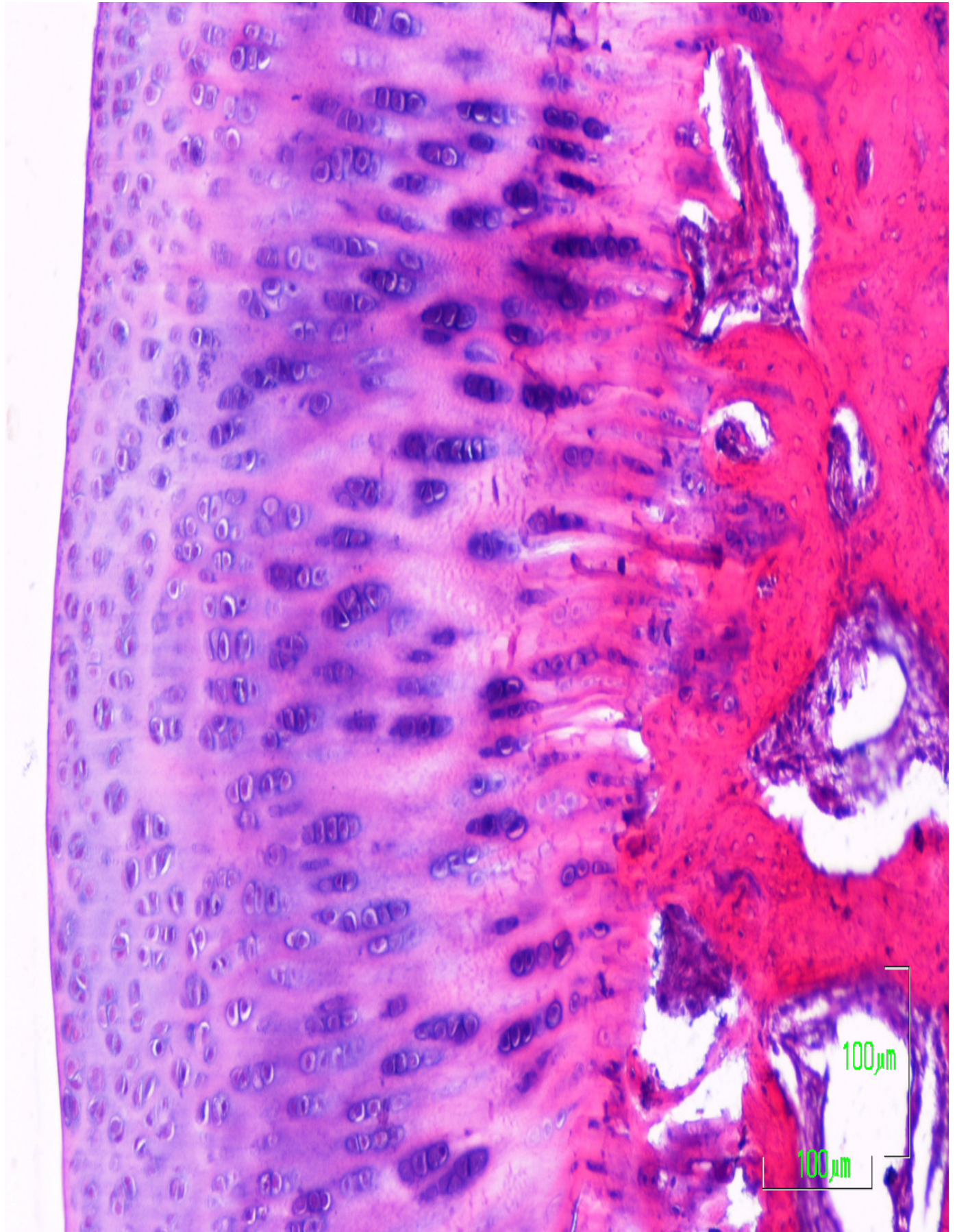
PREPARACIÓN Y ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS MUESTRAS

Las piezas de epífisis femoral de los conejos fueron seccionadas para la obtención de rodajas perpendiculares a la superficie articular que incluían el área de lesión. Dichas rodajas fueron sumergidas en Biodec R (decalcificante comercial) en el que permanecieron 12-16 horas, y posteriormente fueron lavadas en agua corriente, deshidratados en alcohol etílico y aclarados con tolueno para su inclusión en parafina. Los bloques de parafina conseguidos fueron seccionados a 10 micras con un microtomo de parafina para la obtención de cortes histológicos. Los cortes se tiñeron con Hematoxilina/Eosina.

Las preparaciones fueron estudiadas y fotografiadas con un microscopio NIKON Eclipse 90i. En las secciones se valoraron, la estructura del cartílago articular, la presencia de fisuras, esto es la integración del tejido neoformado en el área de lesión con las zonas vecinas, la celularidad del tejido cartilaginoso desde el punto de vista de la hipertrofia y la hiperplasia condrocitaria, las características de la matriz, fibrosa, hialina o tejido conectivo. Asimismo, se valoró la conducta del hueso subcondral, en los referente a la osteogénesis, la vascularización y los fenómenos inflamatorios



RESULTADOS



5.1

INTRODUCCIÓN

La exposición de los resultados en el presente trabajo, se realizará describiendo los hallazgos histológicos obtenidos en los distintos grupos comenzando por el grupo control, es decir aquellos animales a los que únicamente se les realizó la intervención quirúrgica, y a continuación aquellos grupos a los que se les administró una sola sustancia, Ácido hialurónico, Células madre, o Plasma enriquecido en plaquetas, y a continuación aquellos grupos

en los que se administraron de forma combinada, Ácido hialurónico mas plasma, Ácido hialurónico mas células, Plasma y Células, y finalmente el grupo al que se le administraron los tres compuestos Ácido Hialurónico mas Plasma mas Plasma enriquecido. En cada grupo, se comentaran primero los hallazgos correspondientes a la etapa temprana , dos semanas y a continuación los de cuatro semanas.

*Imagen: *Cartílago articular*. Se observan las distintas capas del cartílago, así como el hueso subcondral y la tidemark o línea limitante. Obsérvese asimismo la disposición variable de los condrocitos y la matriz extracelular del cartílago. Nótese la disposición del tejido conectivo y los vasos sanguíneos dispuestos entre las trabéculas el hueso subcondral.

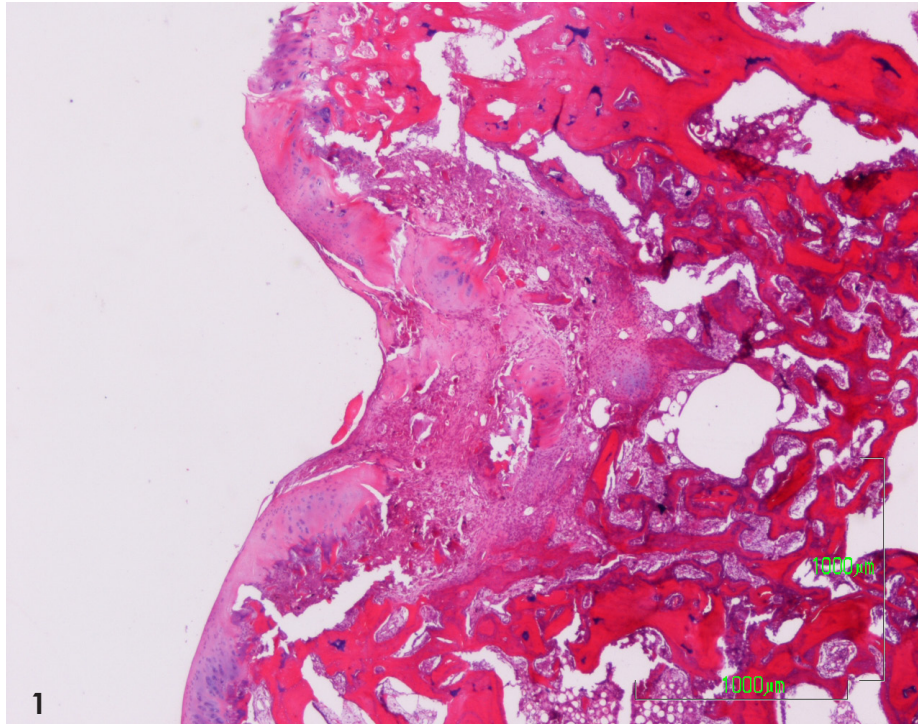
5.2

GRUPO I

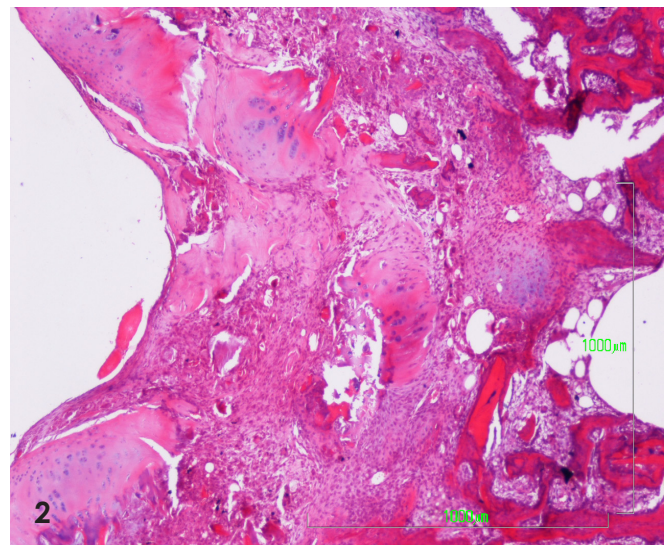
El grupo I corresponde a aquellos animales a los que únicamente se les realizó la lesión quirúrgica y fueron sacrificados a las dos y cuatro semanas de evolución.

A las dos semanas de evolución, la panorámica (Fig.1) muestra la lesión, con la superficie articular deprimida formando un cráter (Fig.1), limitado lateralmente por cartílago articular de apariencia histológica normal a este aumento, aunque presentando menor espesor que el cartílago articular normal. Los bordes laterales de la lesión, en superficie muestran la transición al cartílago normal, estando constituidos por un cartílago hipocelular con pérdida de la arquitectura

citológica. Este cartílago se incurva hacia la profundidad formando la pared superficial de la lesión, presentando fisuras tanto longitudinales como horizontales (Fig.1). Además este cartílago asienta, no sobre hueso, sino sobre distintas variedades de tejido conectivo, englobando fragmentos de cartílago y esquirlas de hueso (Fig.1). Asimismo es frecuente la presencia de luces vasculares dilatadas (Fig.1). En la profundidad de la lesión existe una transición de tejido conectivo a hueso trabecular (en origen subcondral) que presenta como característica el estar formado por trabeculas óseas de menor grosor que las presentes en circunstancias normales (Fig.1)

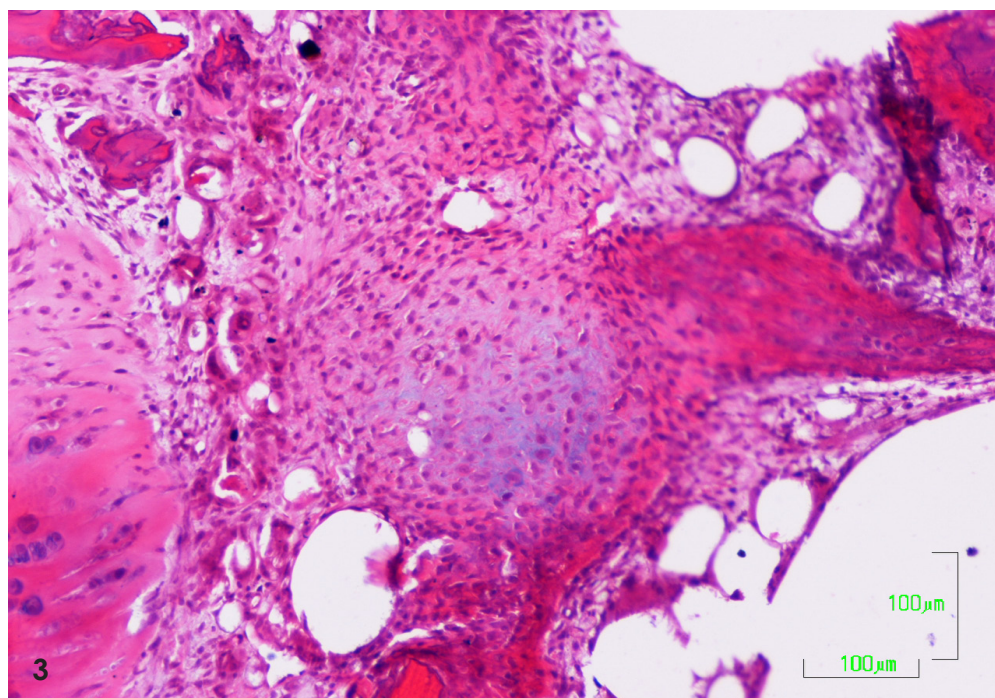


A mayor aumento (Fig.2), podemos observar la desestructuración del área de lesión, la gran imbricación de los restos de cartílago y hueso con el tejido conectivo adyacente, marcadamente celular (Fig.2). Nótese que la superficie articular de la lesión está parcialmente revestida por lengüetas de tejido conectivo (Fig.2). En el centro y los bordes laterales se encuentran fragmentos de tejido cartilaginoso que presentan distintos grados de alteración, celular y de matriz, algunos de los cuales están relacionados con hueso trabecular (Fig.2), y en ocasiones, fragmentos de tejido óseo rodeados por tejido conectivo (Fig.2).



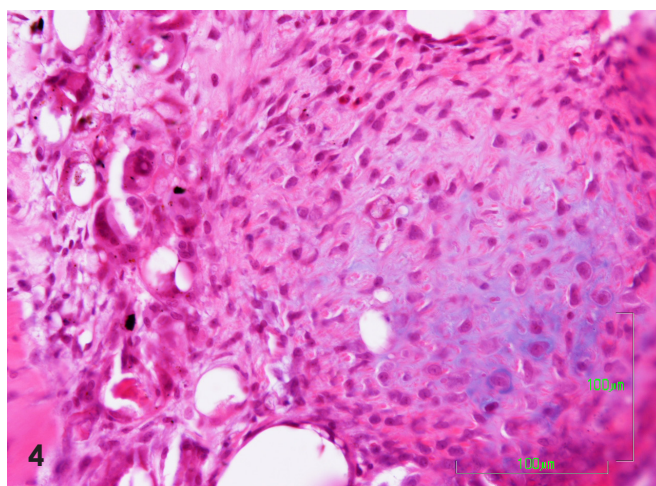
*1.-Panorámica del área de lesión con fragmentos de cartilago articular, restos de tejido óseo y hueso trabecular subcondral asociados a luces vasculares dilatadas.

**2.-Semipanorámica del área de lesión, donde se percibe la superficie deprimida, fragmentos de cartilago celular, fragmentos de tejido óseo, y de forma reactiva, zonas de cartilago inmaduro, tejido conectivo, signos de neosíntesis ósea y vasos sanguíneos.



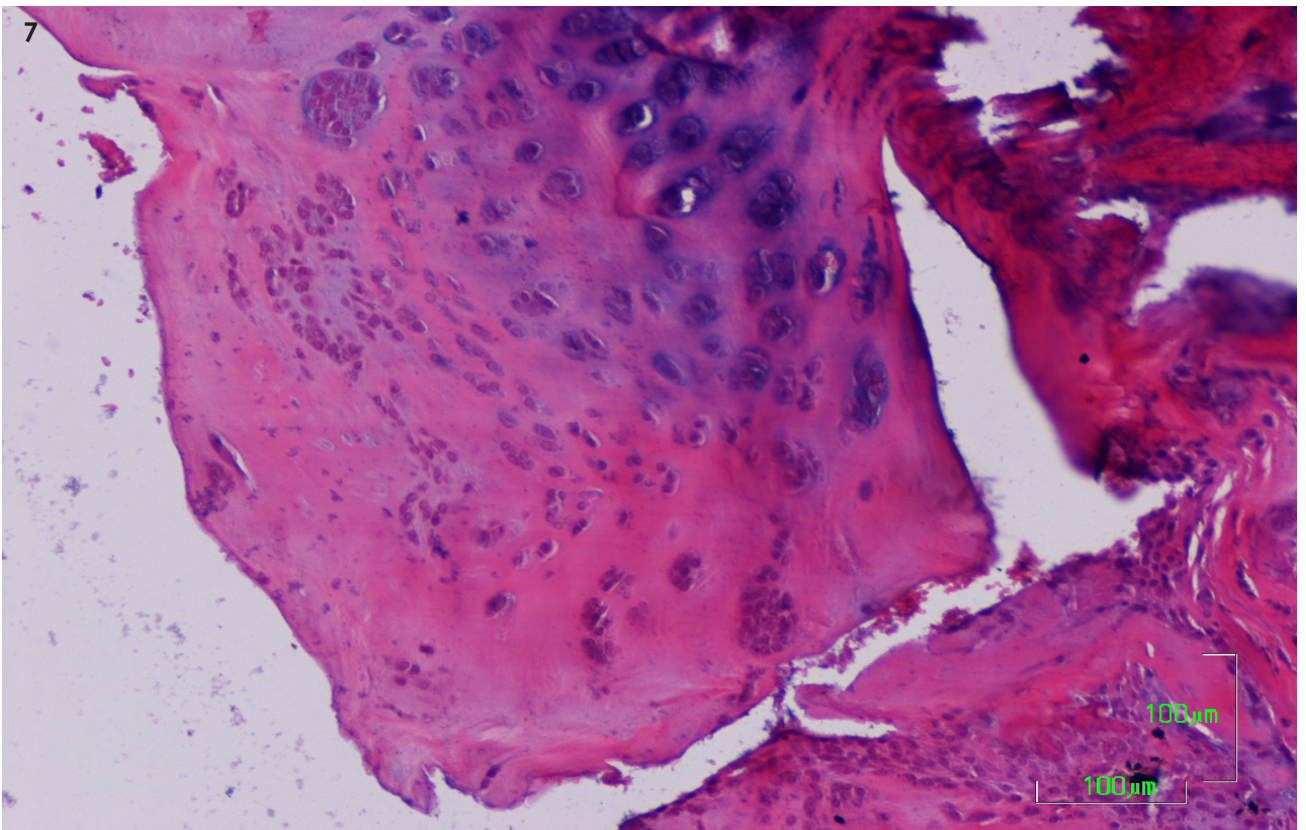
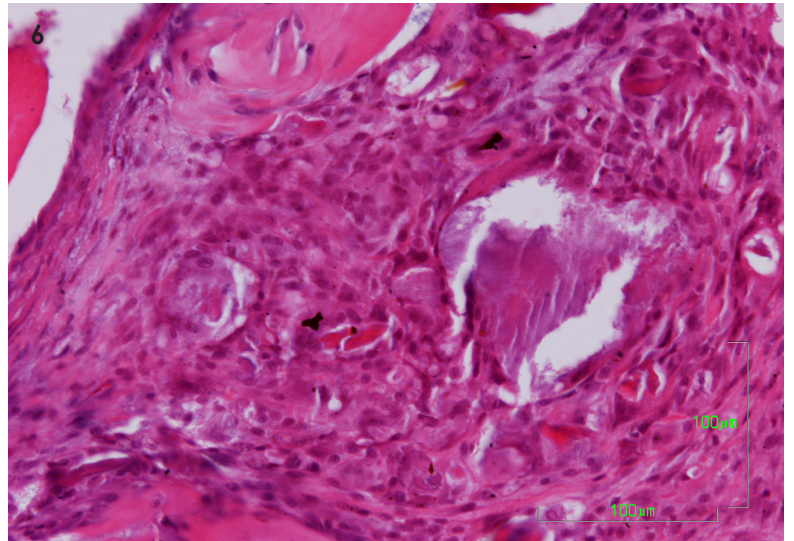
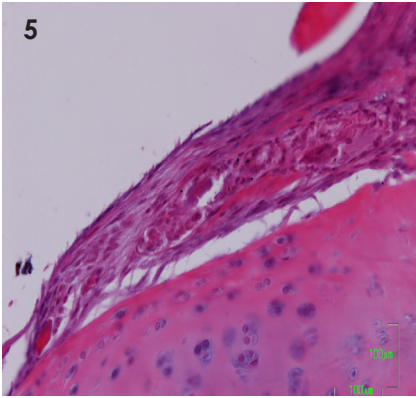
El estudio detallado a mayor aumento (Fig. 3,4,5,6 y7) nos permite valorar, en primer lugar los signos reactivos como son el desarrollo y relleno de la cavidad por tejido conectivo celular con abundantes vasos(Fig.3), que engloba los fragmentos de cartílago resultantes de la lesión (Fig.3) y focalmente la diferenciación de tejido conectivo en tejido cartilaginoso inmaduro (Fig. 3 y 4) constituido por células rodeadas de una matriz basófila (Fig.4). en la superficie de la lesión, más concretamente en los bordes laterales, el tejido conectivo ha proliferado recubriendo el cartílago articular vecino (Fig.5).Este tejido conectivo presenta una mayor ordenación de las células, dispuestas en paralelo en las zonas más superficiales, así como un mayor desarrollo del componente fibrilar (Fig.5). En algunas zonas laterales, el cartílago articular presenta características citológicas normales (Fig.5). Los restos de tejido óseo, desorganizados, se encuentran

rodeados por tejido conectivo y no presentan signos de actividad (Fig.6). En los bordes de la lesión (Fig.7) el cartílago articular presenta (Fig.7) desestructuración arquitectural consistente en pérdida de las características tintoriales de la matriz, desorganización de la arquitectura celular y alteración en el número y disposición de los condrocitos, presentando además condronas hipertróficas (Fig.7).



3.-Fragmentos de cartílago y cartílago inmaduro, asociados a restos de hueso en periodo de remodelación, así como neosíntesis ósea.

4.-Cartílago poco diferenciado, hiper celular, en estrecha asociación con tejido conectivo vascularizado.

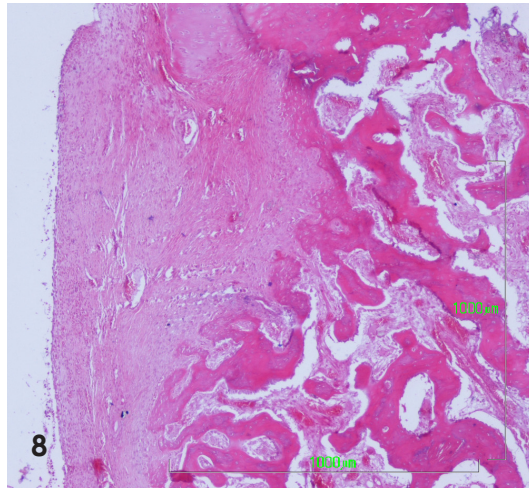


5.-Detalle donde se observa la porción superficial, articular del área de lesión. Nótese que el cartilago se encuentra revestido por tejido conectivo vascularizado.

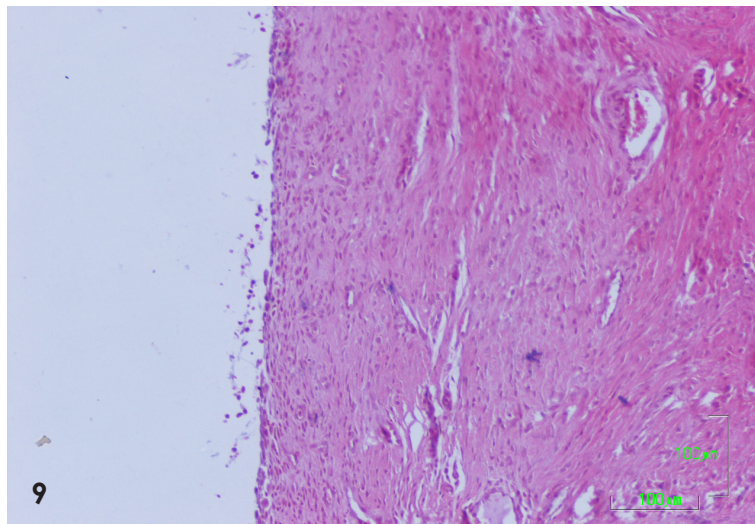
6.-Detalle de tejido conectivo de granulación hiper celular y un fragmento de tejido óseo.

7.-Restos de cartilago mostrando la arquitectura alterada, tanto en la disposición celular como en la matriz cartilaginosa. Los condrocitos han proliferado de forma anárquica dando lugar a condronas hiper celulares, fenómeno frecuente en las lesiones de tipo artrósico.

El grupo de animales estudiado a las cuatro semanas de la intervención presenta en general una lesión rellena en su porción superficial por tejido conectivo moderadamente denso, hipercelular, bien vascularizado (Fig. 8 y 9), el borde articular de la lesión se encuentra alineado con el cartílago articular adyacente (Fig.8), sin presentar depresión superficial que era la norma en el subgrupo anterior. La profundidad de la lesión está ocupada por hueso trabecular con signos de síntesis ósea (Fig.8), que se continua con el hueso trabecular adyacente (Fig.8)

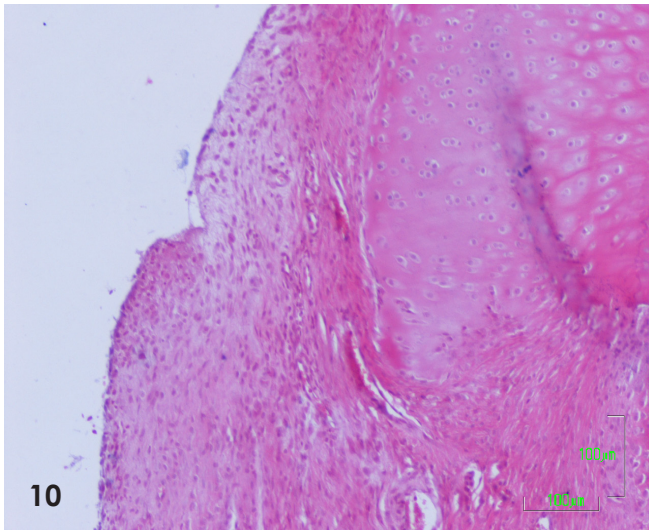


En la figura 9 se muestra, a mayor aumento una imagen representativa de la superficie articular del área lesionada que está constituida por tejido conectivo denso, celular con vasos sanguíneos y una orientación celular y fibrilar paralela a la superficie (Fig.9). La superficie articular, se encuentra revestida por una capa celular simple que focalmente recuerda al epitelio sinovial, y por encima del mismo se observa un exudado celular (Fig.9).

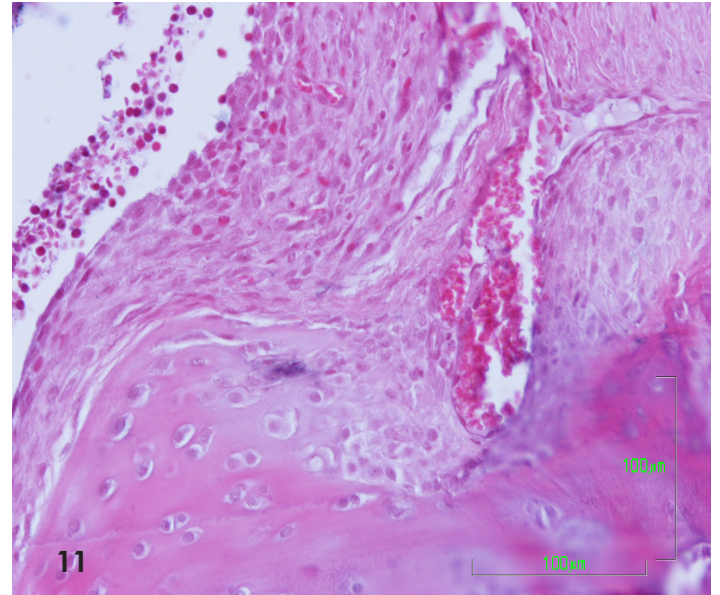


8.-Panorámica de la lesión, de borde no deprimido, constituida fundamentalmente por tejido conectivo, cartílago en los bordes laterales y hueso neoformado en profundidad.

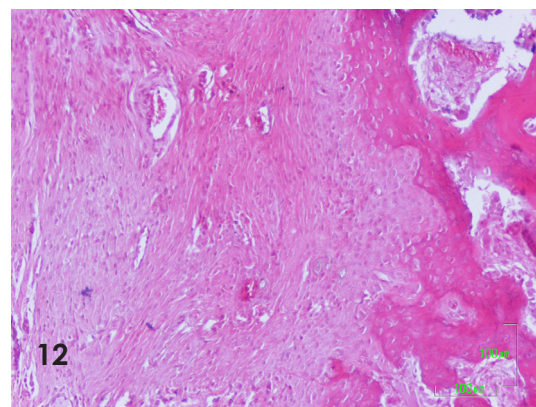
9.-A mayor aumento la porción superficial de la lesión se muestra constituida por tejido conectivo vascularizado, más fibroso que el presente a las dos semanas, en la superficie articular se observa un discreto exudado celular constituido por leucocitos y macrófagos.



Los bordes laterales de la lesión, en contacto con el cartílago articular adyacente (Fig. 10 y 11) muestran una buena integración del tejido conectivo con el cartílago. En ocasiones, el tejido conectivo se densifica adoptando una apariencia similar al pericondrio del cartílago hialino (Fig.10). En otros casos (Fig.11) , se observan imágenes que parecen indicar la transición de tejido conectivo a tejido cartilaginoso(Fig.11). A este aumento se comprueba que el exudado que recubre la superficie articular de la lesión está constituido por células mononucleares y algún leucocito (Fig.11).



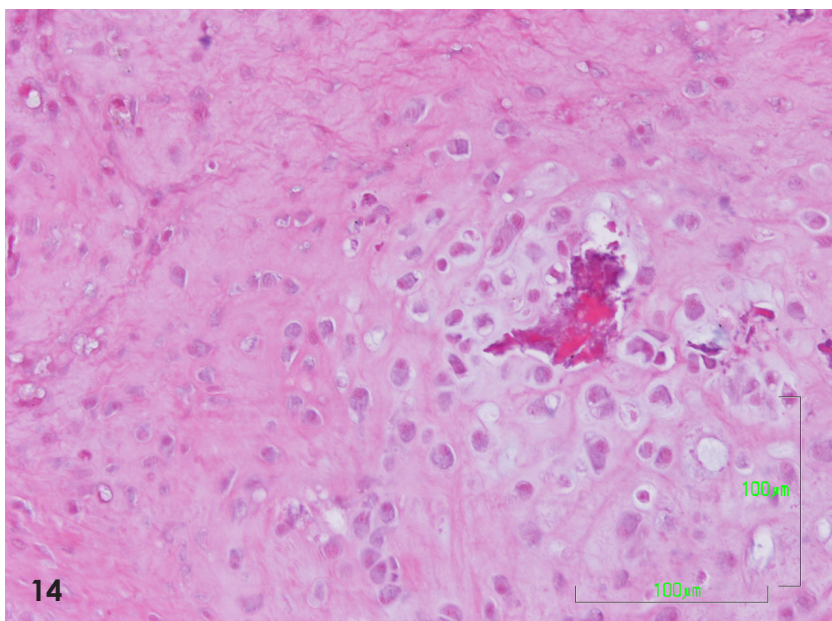
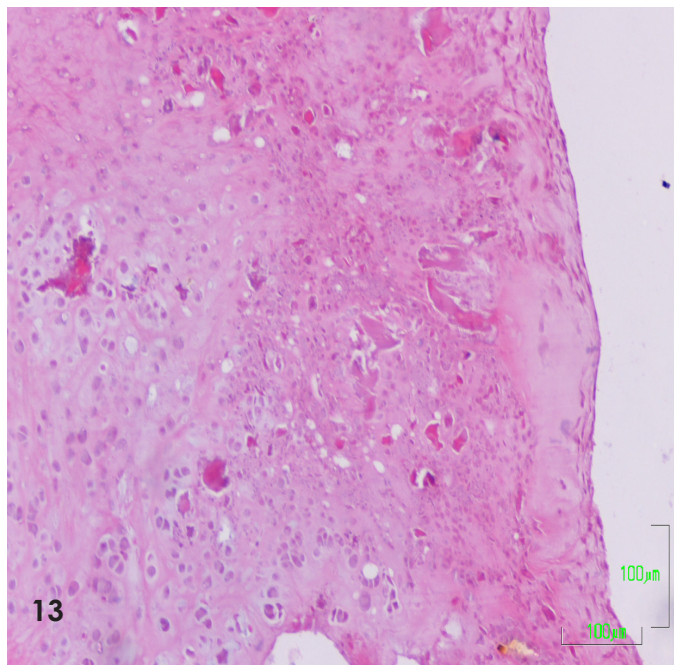
En la profundidad del área lesionada (Fig.8 y 12) se observa la transición de tejido conectivo a hueso trabecular (Fig.12). la cara del tejido óseo relacionada con el tejido conectivo muestra fenómenos activos de neoformación ósea a partir del tejido conectivo suprayacente (Fig.12).



- 10.-El borde lateral de la lesión está formado por cartílago articular revestido por tejido conectivo.
- 11.-Detalle del borde lateral de la lesión formado por tejido cartilaginoso revestido por tejido conectivo en la cara articular con un exudado superficial de células inflamatorias.
- 12.-La porción profunda del área lesionada está formada por tejido conectivo moderadamente fibroso, bien vascularizado asociado a hueso en proceso de formación.

En algunos casos se encuentran restos de tejido óseo rodeados por tejido cartilaginoso inmaduro (Fig.13) o cartílago fibroso (Fig.13 y 14), así como signos de diferenciación hacia tejido cartilaginoso en la superficie articular(Fig.13).

En algunas zonas del borde de la lesión existen intentos de restauración del cartílago articular aunque con pobre diferenciación arquitectural (Fig.15). Este cartílago presenta algunas fisuras (Fig.15) y está parcialmente recubierto por tejido conectivo (Fig.15).



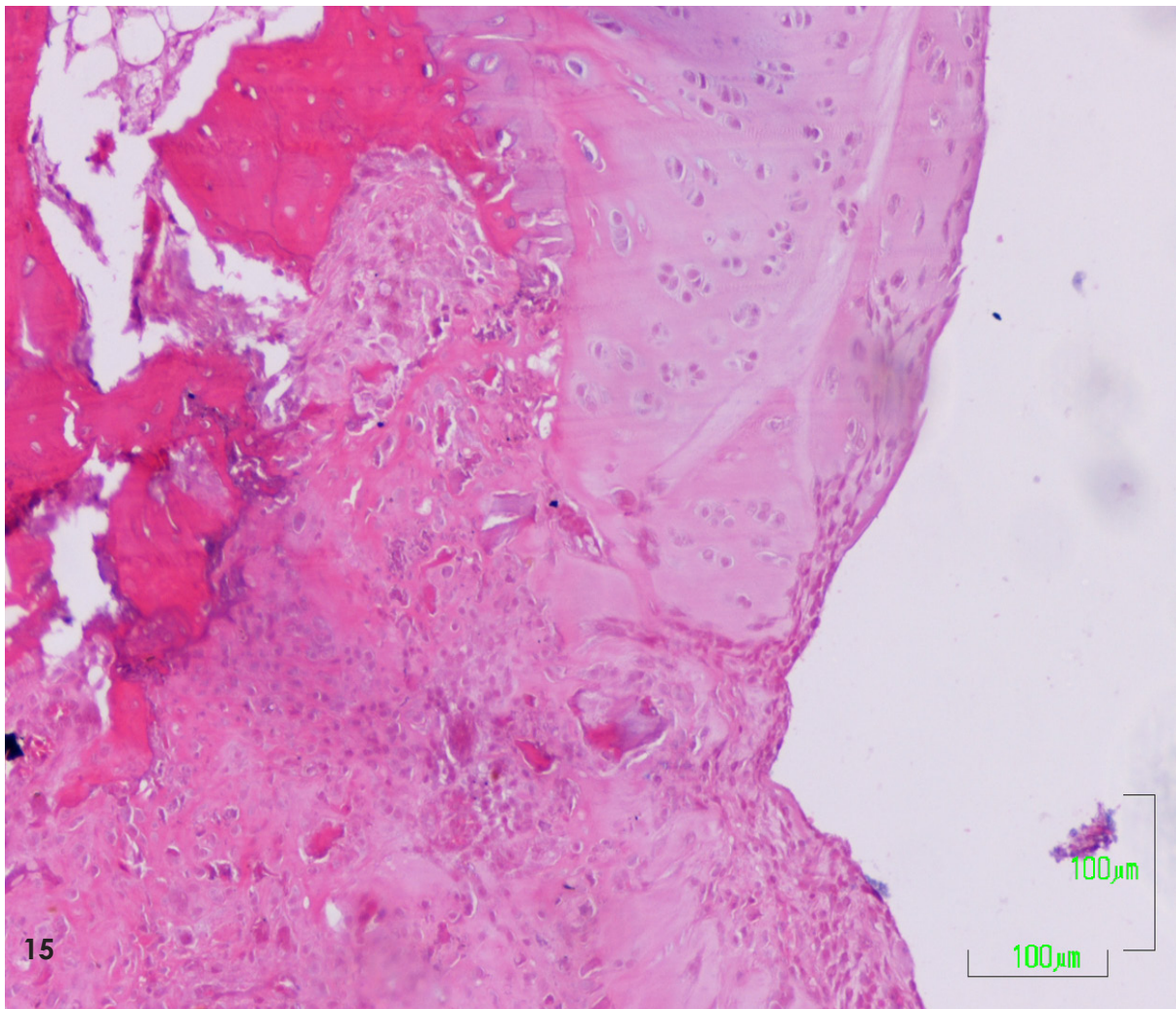
13.-Panorámica que presenta distintos fragmentos óseos resultantes del proceso de lesión.

14.-Detalle que ilustra un fragmento óseo rodeado por tejido cartilaginoso inmaduro.

15.-Panorámica que muestra el borde lateral de la zona de lesión, con tejido conectivo celular superficial que recubre al cartílago articular adyacente, que a su vez presenta alteraciones arquitecturales. La lesión presenta en profundidad fragmentos óseos englobados en tejido conectivo, cartílago indiferenciado y hueso en proceso de síntesis.

En resumen, los animales pertenecientes a este grupo experimental presentan a las dos semanas una reacción cicatricial formada fundamentalmente por tejido conectivo, con restos de cartílago y hueso postlesionales. A las cuatro semanas, la reacción evoluciona recubriendo la superficie articular por tejido conectivo, y en profundidad se observan signos de re-

generación del hueso trabecular epifisario. el cartílago de los bordes de la lesión no presenta grandes signos de regeneración, aunque se han observado focalmente algunas áreas de diferenciación cartilaginosa en el interior de la lesión. Existen el cartílago articular signos de reacción artrósica, representados por la existencia de condronas hipertróficas.

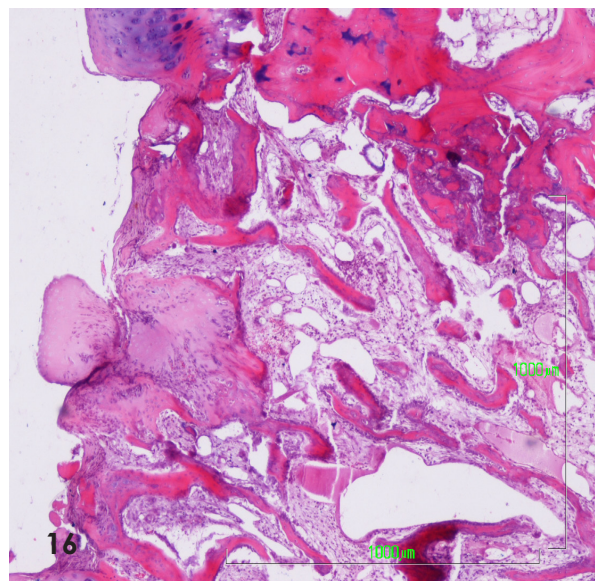


5.3

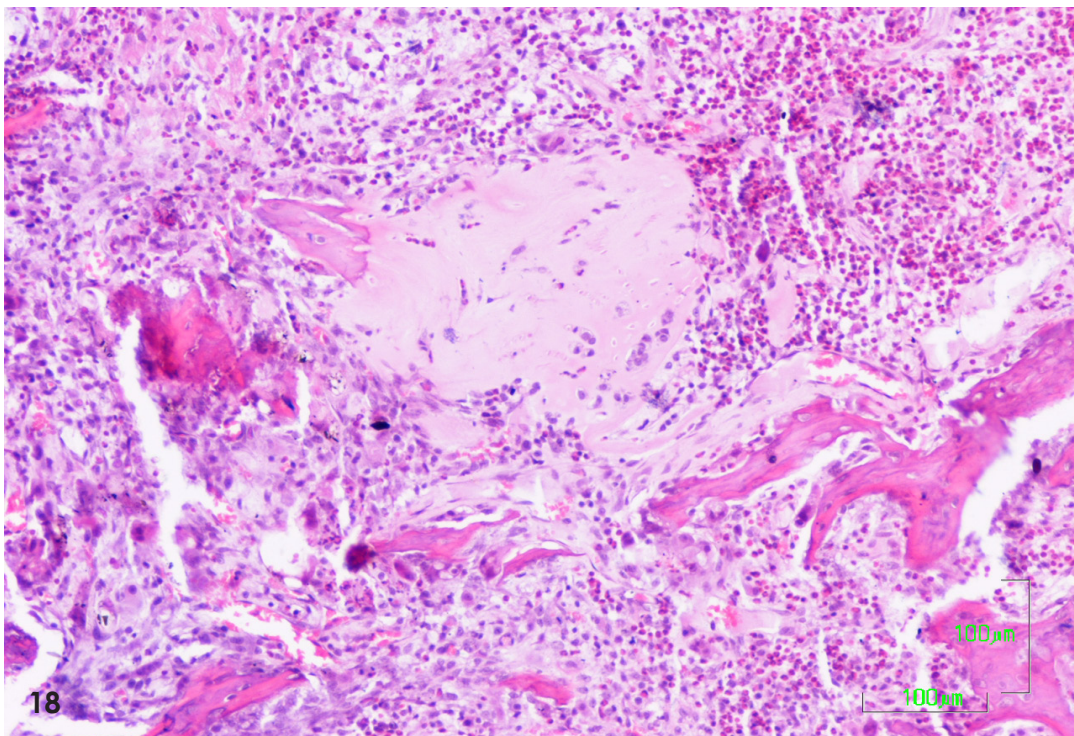
GRUPO II

Este grupo experimental esta constituido por aquellos animales , a los que además de practicarse la intervención quirúrgica se les administró ácido hialurónico intrarticularmente.

La apariencia lesional precoz (dos semanas) de los animales correspondientes a este grupo se caracteriza por un desarrollo anárquico y focal del tejido cartilaginoso articular (Fig.16 y 17), superficie articular deprimida (Fig.16), cierta preservación del cartílago articular adyacente en los bordes de la lesión (Fig.16), y en la profundidad, en general se presenta desarrollo del hueso esponjoso con finas trabéculas (Fig.16) y abundantes luces vasculares dilatadas (Fig.16).



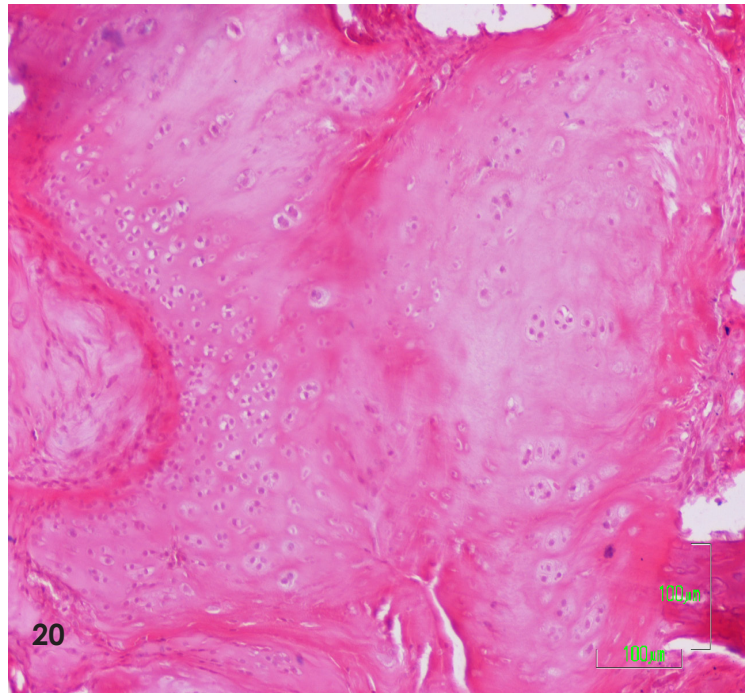
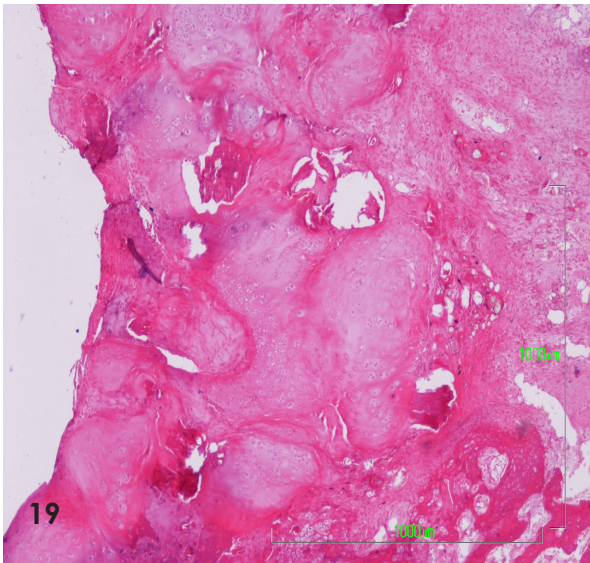
A mayor aumento, los focos de cartílago articular existentes en la lesión (Fig.17), presentaban una cierta preservación de la arquitectura del cartílago (Fig.17), aunque la matriz no presenta las características tintoriales habituales (Fig.17). en algunos casos se observó una reacción inflamatoria en la proximidad de restos de tejido cartilaginoso y hueso subcondral (Fig.18).



16.-Panorámica de la lesión con superficie parcialmente recubierta por tejido conectivo y cartílago. El hueso subcondral muestra desorganización trabecular y abundantes luces vasculares dilatadas. El cartílago no presenta relación con el cartílago articular adyacente.

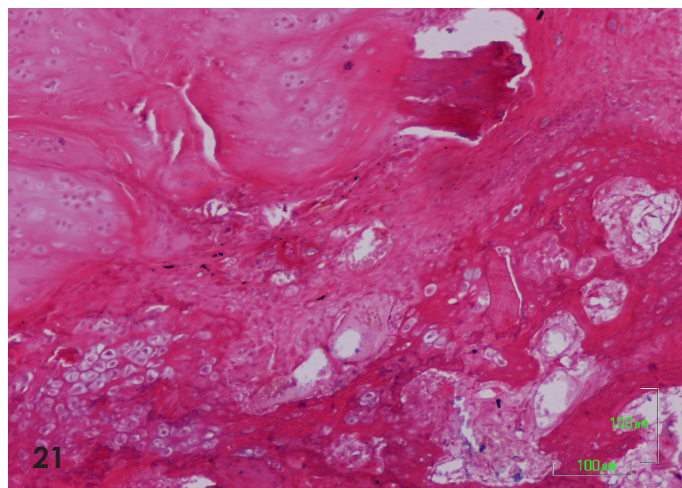
17.-Semipanorámica donde se observa el cartílago articular con escasa vitalidad celular superficial y desorganización condrocitaria en profundidad. Los límites del tejido cartilaginoso son irregulares.

18.-La profundidad de la lesión presenta áreas de tejido conectivo pobremente diferenciado junto con fragmentos de hueso en distintas etapas de reacción, todo ello englobado en un tejido conectivo infiltrado por numerosas células inflamatorias.



A las cuatro semanas de la intervención, el aspecto general de la lesión ha cambiado notablemente (Fig. 19,20,21,22 y 23). La imagen panorámica de la lesión muestra una superficie articular levemente deprimida tapizada por cartílago que ocupa toda la extensión dañada, dando por resultado un tejido cartilaginoso de un espesor 5 a 6 veces superior al cartílago articular normal (Fig.19). este cartílago se relaciona con fragmentos de tejido óseo (Fig.19,21), que en general no se encuentra muy desarrollado (Fig.21). El cartílago neoformado recuerda al cartílago hialino con zonas de cartílago pobremente diferenciado (Fig.19,21) y algunas áreas que parecen cartílago fibroso (Fig.20).

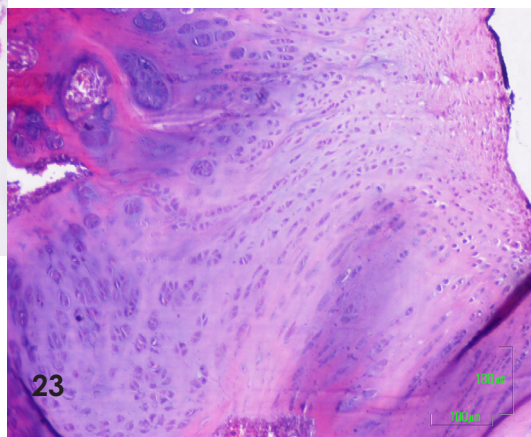
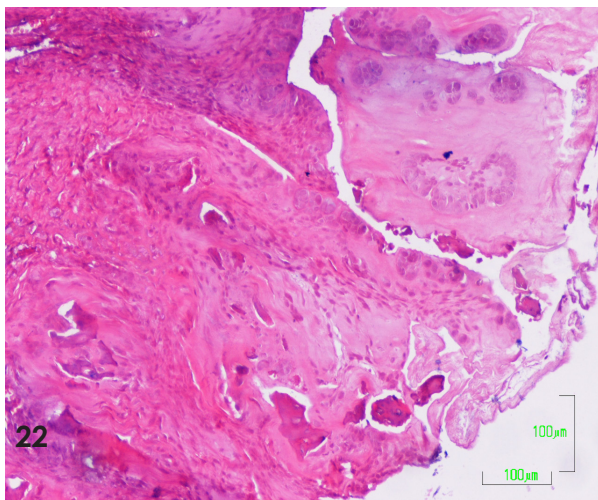
No hemos encontrado en general, preservación de la disposición arquitectural del cartílago articular, los condrocitos, aislados o en condronas, no presentan una distribución ordenada (Fig.20), y en ocasiones se produce una transición de este cartílago al hueso vecino en formación (Fig.21). en los bordes de la lesión el cartílago neoformado se relaciona con tejido conectivo y escasos restos de tejido óseo (Fig.22), y es frecuente encontrar condronas hiperplásicas, signo de sufrimiento cartilaginoso en el cartílago articular de los bordes de la lesión (Fig.22).



Focalmente y en relación con hueso subcondral se encontraron zonas de cartílago en regeneración, que remeda notablemente tanto citológica como arquitecturalmente al cartílago articular (Fig.22), pero la superficie de este, se encuentra constituida por tejido conectivo fibroso (Fig.22).

En resumen, este grupo tratado con ácido hialurónico, presenta como

signo mas importante, a las dos semanas, la escasez de proliferación del cartílago, mientras que a las cuatro semanas el cartílago se ha desarrollado notablemente, superando en espesor al cartílago articular normal. No obstante, la arquitectura cartilaginosa articular, solo se ha evidenciado cuando el cartílago está en relación con hueso subcondral. Además existe poco hueso subcondral neoformado.



19.-Panorámica del área de la lesión donde se observa una gran proliferación de tejido cartilaginoso en diversas fases de maduración y reacción. El borde articular de la lesión está constituido fundamentalmente por tejido cartilaginoso con un poco de tejido conectivo en la región central de la lesión. El espesor del tejido cartilaginoso es varias veces superior al del cartílago articular normal. En la profundidad se observan fenómenos de neoformación ósea.

20.-Detalle de distintas fases morfológicas de tejido cartilaginoso. En la profundidad está constituido por abundante matriz y condronas de celularidad normal. En la superficie se observan que el cartílago presenta más condrocitos y menos matriz, fenómeno que imita la disposición en las capas superficiales del cartílago articular normal y en el borde libre (articular) se observa una pequeña capa de tejido conectivo.

21.-Neoformación endocondral del tejido óseo en la vecindad del cartílago articular regenerado.

22.-Superficie de lesión que presenta cartílago hipertrófico y algunos fragmentos óseos englobados en tejido conectivo.

23.-Condronas hipercelulares en la profundidad del cartílago regenerado.

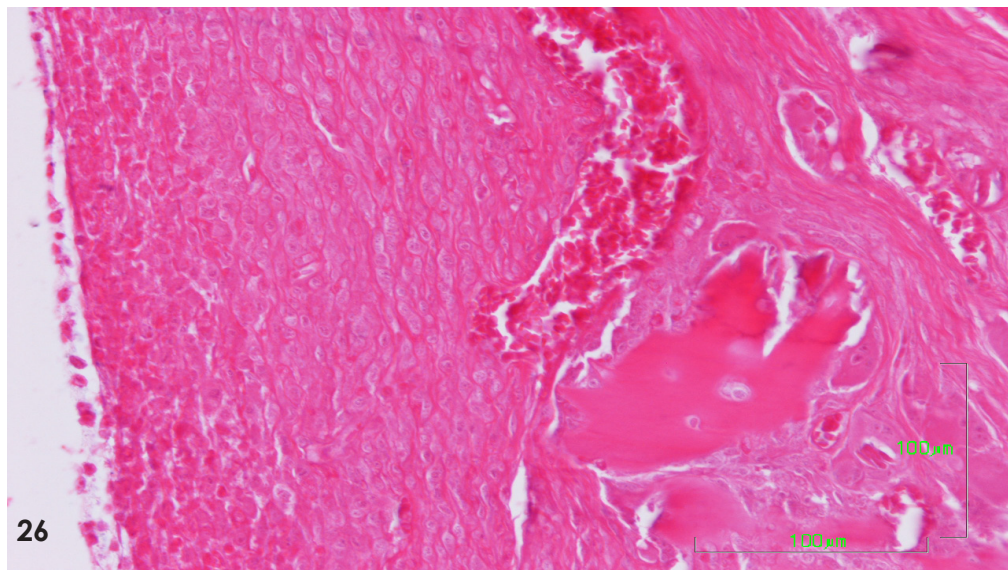
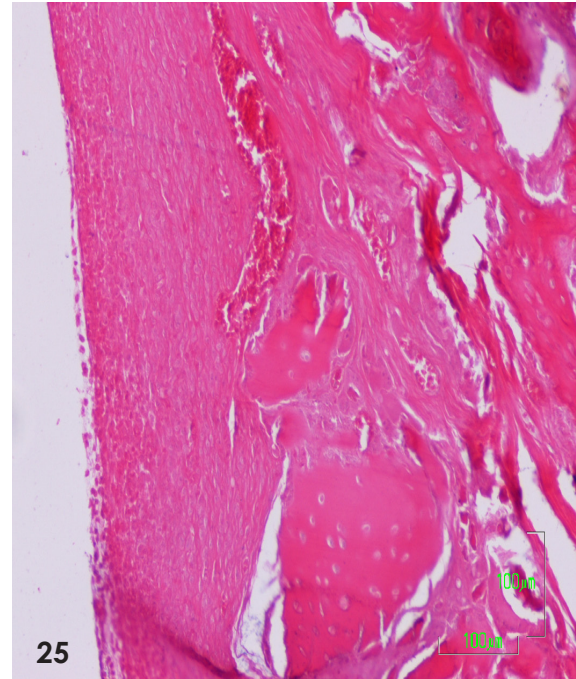
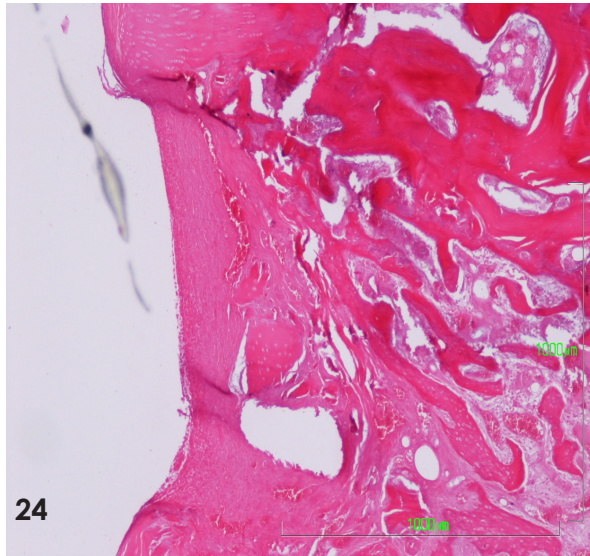
5.4

GRUPO III

Los grupos experimentales a los que se les administraron los componentes celulares, reaccionan en las etapas tempranas generando una reparación de la lesión a expensas de tejido conectivo con borde articular deprimido (Fig.24) y a las cuatro semanas se observa una pobre regeneración del cartílago (Fig.30)

La imagen histológica del área lesional a las dos semanas, en general (Fig. 24,25,26 y 27) presenta una superficie articular deprimida constituida por tejido conectivo denso (Fig.24), rico en fibras (Fig.25 y 26) y revestido articularmente por una capa monocelular que recuerda a la sinovial membranosa (Fig.26). El tejido

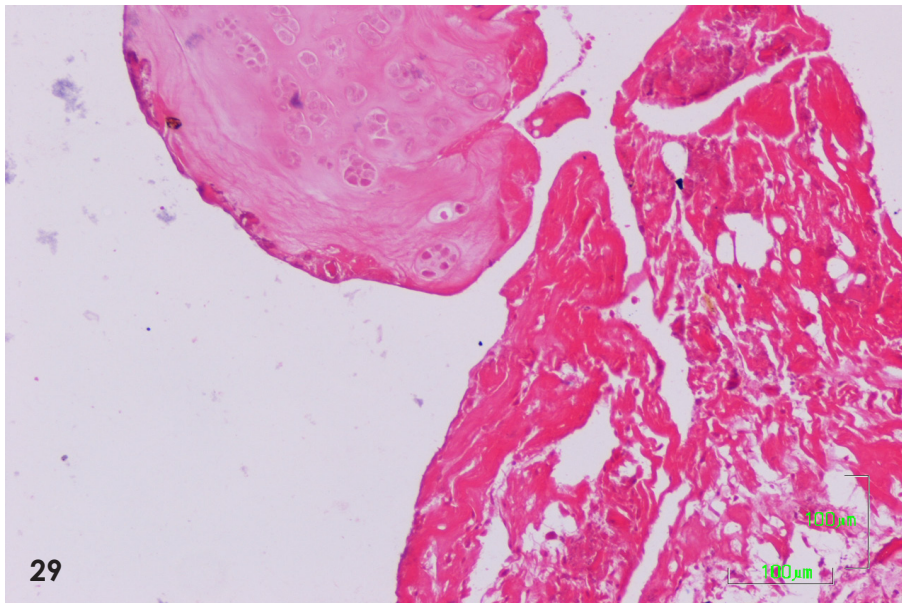
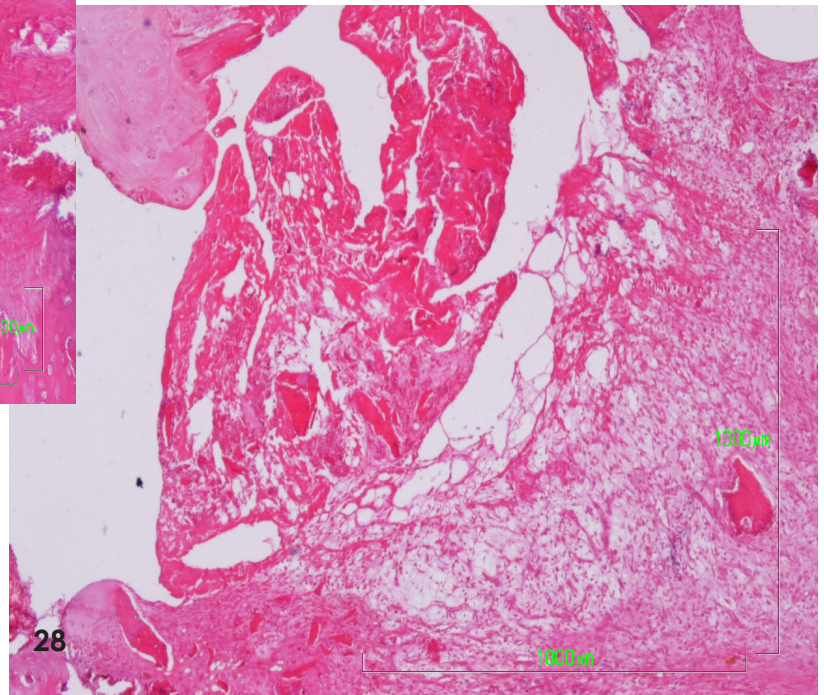
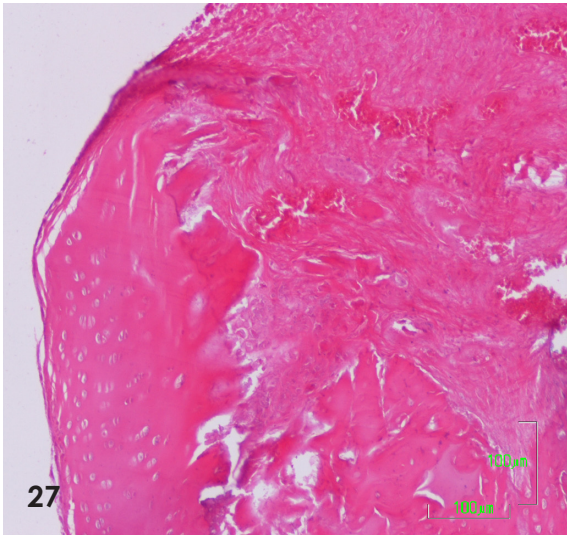
conectivo está bien vascularizado (Fig.25 y 26) y asienta sobre un armazón de finas trabéculas óseas (Fig.24,25 y 26). En los bordes laterales este tejido conectivo se funde con el cartílago articular, delgado y con pequeñas fisuras superficiales (Fig.27).. en algunos casos, el cráter de la lesión se encuentra ocupado por una mezcla de tejido conectivo laxo vacuolado y tejido conectivo denso, con algunas pequeñas áreas de necrosis y pequeños fragmentos de tejido óseo (Fig.28). el cartílago de los bordes de esta lesión presenta pérdida de la organización arquitectural y condronas hiperplásicas osteoartrósicas (Fig. 28 y 29).



24.-Borde deprimido de la lesión constituido básicamente por tejido conectivo con fibras dispuestas paralelamente a la superficie articular, con algún vaso sanguíneo en profundidad. El hueso subcondral presenta fenómenos de síntesis.

25.-Semipanorámica que muestra el tejido conectivo y el hueso subyacente.

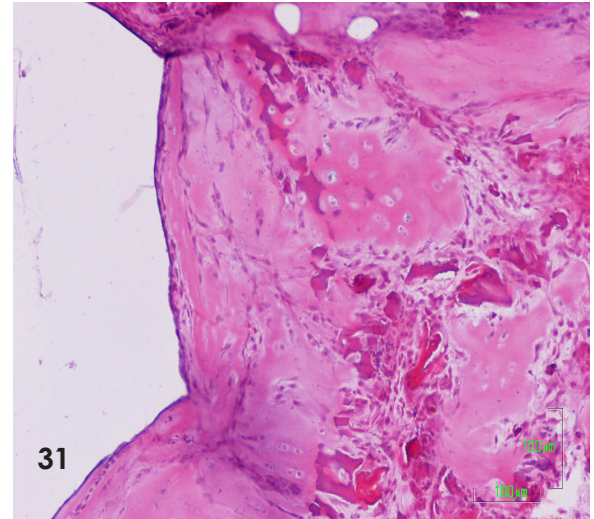
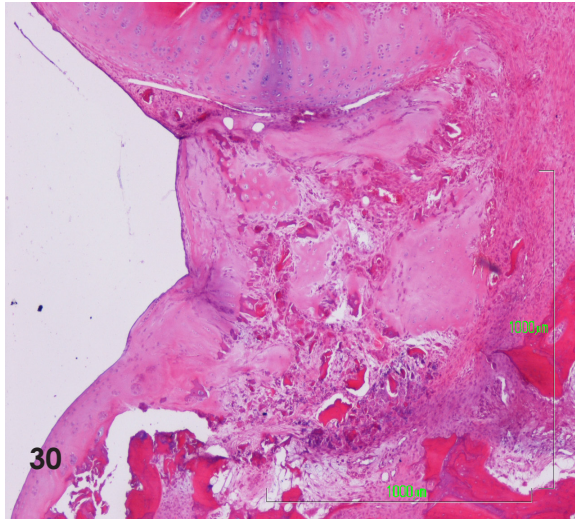
26.-Detalle de la porción central del borde de lesión donde se muestra la disposición de las fibras de tejido conectivo y un pequeño exudado celular que recubre el borde articular.



27.-Borde de lesión que ilustra el cartilago articular vecino a la lesión con la superficie fisurada horizontalmente y la pérdida de la disposición arquitectural de los condrocitos. Se ilustra asimismo la pérdida de la tidemark y la desorganización del hueso subcondral.

28.-Panorámica donde se muestra escasez de fenómenos regenerativos y un tejido conectivo edematoso ocupando el centro de la lesión englobando algunos fragmentos óseos, y más superficialmente tejido de granulación escasamente celular.

29.-El cartilago del borde lateral de la lesión presenta fenómenos reactivos de tipo osteoartrítico, como son la pérdida de la arquitectura condrocitaria y las condronas hipertróficas.

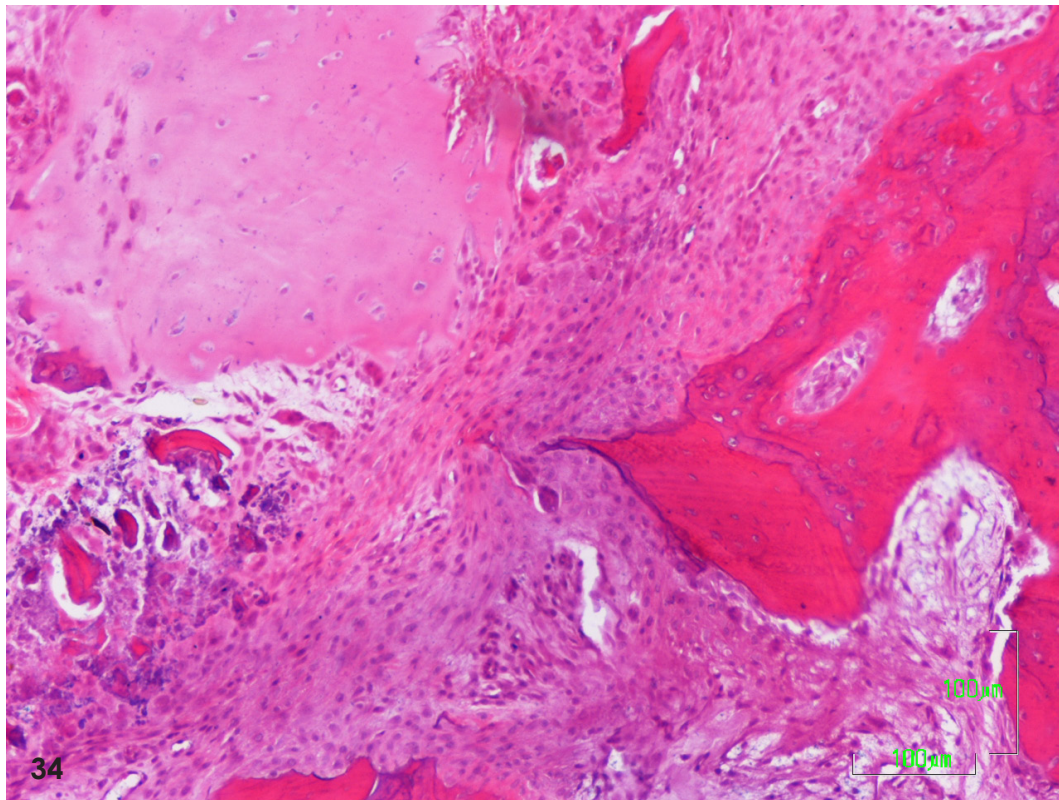
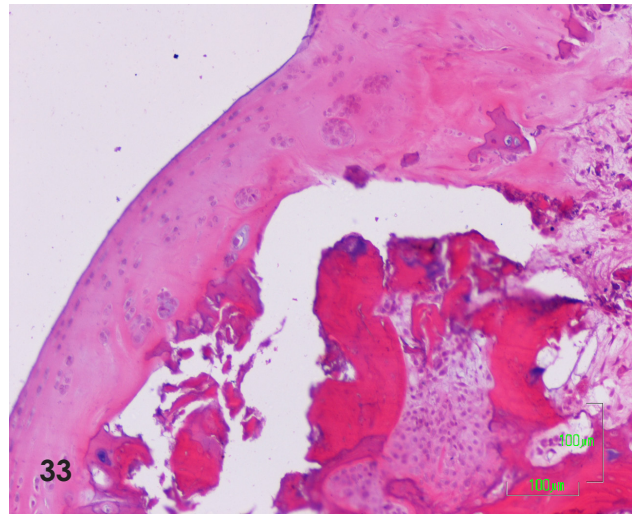
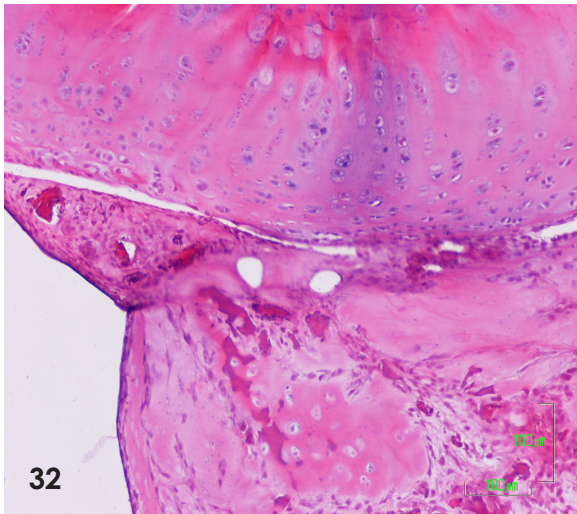


El subgrupo de mayor duración experimental (Fig.30-36), presenta una mayor riqueza de fenómenos regenerativos cartilaginosos y óseos, aunque el contorno articular de la lesión sigue estando deprimido en relación con los bordes adyacentes, normales (Fig. 30 y 31). La integración del tejido cicatricial con los bordes normales del cartílago adyacente puede presentar fisuras, generalmente perpendiculares a la superficie articular (Fig.30). El tejido reparativo propiamente dicho está constituido por una mezcla en grado variable de tejido conectivo fibroso bastante denso (Fig. 31, 34 y35), cartílago

inmaduro (Fig.31,34 y 35) y restos óseos (Fig.31,32 y 33) con algunos fenómenos de osificación (Fig.32). Los bordes de lesión pueden estar constituidos por tejido conectivo que reviste al cartílago vecino (Fig.32), por cartílago fino con condronas hiperplásicas (Fig.33), o por una mezcla de tejido cartilaginoso inmaduro, tejido conectivo que se continua con el cartílago articular(Fig.35) y un revestimiento de tejido conectivo laxo. Finalmente, el tejido cartilaginoso inmaduro del borde de la lesión puede encontrarse recubierto por tejido conectivo denso(Fig.36)

30.-Panorámica de la lesión con superficie deprimida, donde se muestran abundantes restos de tejido óseo, la relación con el cartílago articular vecino y la formación en superficie y profundidad de tejido cartilaginoso.

31.-Superficie articular del área lesionada revestida por tejido conectivo y tejido cartilaginoso inmaduro entremezclado con abundantes restos de tejido óseo.

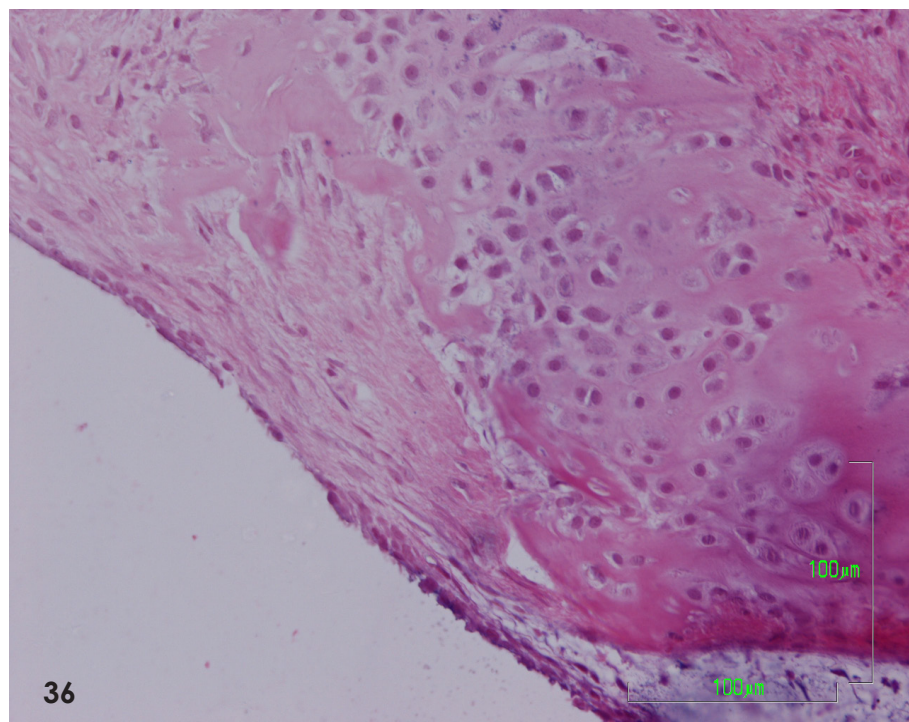
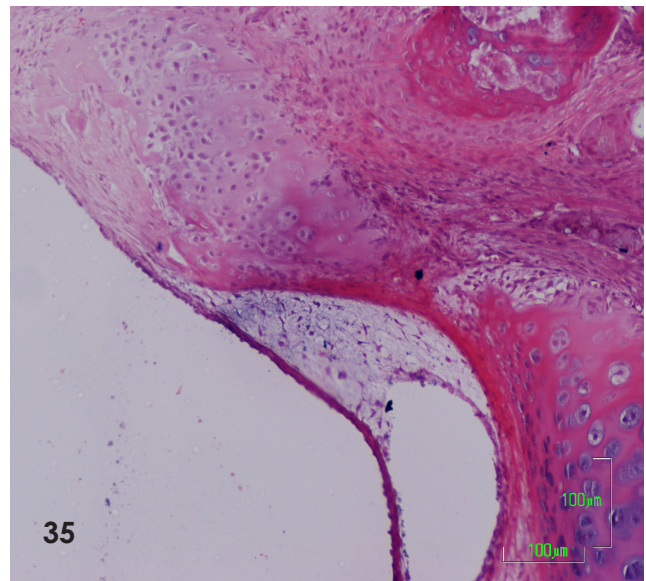


32.-Borde lateral del área de lesión. En la porción superior se ilustra el cartilago articular separado por una fisura con sinequias del área lesionada propiamente dicha. Obsérvese la disposición arquitectural de los condrocitos en el cartilago articular en contraste con la disposición anárquica de los integrantes del cartilago inmaduro, asociado a fragmentos óseos, del área lesionada.

33.-Zona de relación del cartilago del área de lesión con el cartilago articular vecino que presenta restos de la tidemar y del cartilago calcificado.

34.-En la profundidad de la lesión se observa cartilago inmaduro en relación con tejido conectivo y hueso subcondral.

En resumen el comportamiento de este grupo experimental, desde el punto de vista de la regeneración histológica, y en las etapas estudiadas, sería un intermedio entre el grupo de lesión únicamente, y el grupo al que se le administró ácido hialurónico, ya que existen a las cuatro semanas signos de regeneración del cartílago articular pero son escasos y desorganizados.



35.-En otro caso de este grupo se observa la relación del cartílago en el borde articular (porción superior) con el cartílago inmaduro de la lesión recubierto por tejido conectivo laxo con una formación quística.

36.-Detalle de la micrografía anterior que muestra la imbricación del tejido conectivo superficial con el cartílago subyacente

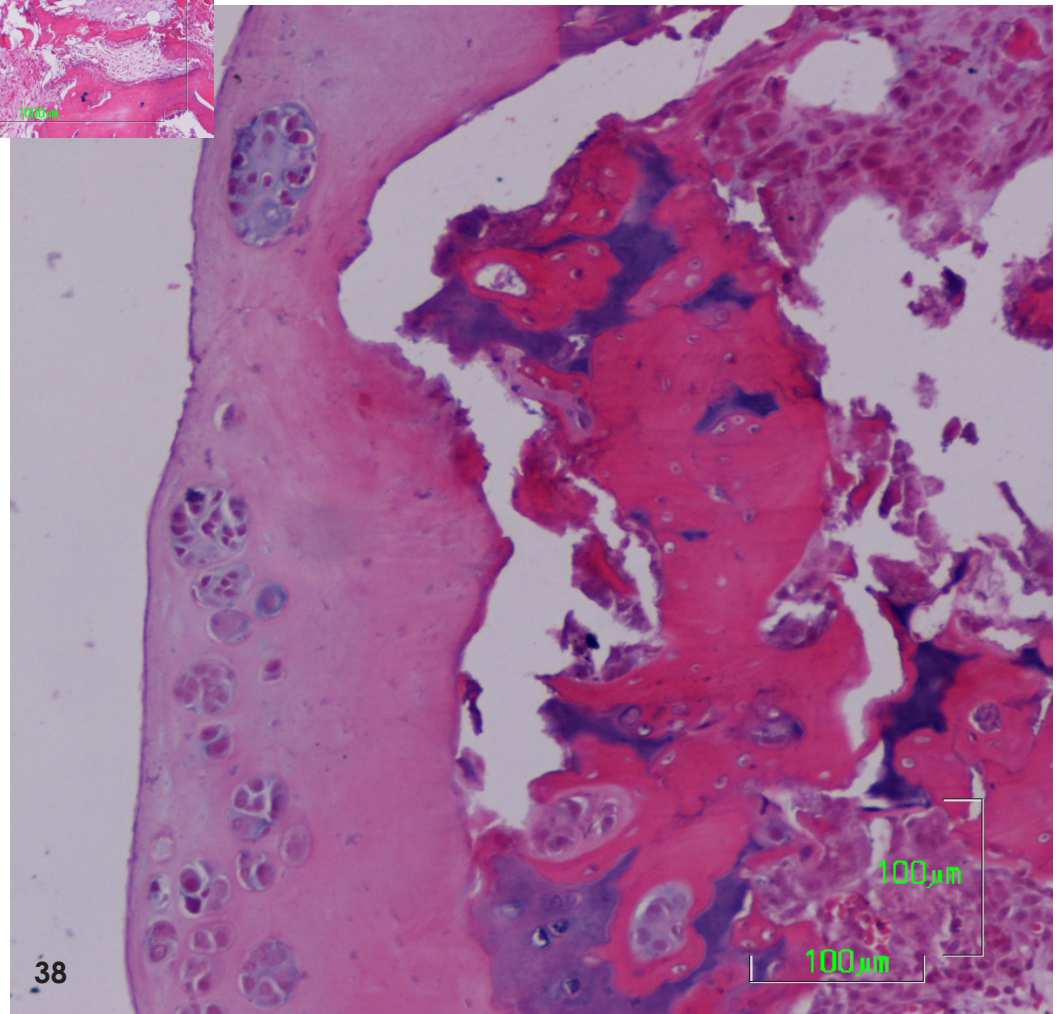
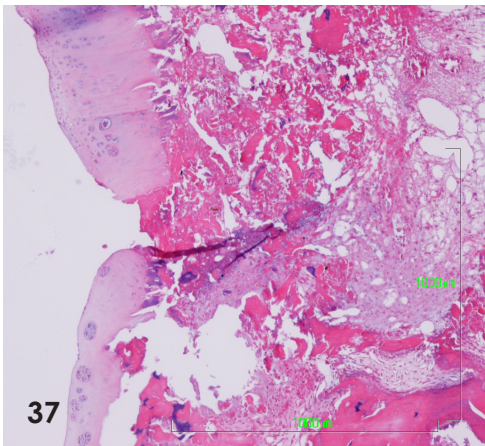


GRUPO IV

A este grupo pertenecen los animales a los que tras la intervención se les administró plasma autólogo enriquecido con plaquetas.

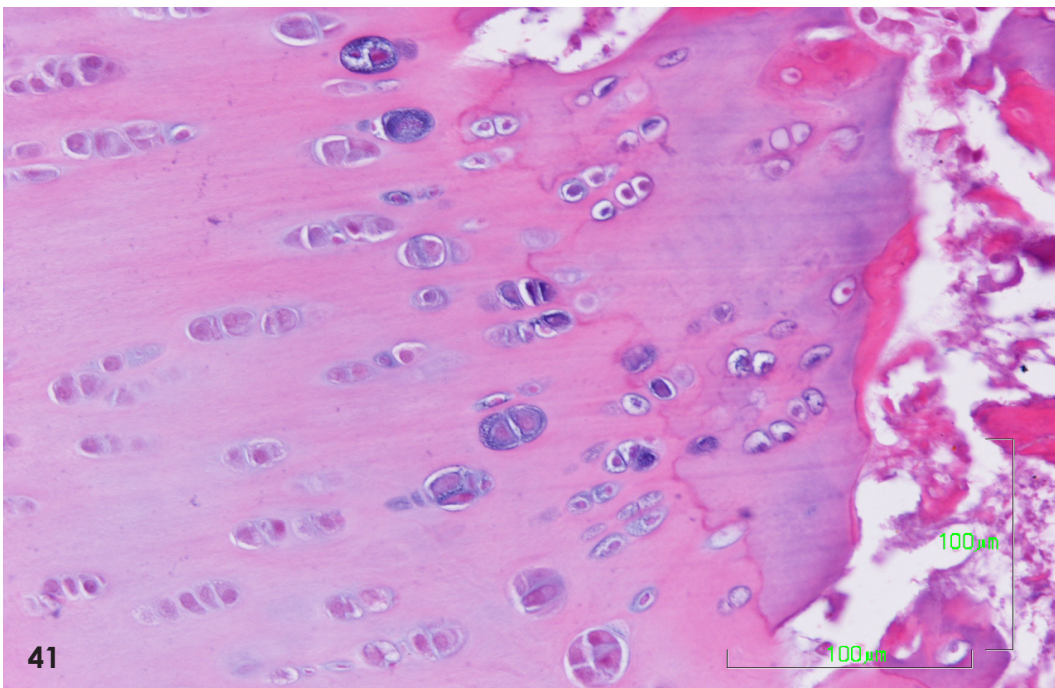
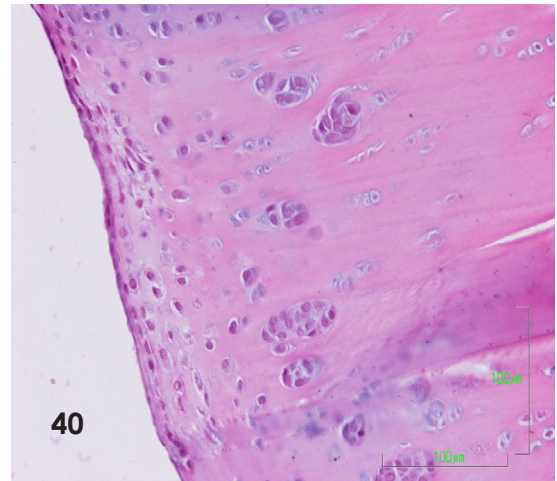
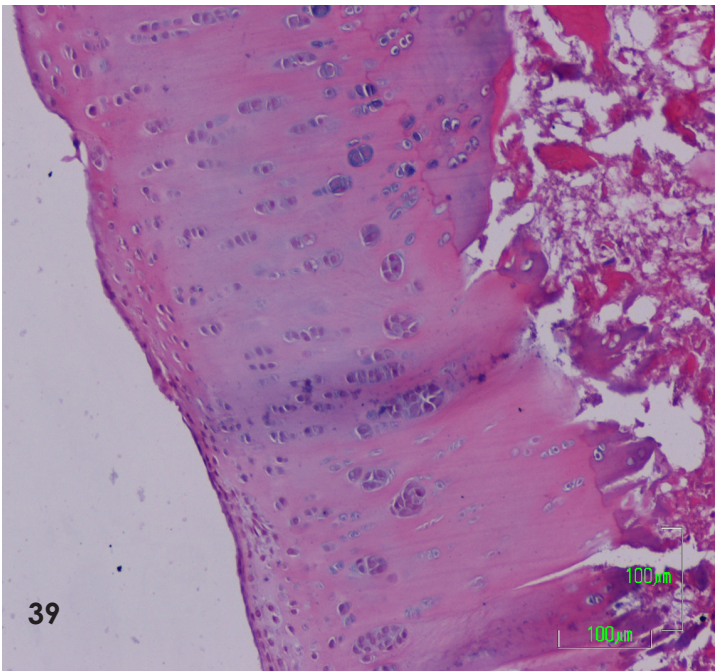
El subgrupo, cuyos animales fueron sacrificados a las dos semanas presenta, en general, una mayor preservación del cartílago articular (Fig.37,38,39 y 40), si bien en algunos casos este se presenta más adelgazado (Fig. 37 y 38) que el cartílago articular normal y con pérdida de la arquitectura condrocitaria y aparición de condronas hiperplásicas (Fig.37,38 y 40). Subcondralmente se observó la fragmen-

tación y desorganización del hueso trabecular (Fig.37,38 y39) con la existencia de fisuras longitudinales (Fig.37 y 38) y horizontales (Fig.38). En los bordes laterales se encontraron fenómenos de neoformación ósea en la profundidad (Fig.37). en algunas zonas, el cartílago reactivo presentaba además de signos de artrosis (Fig.40) una relativa conservación de la arquitectura con presencia de la tidemark (Fig.41) y cartílago calcificado (Fig.41) así como condrocitos hipertrofos suprayacentes con basofilia marcada de la matriz del condroplasma (Fig.41).

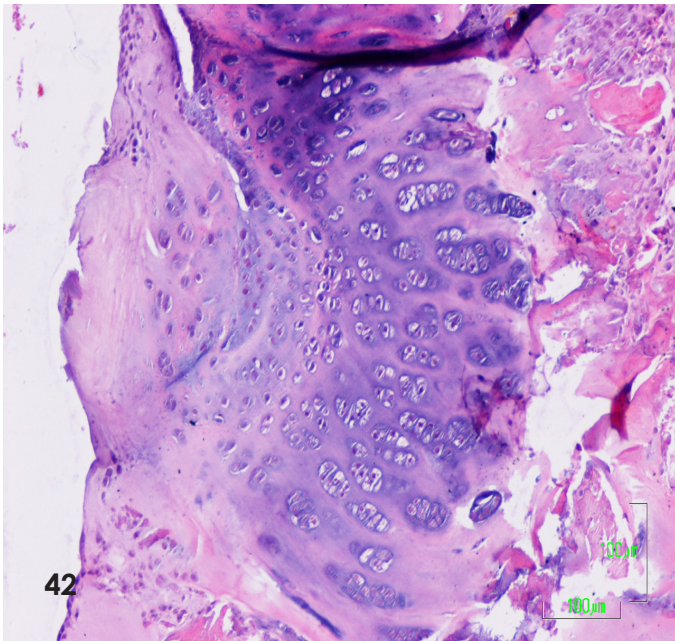


37.-Panorámica del área de lesión que se presenta recubierta casi en su totalidad por cartílago con condronas hiperplásicas. El tejido subyacente al cartílago esta constituido por tejido conectivo y hueso desorganizado.

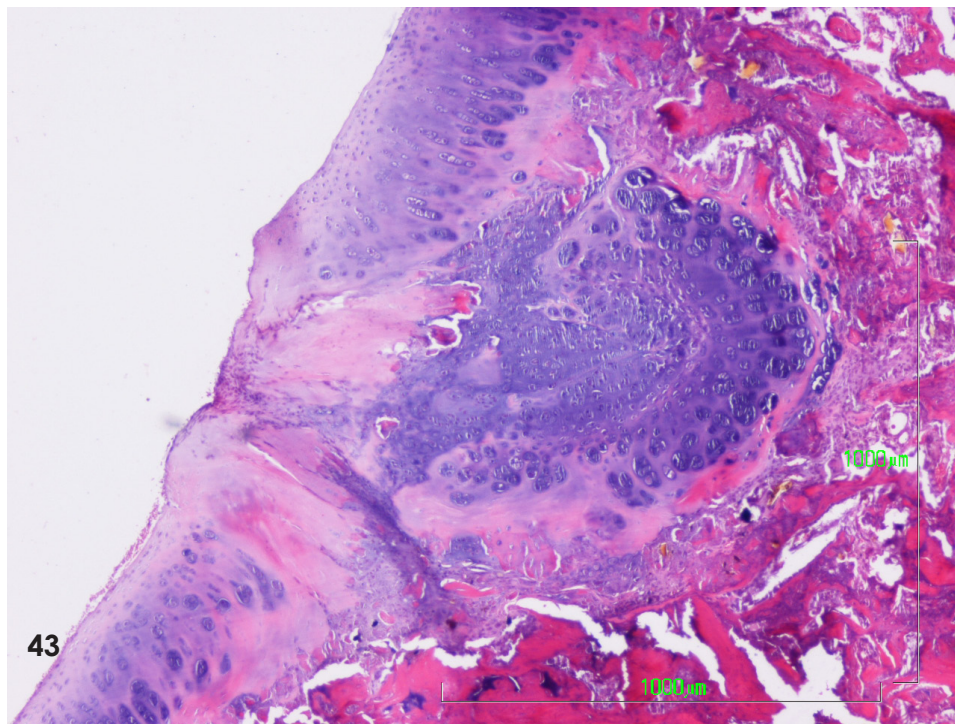
38.-Detalle de condronas hiperplásicas en el cartílago articular. Obsérvese la relación de las mismas con el hueso subcondral.



- 39.-Cartilago articular con moderada reacción osteoartrítica y su relación con el hueso subcondral.
 40.-Detalle del cartilago articular de la figura anterior (39) que presenta condronas hiperplásicas en las capas intermedias.
 41.-Detalle de la figura 3 que muestra la profundidad del cartilago articular con cartilago calcificado y tidemark.

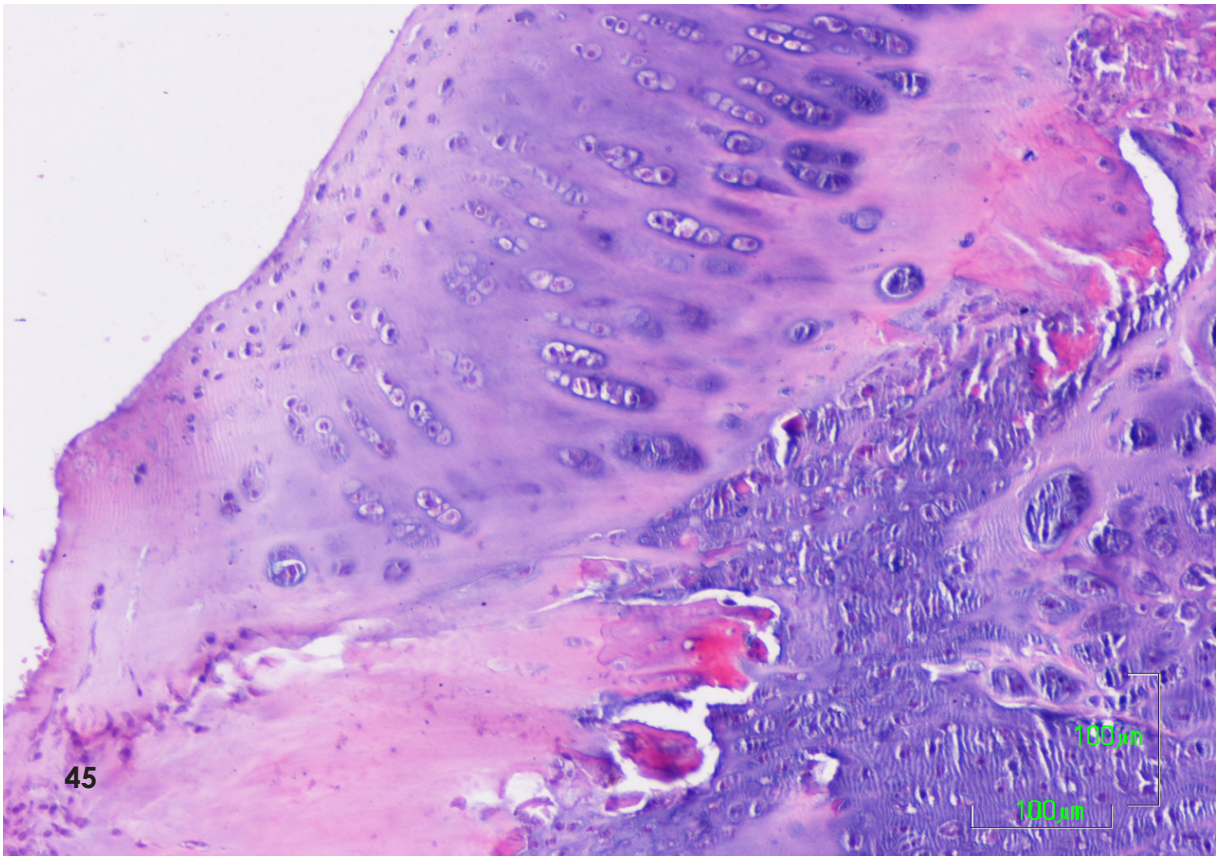
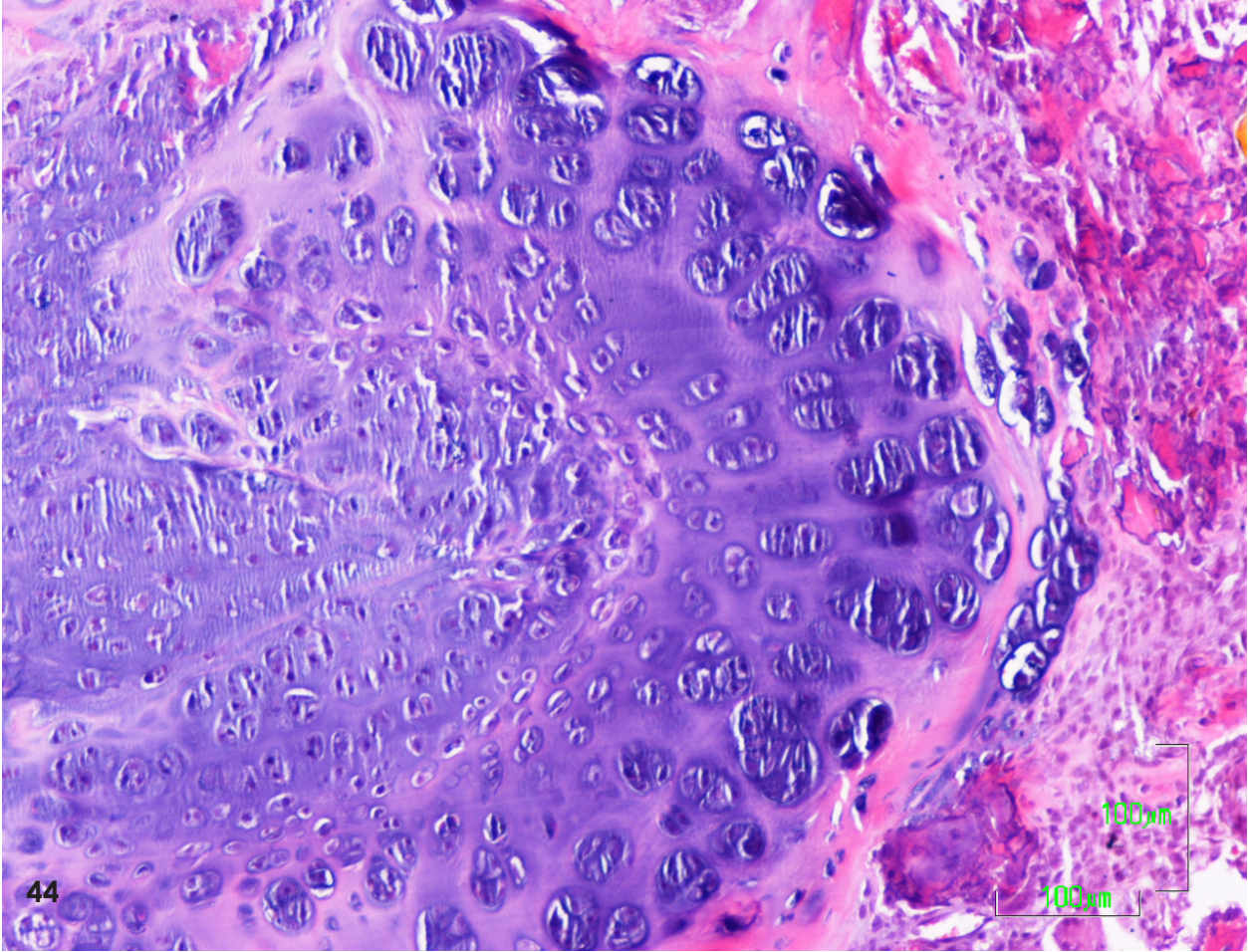


En otros animales de este subgrupo se encontraron signos de regeneración del cartílago articular todavía mas marcados (Fig. 42,43,44 y 45) consistentes en formaciones condrocitarias situadas en la profundidad del cartílago articular con una orientación celular que mimetiza la del cartílago articular normal, abundancia de condrocitos y matriz territorial marcadamente basófila (Fig. 42,43 y44). La porción basal de estas formaciones se hallaba normalmente en contacto con hueso subcondral neoformado (Fig. 42 y 44). A veces estas formaciones se encontraban por debajo del cartílago articular, en los límites entre el cartílago lesionado y el cartílago sano adyacente (Fig.45).



42.-Zona de lesión con abundante cartílago celular que muestra sus condrocitos apilados en hileras que muestra sus condrocitos apilados en hileras, la porción mas superficial presenta una matriz acelular y algo de tejido conectivo.

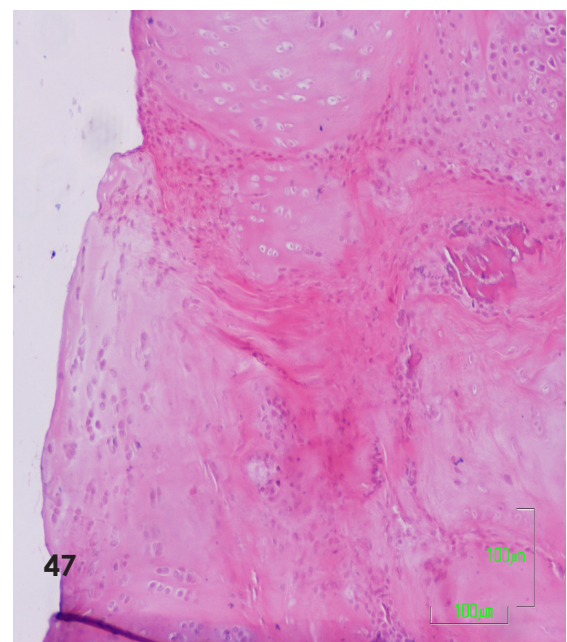
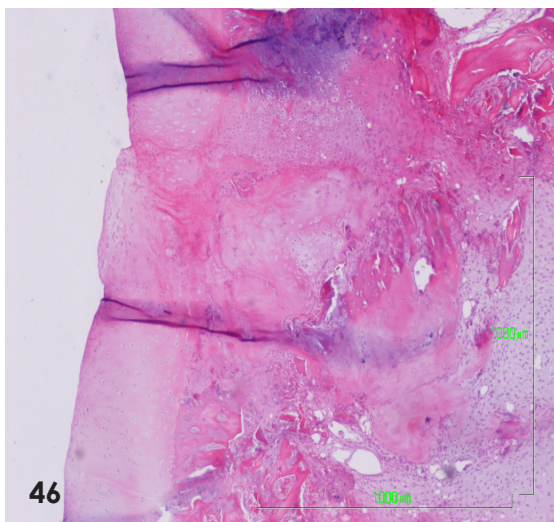
43.-Panorámica de la lesión que presenta cartílago articular en las zonas laterales (superior e inferior de la fotografía) y un área central de cartílago desorganizado asociada a un cartílago hiperplásico en profundidad cuya matriz extracelular presenta características tintoriales similares al cartílago articular normal.



A las cuatro semanas de la administración de plasma enriquecido con plaquetas (Fig. 46-52), llama la atención la notable proliferación del cartílago articular (Fig.46) asociada a la existencia de hueso subcondral, que parece orientar la diferenciación cartilaginosa (Fig.46), pero además , existen dos hechos característicos de este grupo, en primer lugar la relativa madurez del cartílago superficial (Fig. 46-48), asociada a, en segundo lugar, la diferenciación en profundidad de cartílago inmaduro (Fig. 46-50 y 51). El estudio en detalle de las zonas de cartílago inmaduro

(Fig.51) demuestra la existencia de grupos de células de hábito mesenquimal alargadas (Fig.51) al lado de zonas de cartílago inmaduro formadas por condrocitos redondeados ((Fig.51).

Finalmente reseñar que en los bordes laterales, donde existe una continuidad entre el cartílago regenerado y el articular preexistente, también existen en la profundidad zonas de cartílago inmaduro en vecindad con zonas de cartílago hialino (Fig.49, 52)

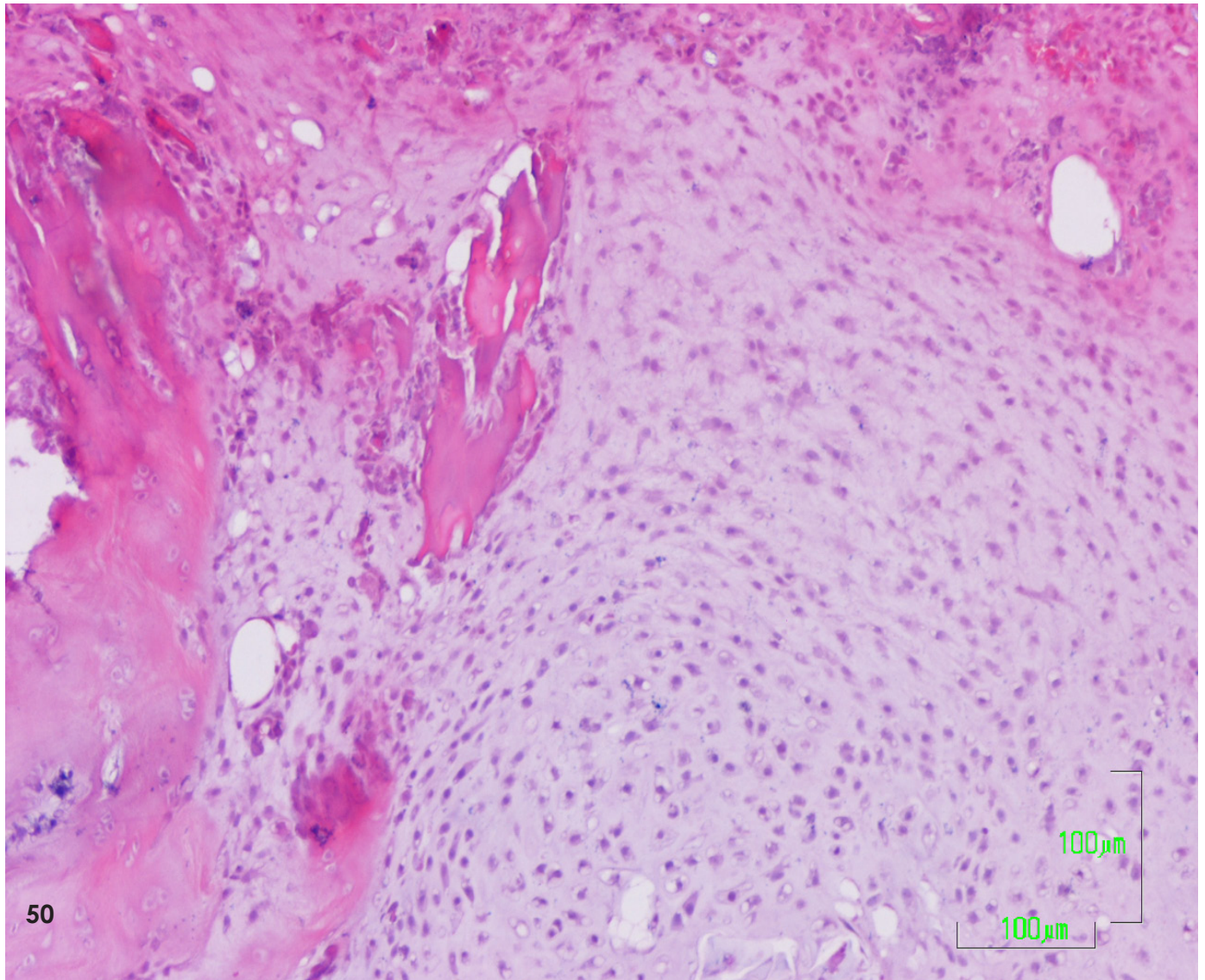
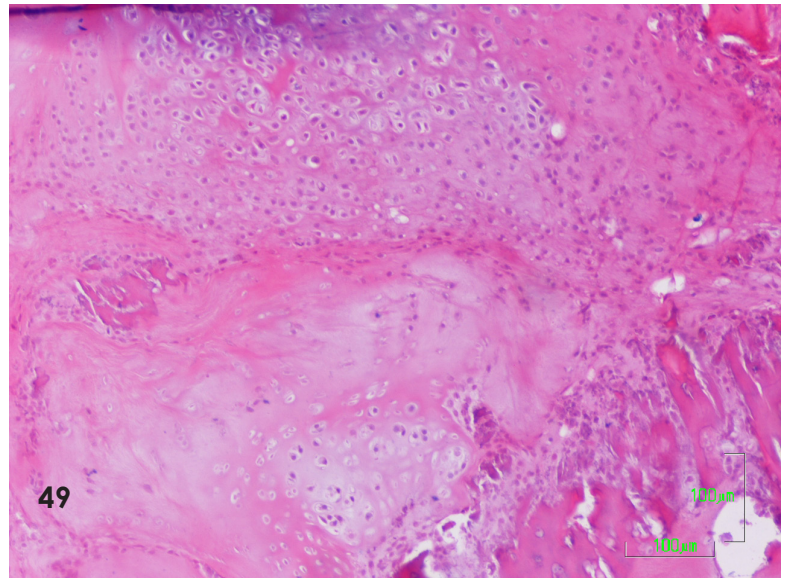
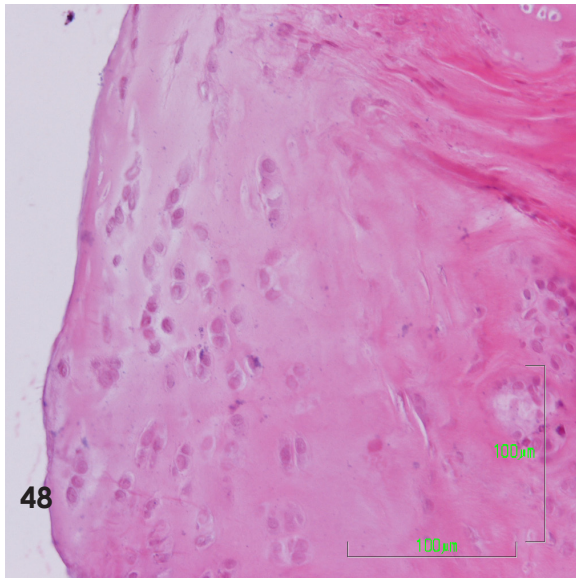


44.-Detalle que muestra la proliferación celular condrocitaria asociada al hueso subyacente y al tejido conectivo. Obsérvese la disminución del tamaño de las condronas y de los condrocitos desde la profundidad a la superficie.

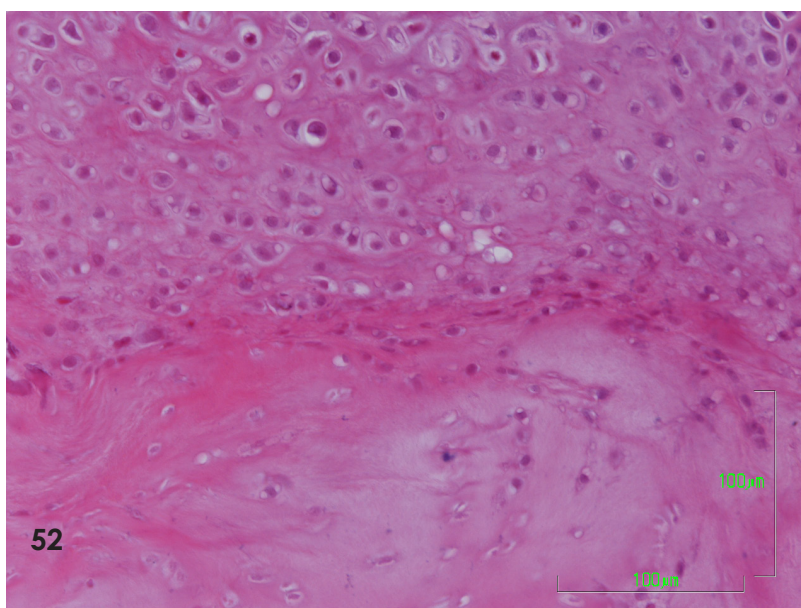
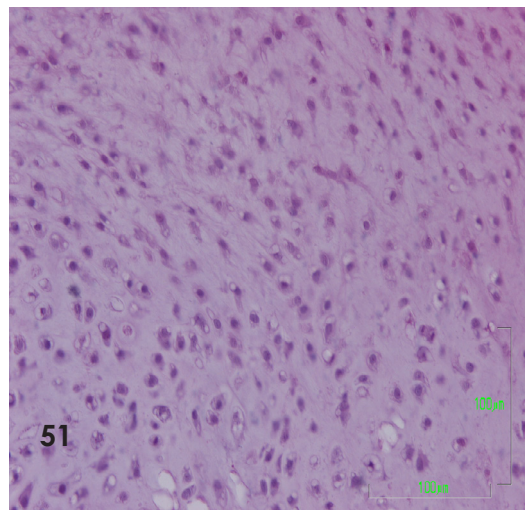
45.-Cartílago articular con distintos estratos en relación con la matriz cartilaginosa prácticamente acelular que recubre la lesión.

46.-Panorámica del área de lesión de borde discretamente elevado donde se muestran las distintas etapas de maduración del cartílago.

47.-Detalle de la superficie articular del área de lesión que muestra el cartílago con los condrocitos en disposición preferentemente horizontal.



En resumen, es en este grupo, de los descritos hasta ahora donde mas signos de regeneración cartilaginosa se han observado, desde el punto de vista histológico, hecho que asociado a la práctica ausencia de tejido conectivo, superficie lesional revestida por cartílago y ausencia de fisuras en etapas tardías, sugiere que este es el candidato adecuado en la promoción de la regeneración cartilaginosa articular en este modelo experimental



48.-Detalle de la fotografía anterior donde se observa el cartílago superficial con los condrocitos dispuestos horizontalmente y una zona subyacente de matriz hipocelular.

49.-Dos zona vecinas e cartílago con distintos grados de diferenciación.

50.-Panorámica de cartílago inmaduro muy celular y con escasa matriz extracelular.

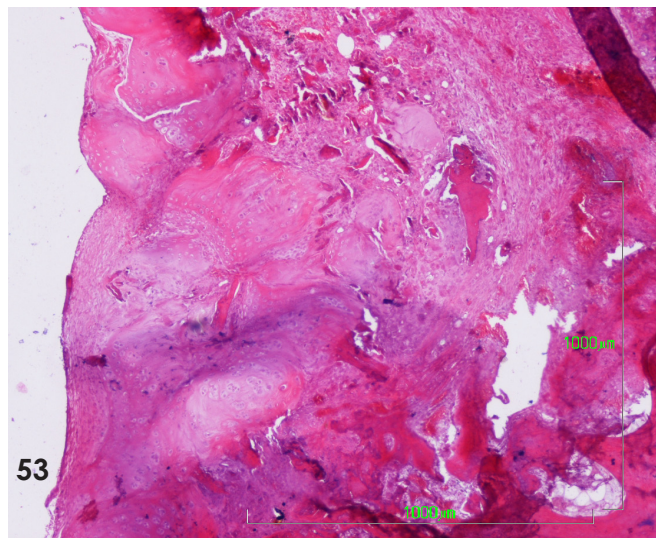
51.-Detalle de la foto anterior donde se observan los condrocitos aislados, en general, algunos con morfología redondeada y otras células alargadas de apariencia mesenquimal. Nótese la ausencia de vasos sanguíneos.

52.-Micrografía que ilustra el cartílago inmaduro (porción superior) en contraste con la forma más madura, menos celular y más rica en matriz extracelular (porción inferior).

5.6

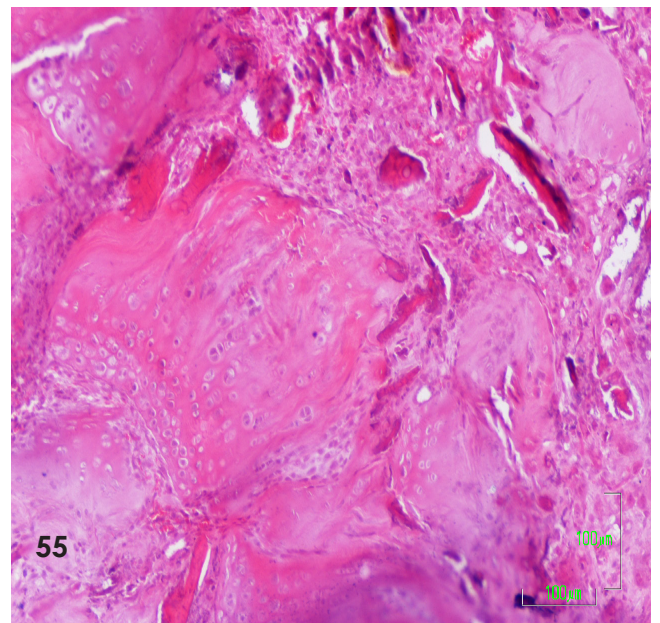
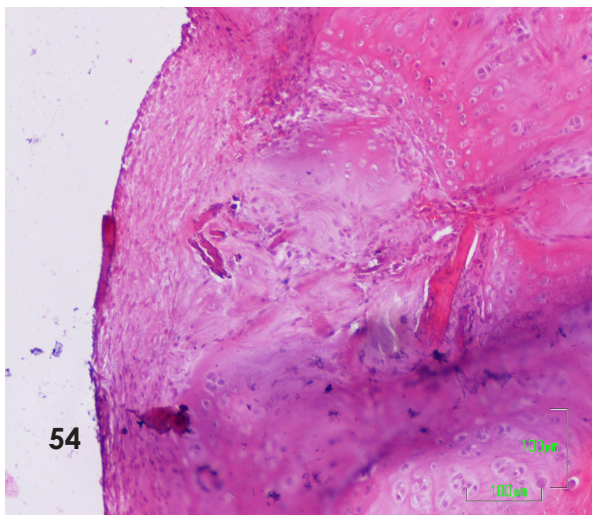
GRUPO V

Este es el grupo constituido por aquellos animales a los que se les administró Ácido Hialurónico y Plasma enriquecido en plaquetas, esperando obtener efectos sinérgicos, derivados de la administración simultánea de ambas sustancias, en la regeneración de la lesión articular



A las dos semanas, la lesión ofrece en general un aspecto abigarrado (Fig.53). En la profundidad se observan fragmentos óseos (Fig. 53-55), restos de cartilago articular (Fig.53,55), asociados o no a hueso subcondral (Fig.55), y cartilago en distintas fases de degeneración (Fig.53,55), todo ello englobado en un tejido conectivo celular (Fig. 53-55). La superficie articular de la lesión está constituida por un tejido conectivo fibroso orientado paralelamente a la superficie (Fig.54), que asienta sobre restos de cartilago articular (Fig.54). En los bordes laterales de la lesión el cartilago se relaciona con el cartilago articular vecino, el cual muestra alteraciones artrósicas, bien por tejido conectivo (Fig.53), o bien por aposición con fisuras (Fig.53).

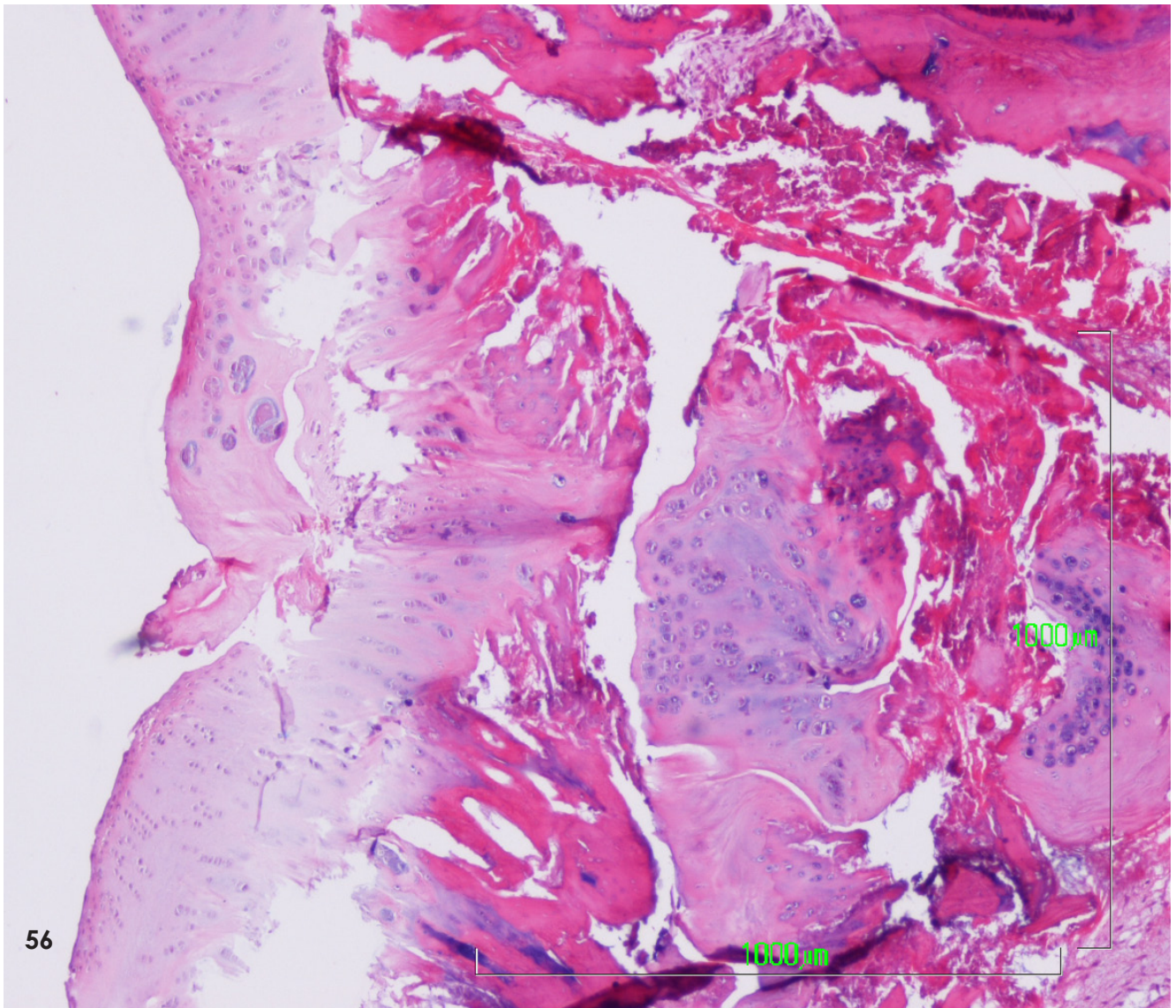
En otros casos, la superficie de la lesión se ve ocupada por cartilago que expresa distintos fenómenos de degeneración y artrosis (Fig. 56,57 y 58). En la figura 56 se ilustra la apariencia de la lesión en superficie, con los signos de degeneración artrósica (Fig. 56, 58), constituidos por zonas carentes de condrocitos (Fig.56,58) y otras con condronas hipertróficas (Fig. 58). En la profundidad pueden observarse fragmentos de cartilago en degeneración con pérdida de la disposición arquitectural (Fig.56 y Fig.57) y otros con signos de proliferación (Fig.56).



53.-Panorámica del área lesionada mostrando el cartilago hiperplásico entremezclado con fragmentos de tejido óseo resultantes del procedimiento experimental.

54.-Detalle de la superficie lesionada mostrando el cartilago recubierto protegido conectivo moderadamente fibroso.

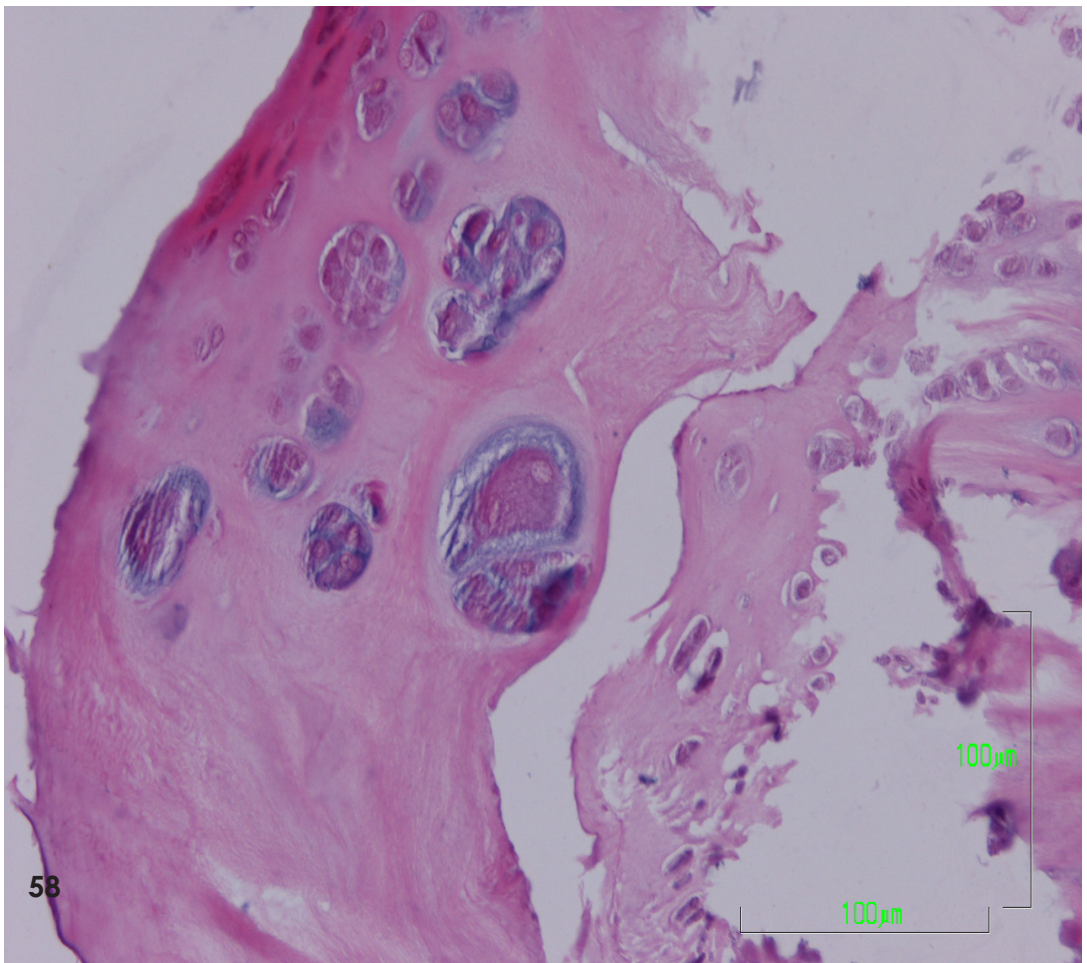
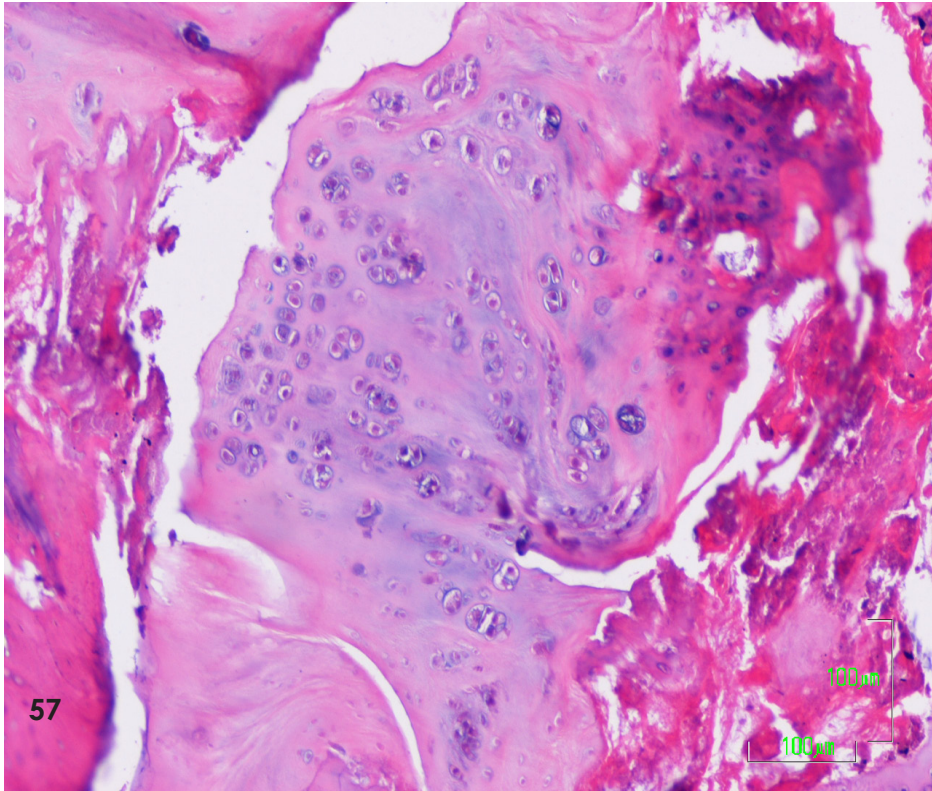
55.-Cartilago hipertrófico situado en la profundidad entremezclado con tejido conectivo y fragmentos de tejido óseo.



56.-Panorámica del tejido cartilaginoso en proliferación. Nótese la existencia de condronas hipertróficas en la zona superficial, así como la existencia de dos áreas de proliferación de cartílago en profundidad.

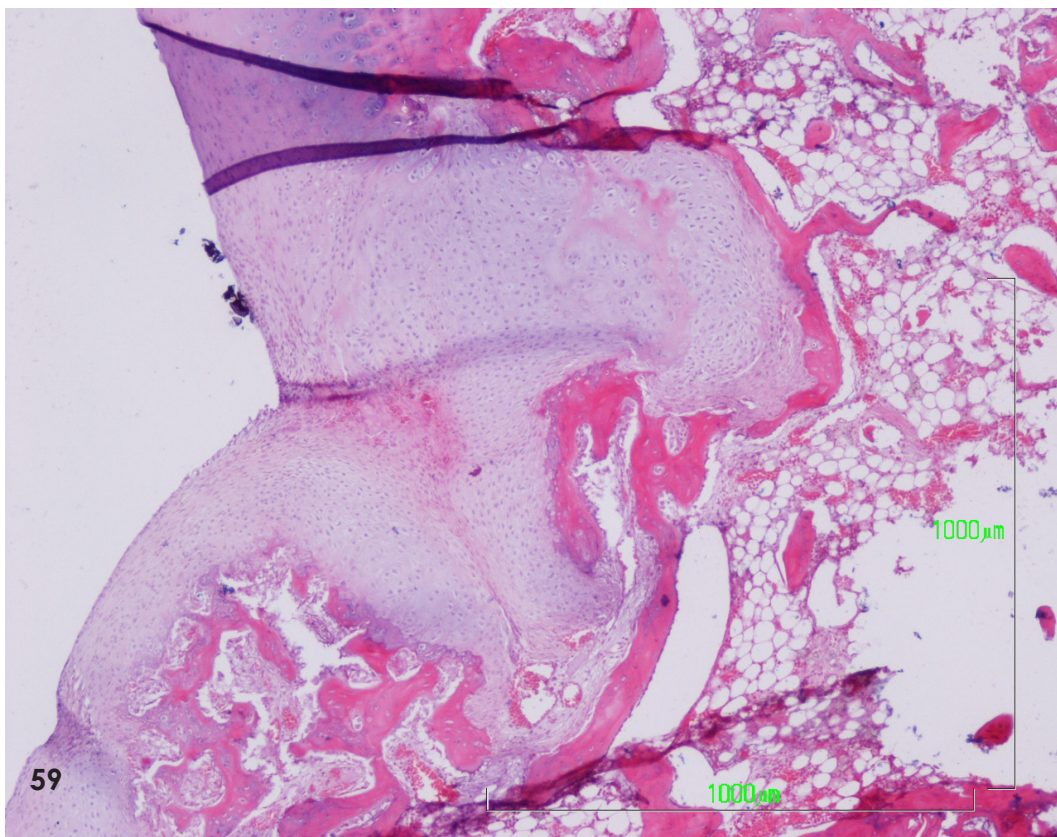
57.-Detalle del cartílago en proliferación. Los condrocitos no presentan una orientación determinada y existe una gran variedad de tamaños celulares

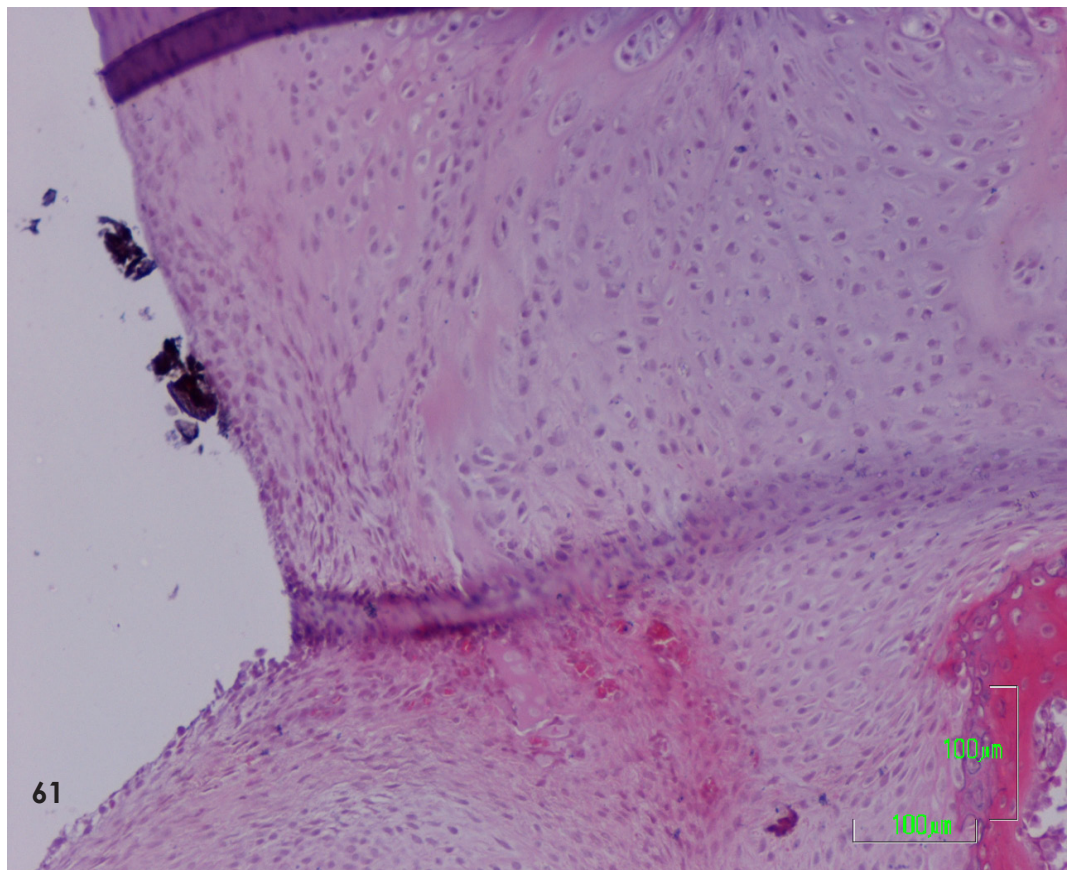
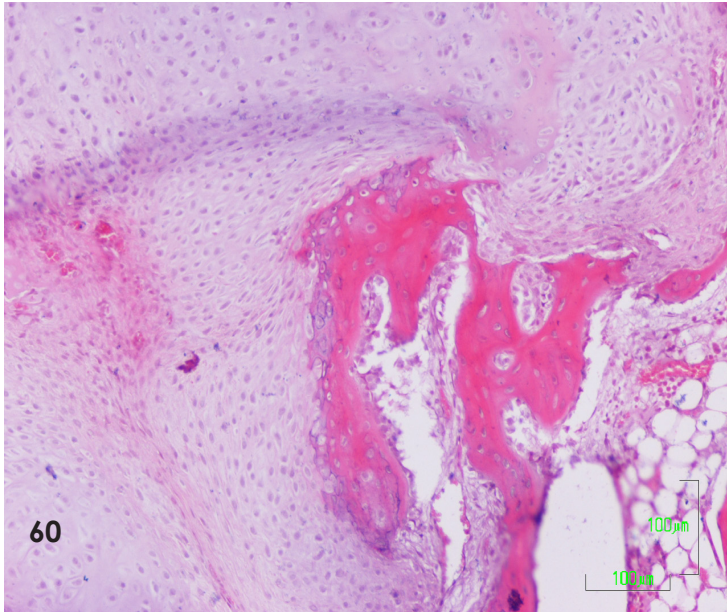
58.-Condrocitos y condronas hipertróficas en la superficie articular de la lesión



El subgrupo correspondiente a las cuatro semanas, muestra el área de lesión ocupada por un cartílago inmaduro, hipercelular (Fig.59), bien integrado con el cartílago articular de los bordes vecinos (Fig.59). En la profundidad, el cartílago inmaduro asienta sobre hueso subcondral (Fig.59) con signos de síntesis ósea (Fig.60). El hueso subcondral, trabecular asienta sobre médula ósea adiposa bien vascularizada (Fig. 59,60). En la superficie se observa que el cartílago se encuentra revestida por una capa celular simple (Fig. 61) y basalmente existe una mayor densidad celular que en el resto del cartílago (Fig.61).

Lo más característico de este grupo experimental es el intento de restauración / cicatrización del cartílago articular en etapas tempranas, dos semanas, y la gran proliferación de condrocitos, asociada a la restauración del hueso subcondral, a las cuatro semanas. Se ha obtenido por tanto un efecto sinérgico entre las dos sustancias empleadas, ácido Hialurónico y Plasma enriquecido en plaquetas.





59.-Panorámica que muestra la proliferación del tejido cartilaginoso que asienta sobre trabéculas óseas neoformadas.

60.-Detalle de a neoformación de las trabéculas óseas y la íntima relación de las mismas con el tejido cartilaginoso subyacente, también en periodo de maduración.

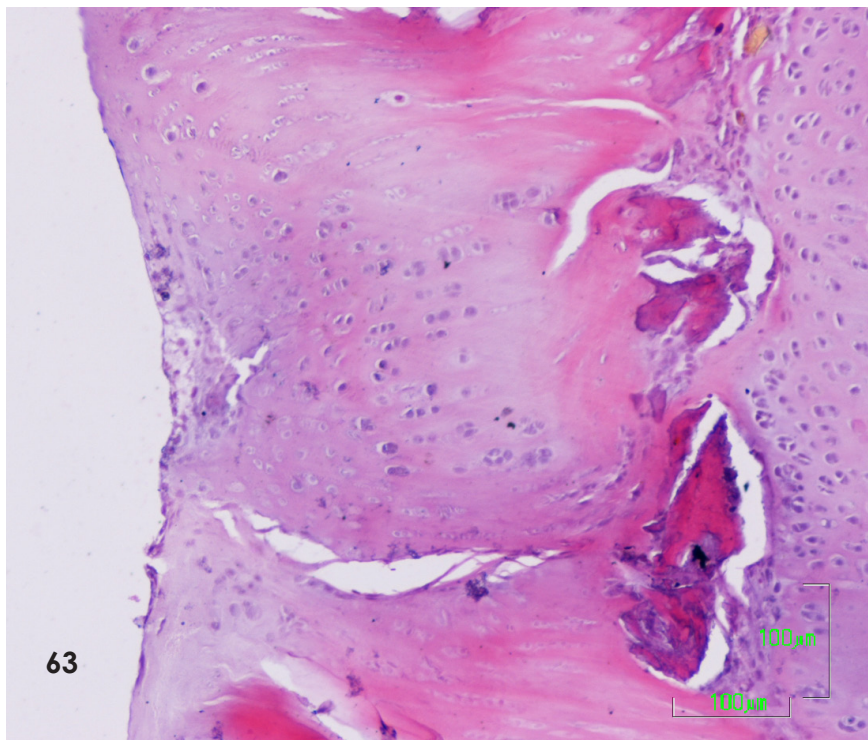
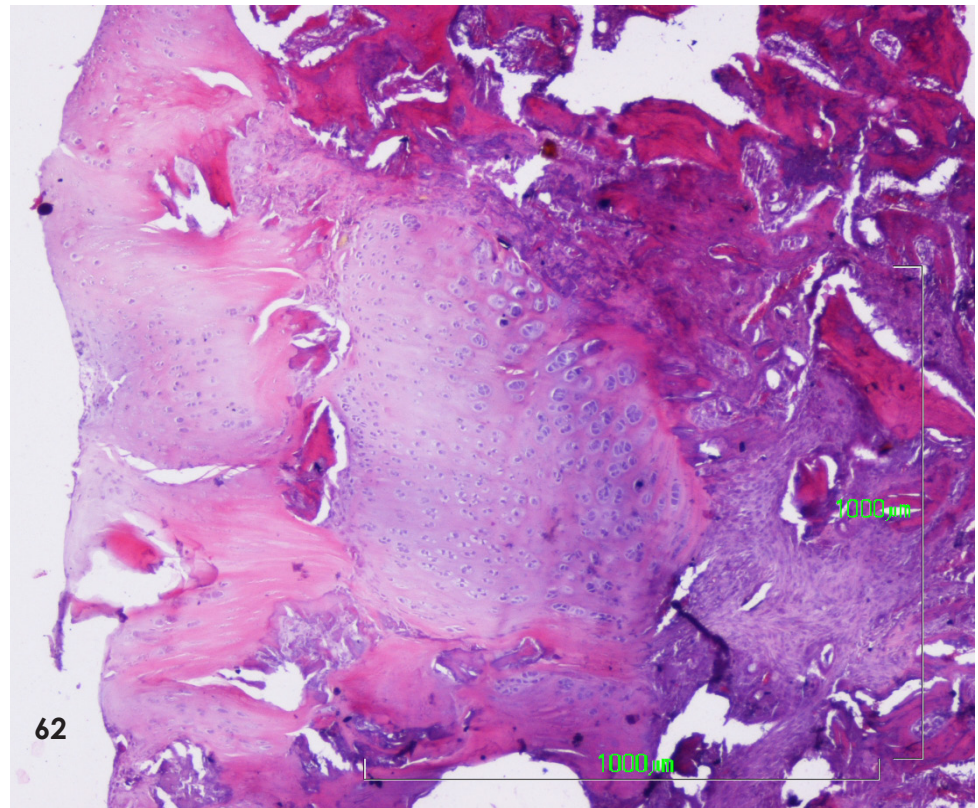
61.-Límite articular del área lesionada constituido por tejido cartilaginoso inmaduro recubierto por una fina capa de tejido conectivo.

5.7

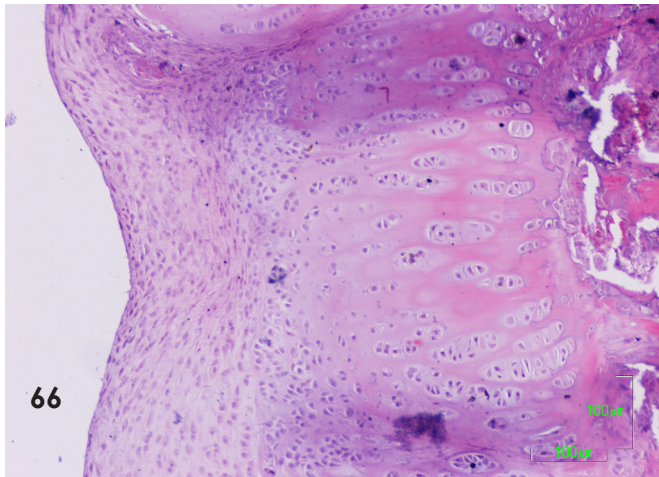
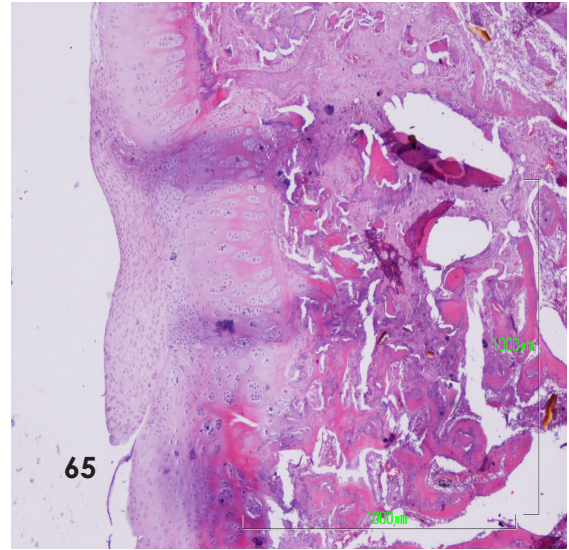
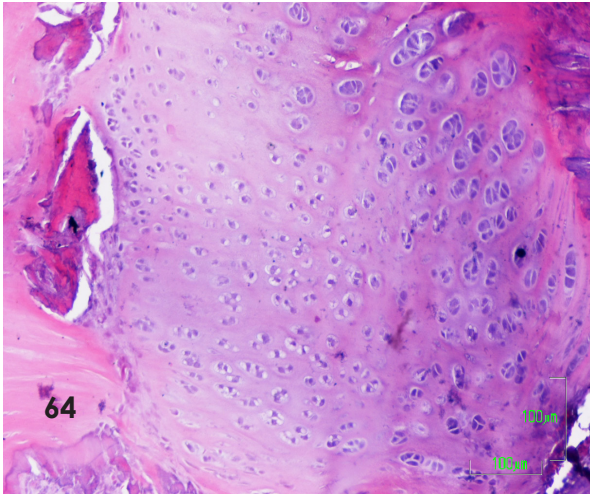
GRUPO VI

El estudio de los animales pertenecientes a este grupo al que se le administraron el plasma enriquecido con plaquetas asociado a las células madre revela en la etapa temprana una mayor preservación del cartílago articular tanto citológica como arquitecturalmente (Fig. 62 y 65). en la figura 62 se muestra el área de lesión con un cartílago alterado hipocelular que presenta fisuras perpendiculares a la superficie articular (Fig.62). Este cartílago que retiene parcialmente la arquitectura

del cartílago articular, asienta sobre fragmentos óseos (Fig. 62 y 63). Lateralmente se continua con el cartílago articular adyacente a la lesión, sin tejido conectivo interpuesto (Fig.62). en el centro de la lesión ,inferiormente a los fragmentos óseos (Fig.62) se encuentra una segunda estructura cartilaginosa bien desarrollada, tanto celular como arquitecturalmente (Fig.64) que a su vez asienta sobre fragmentos óseos y tejido conectivo muy celular bien vascularizado (Fig.62).



62.-Panorámica de la lesión mostrando una marcada proliferación cartilaginosa.
63.-Detalle del cartílago superficial apoyado sobre fragmentos óseos.



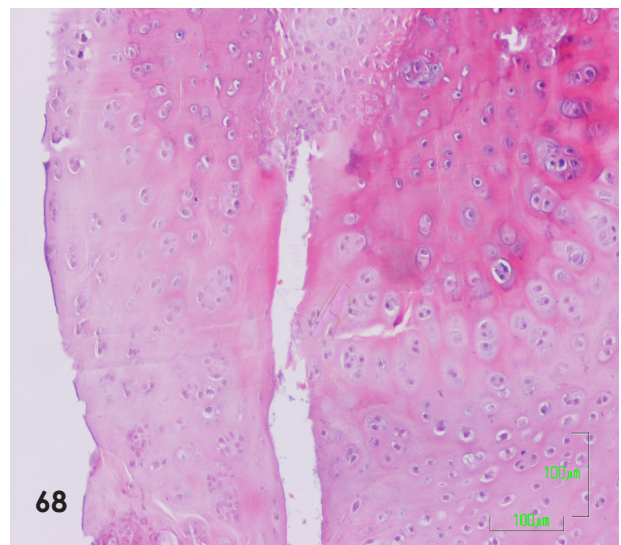
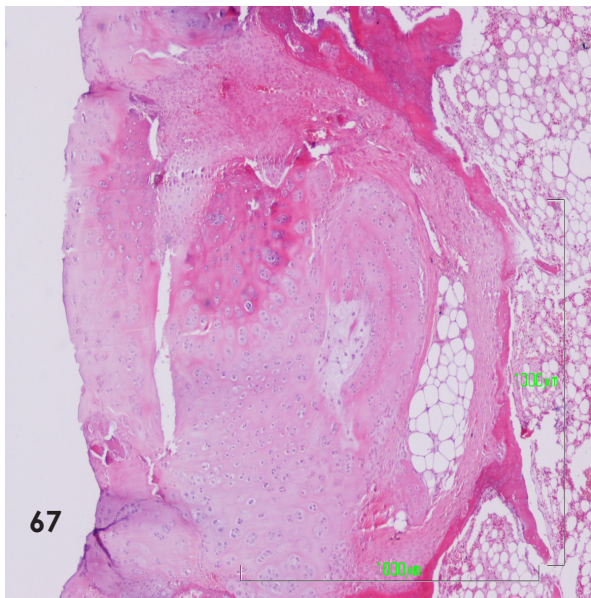
64.-Detalle de la proliferación cartilaginosa infraósea.

65.-Panorámica del área de lesión con tejido cartilaginoso apoyado sobre tejido óseo con signos de neoformación. La porción superficial del cartilago esta constituida por tejido cartilaginoso pobremente diferenciado.

66.-Detalle de la micrografía anterior, que muestra la existencia de un tidemark rudimentaria en la base del cartilago articular. Asimismo se muestra el cartilago inmaduro que cubre el borde articular de la zona.

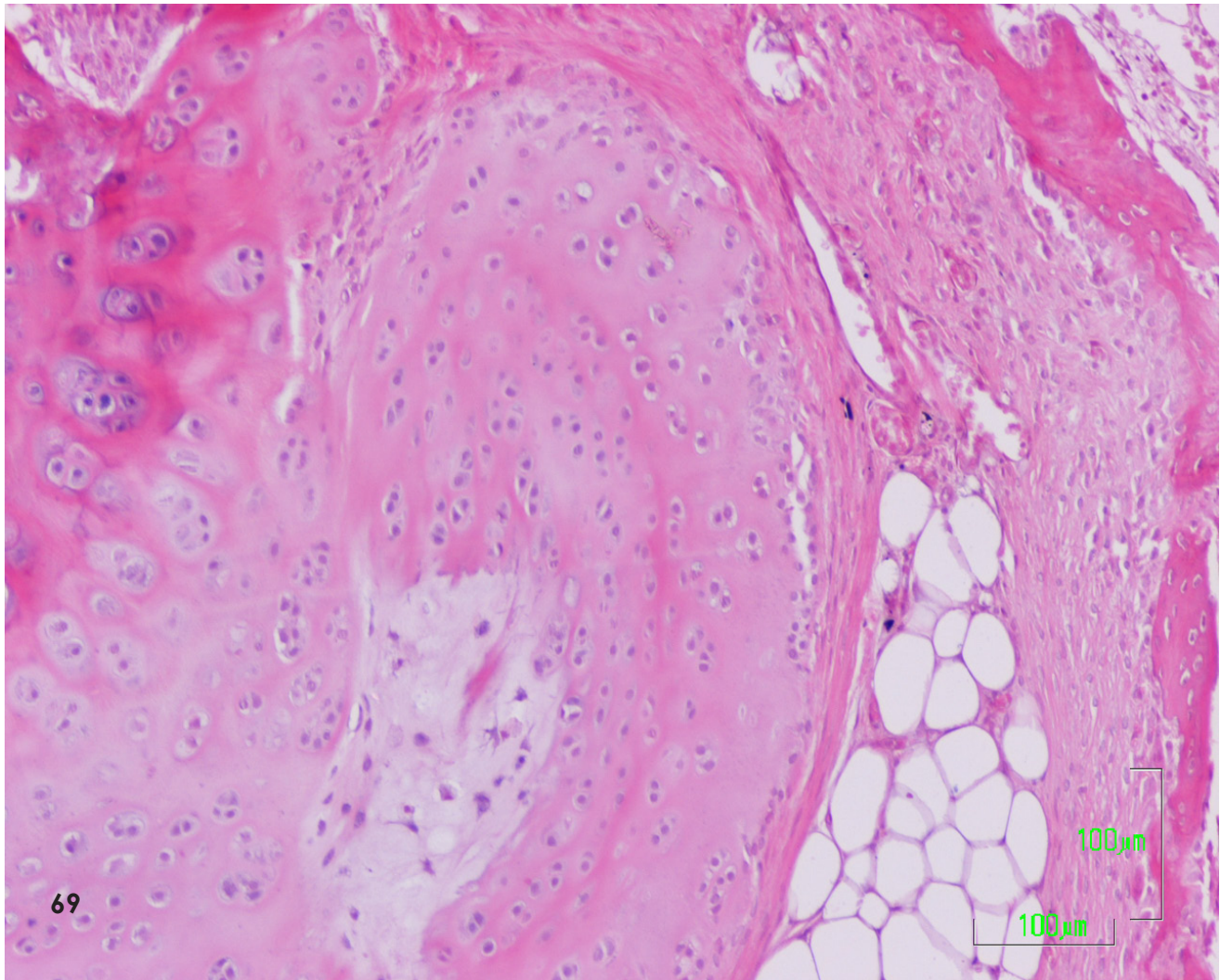
El subgrupo correspondiente a las cuatro semanas presenta como rasgo general una buena reconstrucción del hueso subcondral (Fig.67). La superficie articular del área de lesión se encuentra ocupada por un cartílago citológicamente maduro que no presenta la arquitectura del cartílago articular (Fig.67 y 68). Inferiormente al mismo se encuentra una amplia zona constituida por cartílago bastan-

te maduro de citología normal, aunque sin orientación arquitectural (Fig.67). el estudio a mayor aumento de esta zona permite diferenciar distintas zonas de maduración cartilaginosa (Fig. 68,69 y 70). Este cartílago asienta sobre tejido conectivo que en ocasiones parece pericondral (Fig.69). Por último reseñar que el cartílago superficial presenta condronas hiperplásicas signo de reacción artrósica (Fig.71).



67.-Proliferación cartilaginosa en el área de lesión. El cartílago se encuentra desorganizado arquitecturalmente y se observa la presencia de fisuras horizontales.

68.-Detalle del cartílago articular con áreas en distinta fase de maduración y notable desorganización arquitectural.

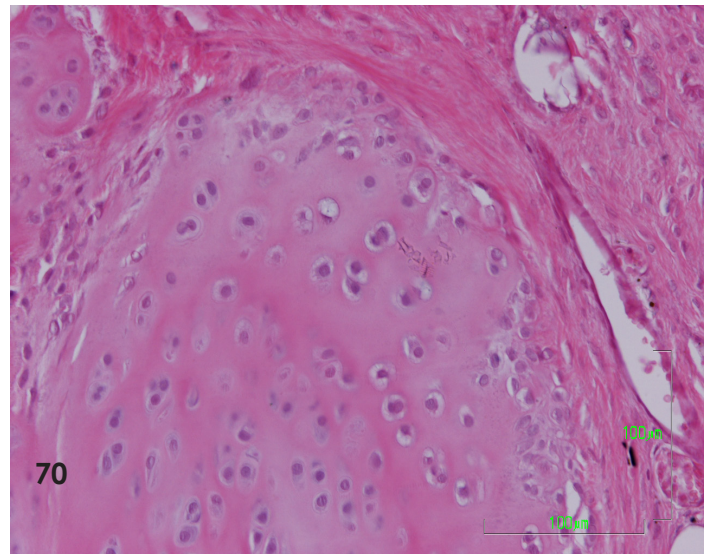


69.-En la profundidad se observa tejido cartilaginoso imbricado con tejido mesenquimal, apoyado sobre tejido conectivo y adiposo que se interpone entre el tejido cartilaginoso y el hueso subyacente.

70.-Detalle del tejido cartilaginoso de la porción profunda de la lesión que muestra características normales respecto a la citología y matriz extracelular, aunque si presenta alteraciones arquitecturales.

71.-Detalle del cartílago articular superficial en la lesión con condronas moderadamente hipertróficas.

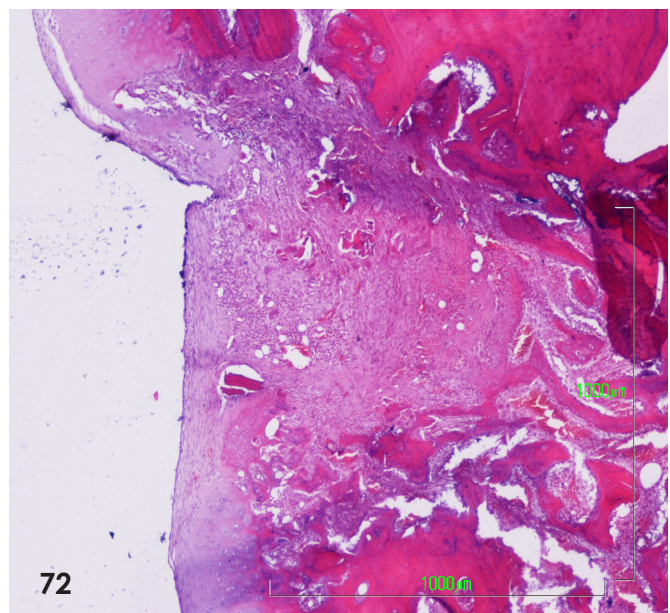
En resumen, los animales pertenecientes a este grupo experimental se caracterizan por una mayor supervivencia y vitalidad del cartílago articular, ya en las etapas tempranas, asociada, en la etapa tardía a una reconstrucción del hueso subcondral, hecho que ya se observaba en la etapa tardía del grupo descrito anteriormente (Ácido hialurónico y plasma enriquecido con plaquetas).

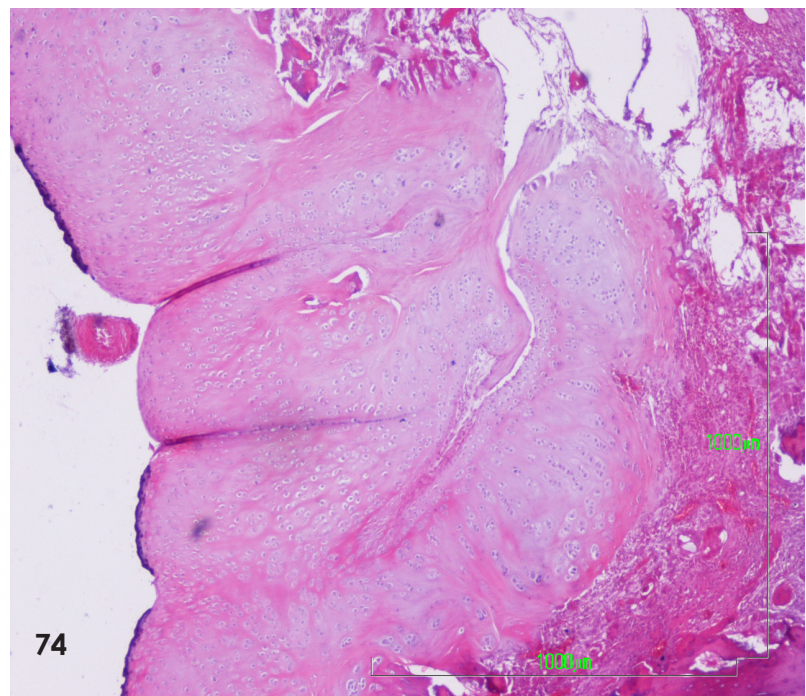
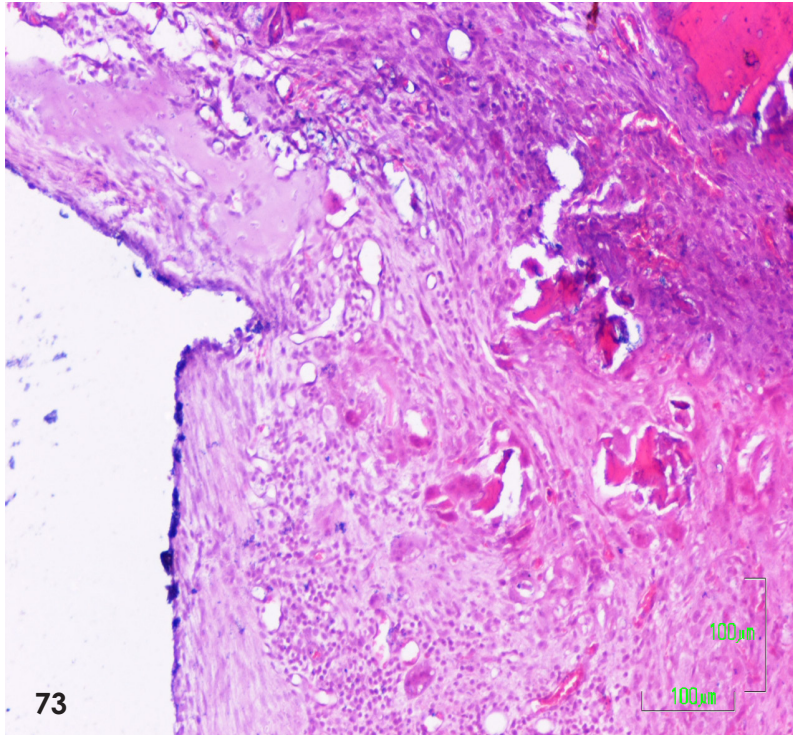




GRUPO VII

En este grupo experimental (administración de ácido hialurónico y células madre), los resultados en el subgrupo de las dos semanas abarcan desde el relleno de la lesión a base de tejido conectivo (Fig.72) hasta el desarrollo de cartilago articular hiperplásico (Fig.74), mientras que a las cuatro semanas, se presenta una cierta restauración del cartilago articular con desarrollo cartilaginoso y del hueso subcondral sin total reconstrucción de este último (Fig.75).





72.-Panorámica del área de lesión deprimida constituida por tejido conectivo, restos de hueso e infiltrado de células inflamatorias.

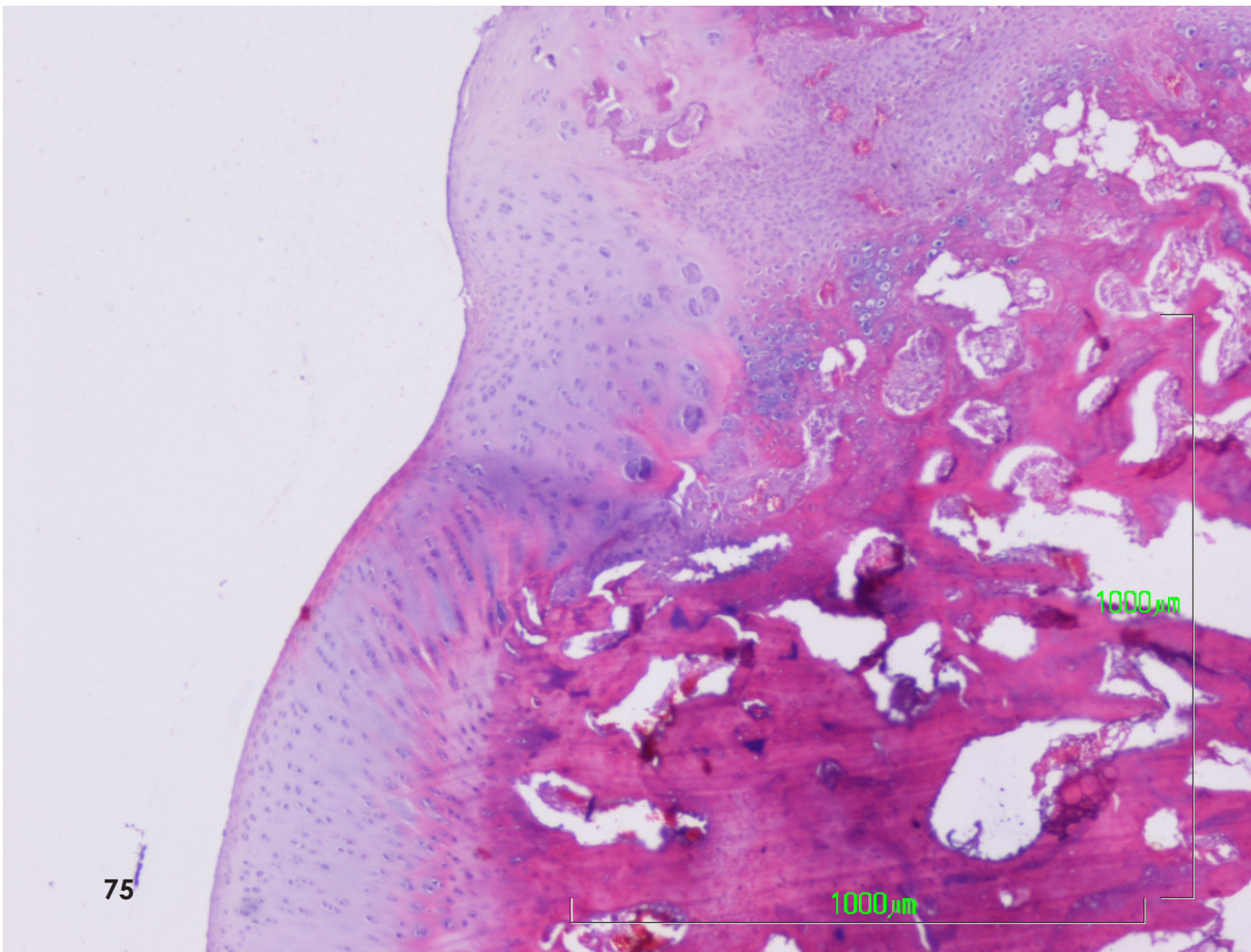
73.-Detalle de la micrografía anterior mostrándole tejido que recubre el área de lesión, vasos sanguíneos e infiltrado inflamatorio. Se observan asimismo restos de tejido óseo con fenómenos de remodelación.

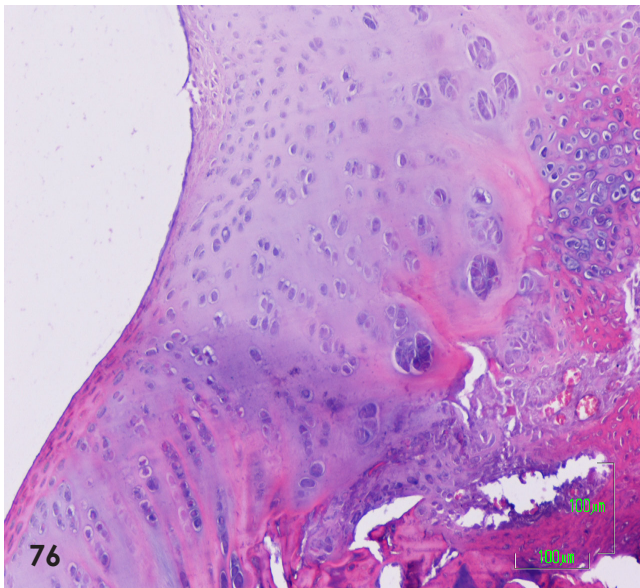
74.-Panorámica que muestra una marcada hipertrofia cartilaginosa

En la etapa temprana se puede encontrar la lesión rellena a expensas de tejido conectivo (Fig.72) o bien con cartílago hipertrófico (Fig.74). En el primer caso recuerda los hallazgos encontrados tras la administración de células madre únicamente, es decir, tejido conectivo, fragmentos de tejido óseo, buena vascularización y actividad sintética del tejido óseo subcondral (Fig.72). No se encuentra actividad del tejido cartilaginoso, y sí un moderado infiltrado de células inflamatorias (Fig.73). En el segundo caso se observa, el cartílago hipertrófico, como

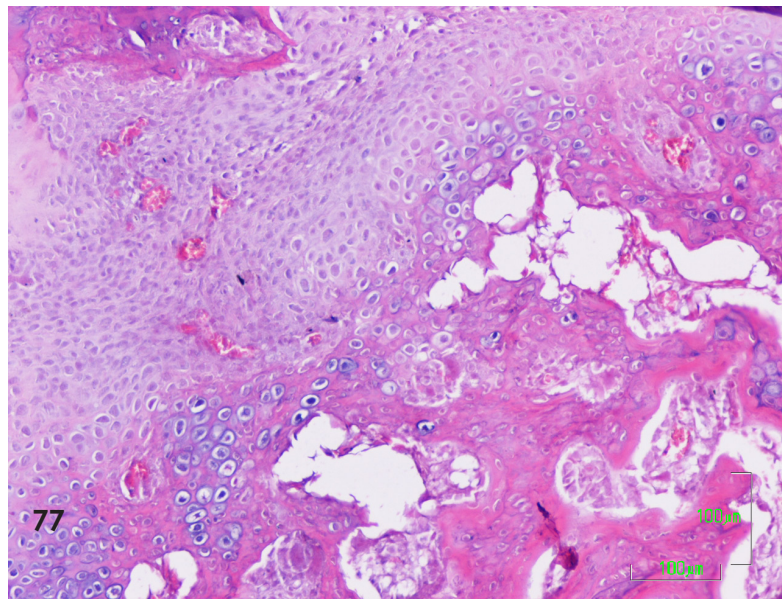
cuando se administra únicamente el ácido hialurónico, este cartílago no presenta las características arquitecturales del cartílago articular y tampoco se ha reconstruido el hueso subcondral (Fig.74)

En el subgrupo correspondiente a las cuatro semanas se observa una buena integración del cartílago de la zona de lesión (Fig.75) con el cartílago articular vecino, y además existe tejido cartilaginoso inmaduro asociado a hueso subcondral con fenómenos de síntesis (Fig. 75,76 y77).





En resumen, este grupo presenta resultados dispares y es el que menos resultado regenerativo y conservador del cartílago ha producido, ya que en vez de conseguirse un sinergismo entre los agentes empleados, parece como si se hubieran administrado por separado, no obteniéndose así el efecto perseguido.



- 75.-Borde de lesión mostrando la relación del cartílago lesionado con el cartílago articular.
- 76.-Detalle que muestra las condronas hipertróficas asociadas a un tejido cartilaginoso inmaduro de localización basal.
- 77.-Borde lateral y profundo del área de lesión mostrando cartílago inmaduro y hueso en proceso de formación.

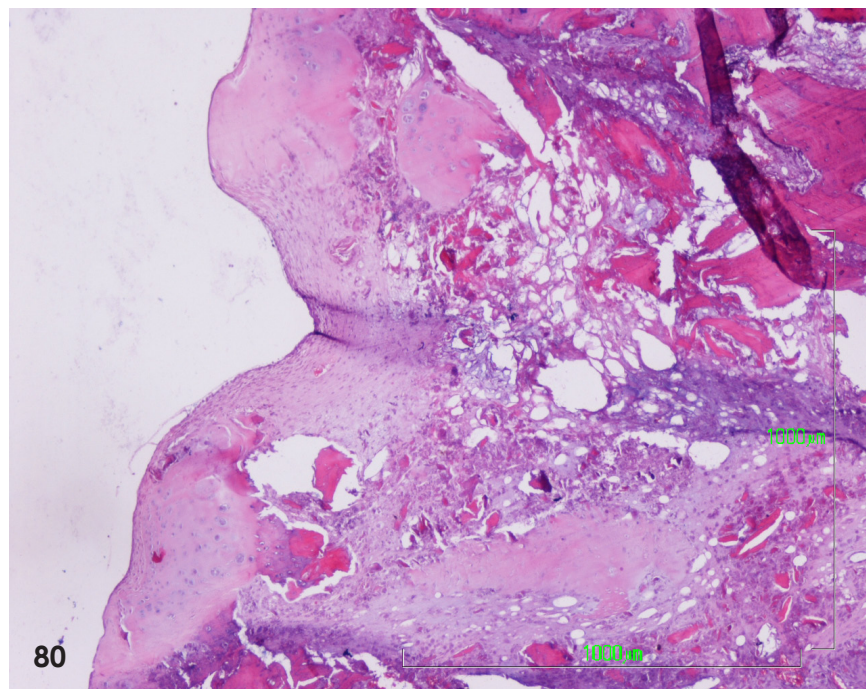
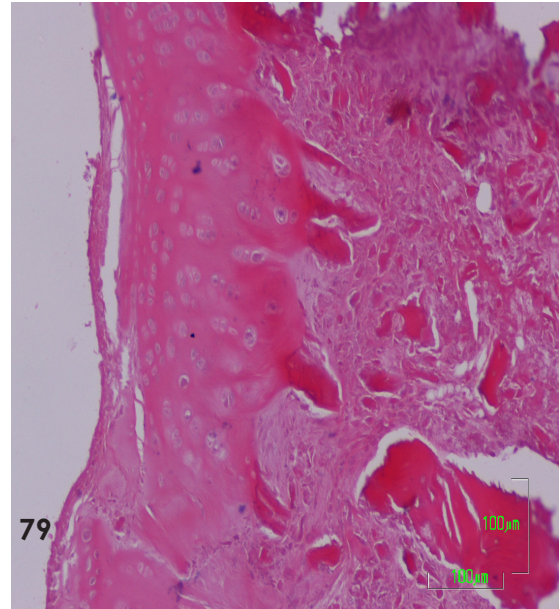
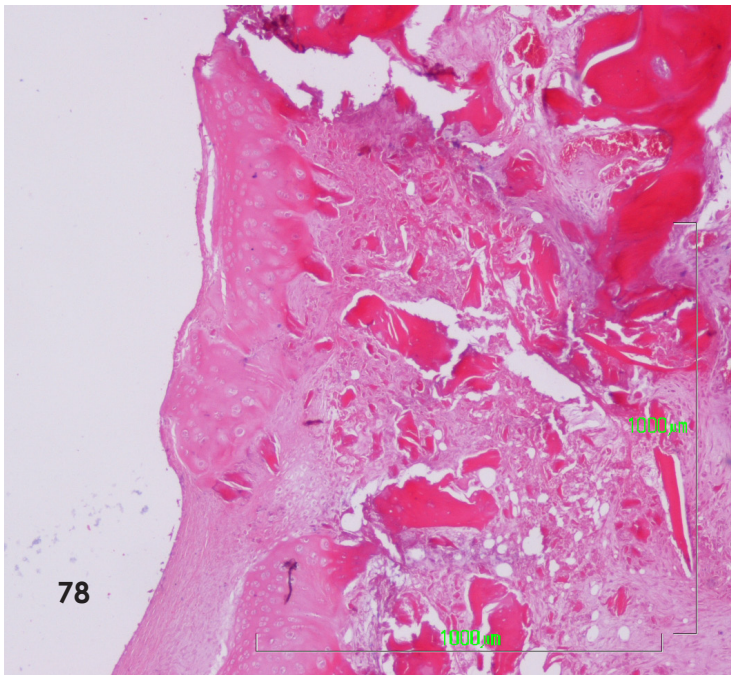
5.9

GRUPO VIII

Este grupo corresponde a aquellos animales a los que tras la práctica de la lesión, se les administraron los tres componentes utilizados en este trabajo, Ácido hialurónico, plasma enriquecido con plaquetas y células madre para estudiar las posibles sinergias. Además, en este grupo se estudiaron los efectos hasta la duodécima semana, prolongando así el tiempo de la experiencia.

En el primer subgrupo, en los animales sacrificados a la segunda semana de la intervención, el área de la lesión

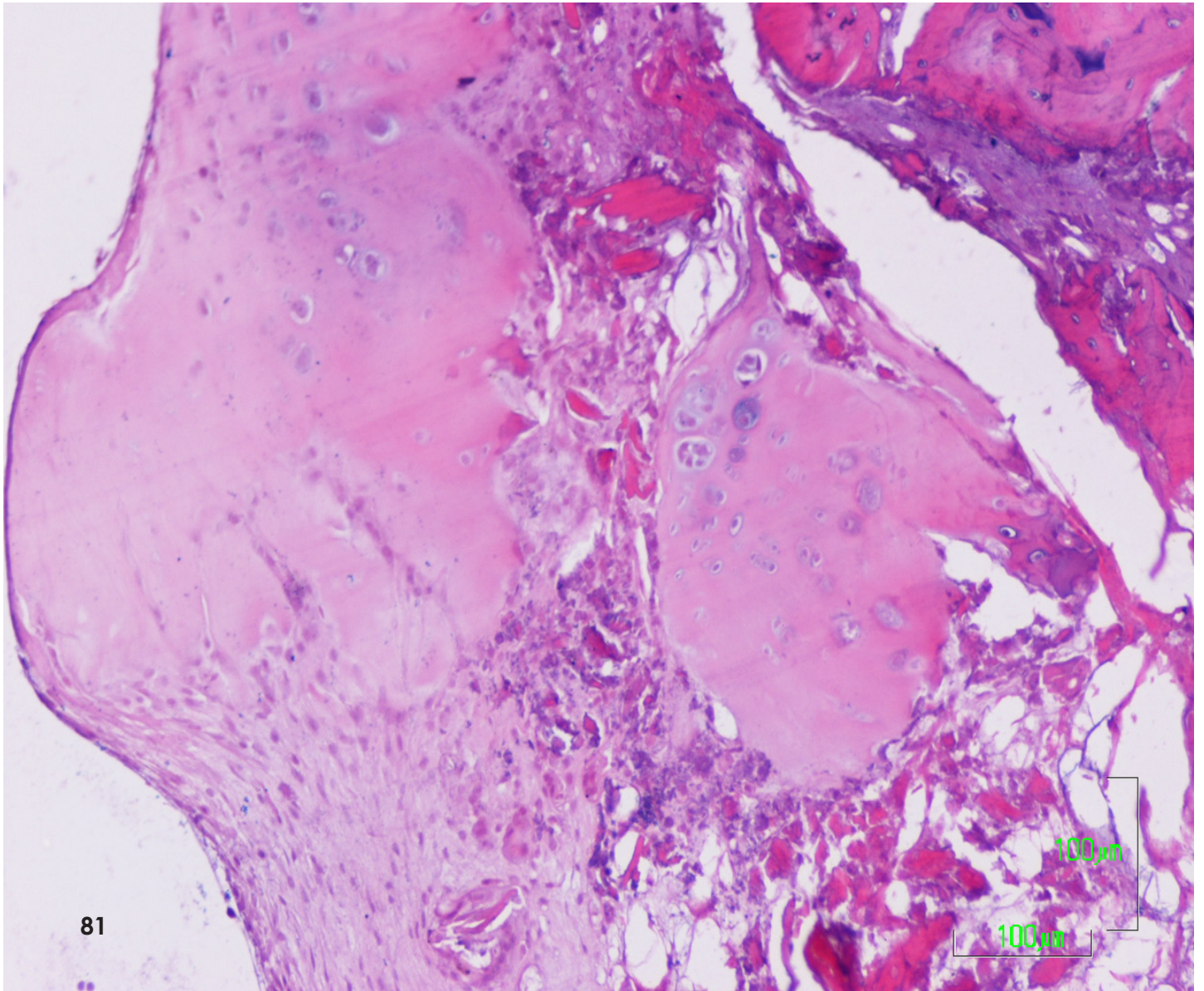
se presenta revestida por tejido conectivo (Fig. 78,80), bien desarrollado y fibroso. En los bordes de la lesión se encuentra tejido cartilaginoso con un cierto grado de preservación arquitectural con condronas hipertróficas, y un contorno basal irregular (Fig.79), que asienta sobre tejido conectivo con abundantes fragmentos óseos (Fig.78 y79). En otros casos, el tejido conectivo que ocupa la lesión se continúa con el cartílago vecino (Fig.80), que presenta alteraciones citológicas y de matriz de carácter artrósico (Fig.81).



78.-Panorámica del área de lesión constituida por tejido conectivo que recubre a tejido cartilaginoso apoyado sobre fragmentos de tejido óseo y tejido conectivo.

79.-Detalle del cartílago del borde de la lesión que muestra un cartílago articular recubierto por una fina franja de tejido conectivo. Basalmente el cartílago descansa sobre tejido conectivo entremezclado con fragmentos óseos.

80.-Panorámica del área de lesión constituida por tejido conectivo y cartílago inmaduro en la zona central superficial, apoyado en tejido conectivo que presenta grandes cavidades vasculares y algunos fragmentos de tejido óseo

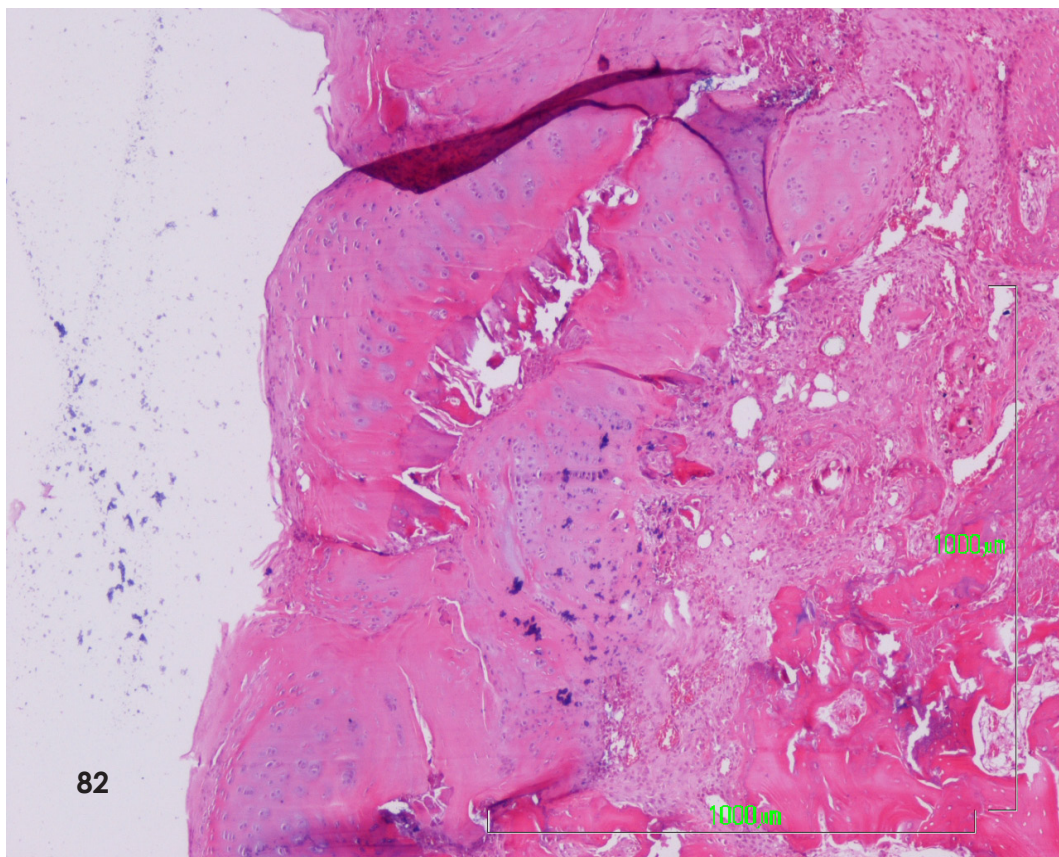


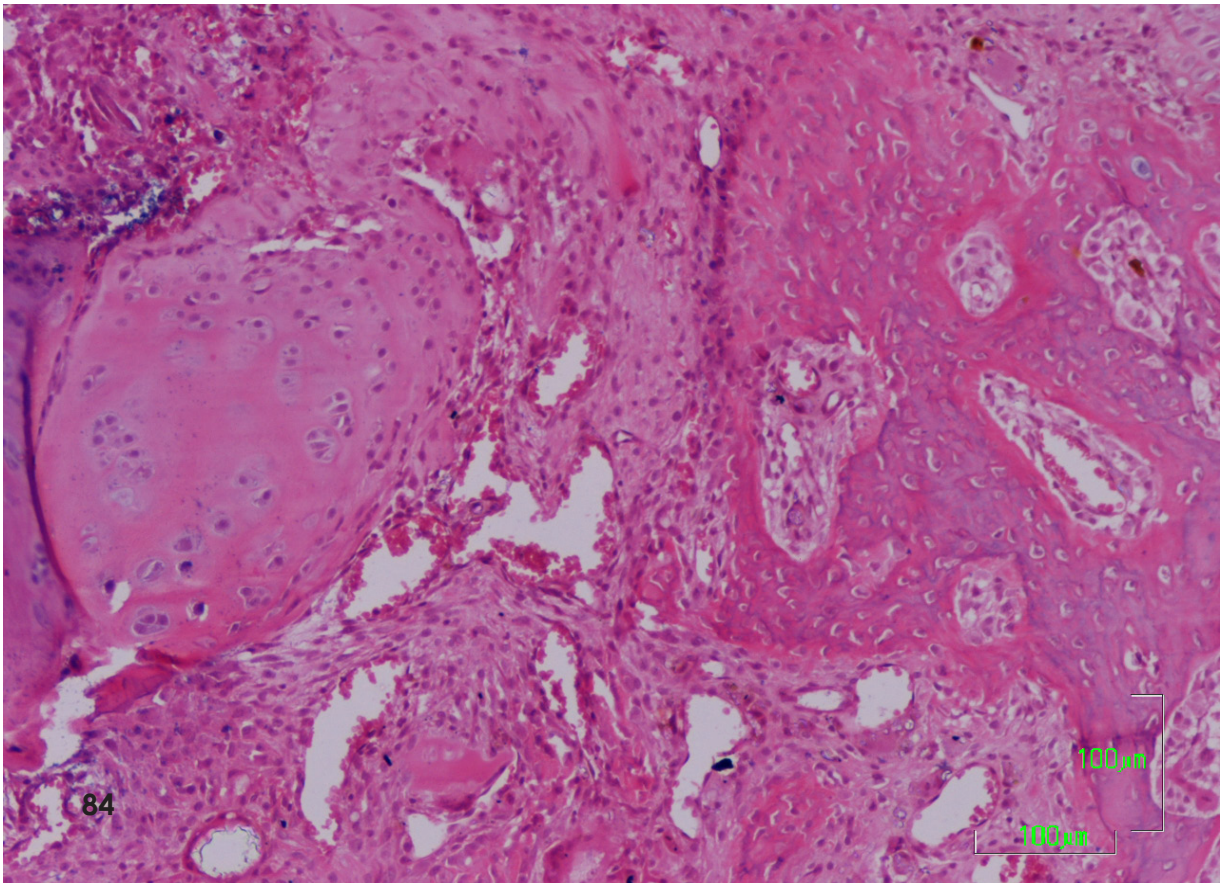
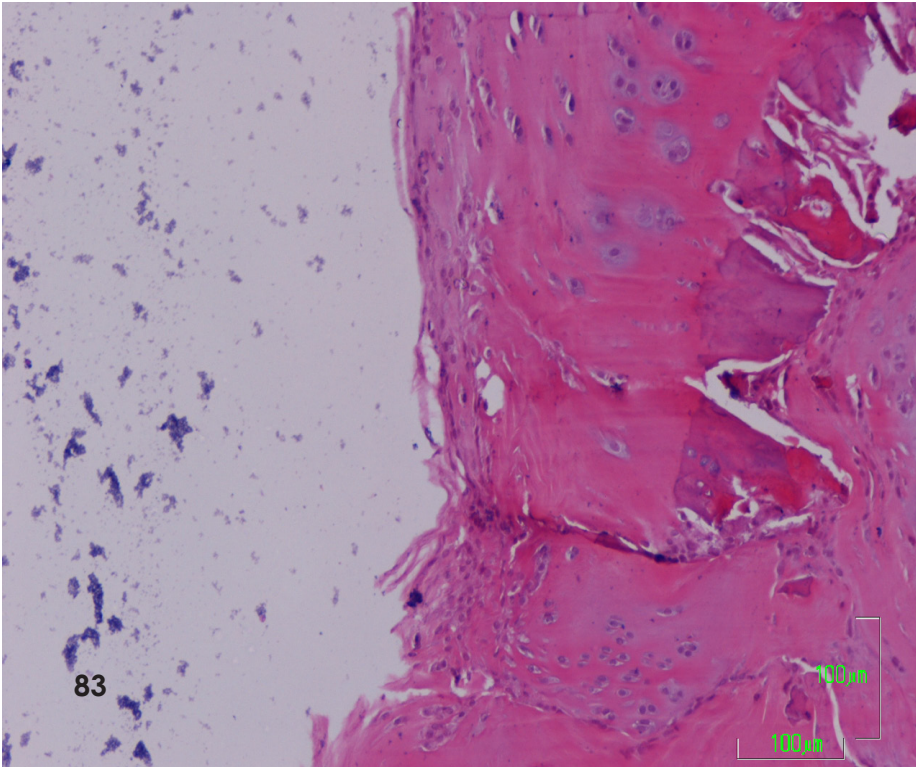
81.-Borde lateral de la lesión constituido por fragmentos de tejido cartilaginoso de citología y arquitectura alteradas asociadas a tejido conectivo, cavidades vasculares y fragmentos óseos.
82.- Área de lesión con marcada proliferación cartilaginosa

A las cuatro semanas el área de lesión esta ocupada por cartílago muy similar al cartílago articular (Fig.82 y 83) pero revestido por una fina capa de tejido conectivo. Este cartílago asienta sobre hueso subcondral, pudiendo observarse, zonas de cartílago calcificado , así como la tidemark (Fig.83). En la profundidad de la lesión se observa algún fragmento de cartílago, en relación con el tejido conectivo adyacente (Fig.64), así como un grado moderado de actividad de síntesis ósea (Fig.84). en las zonas laterales existen fenómenos regenerativos del cartílago, con

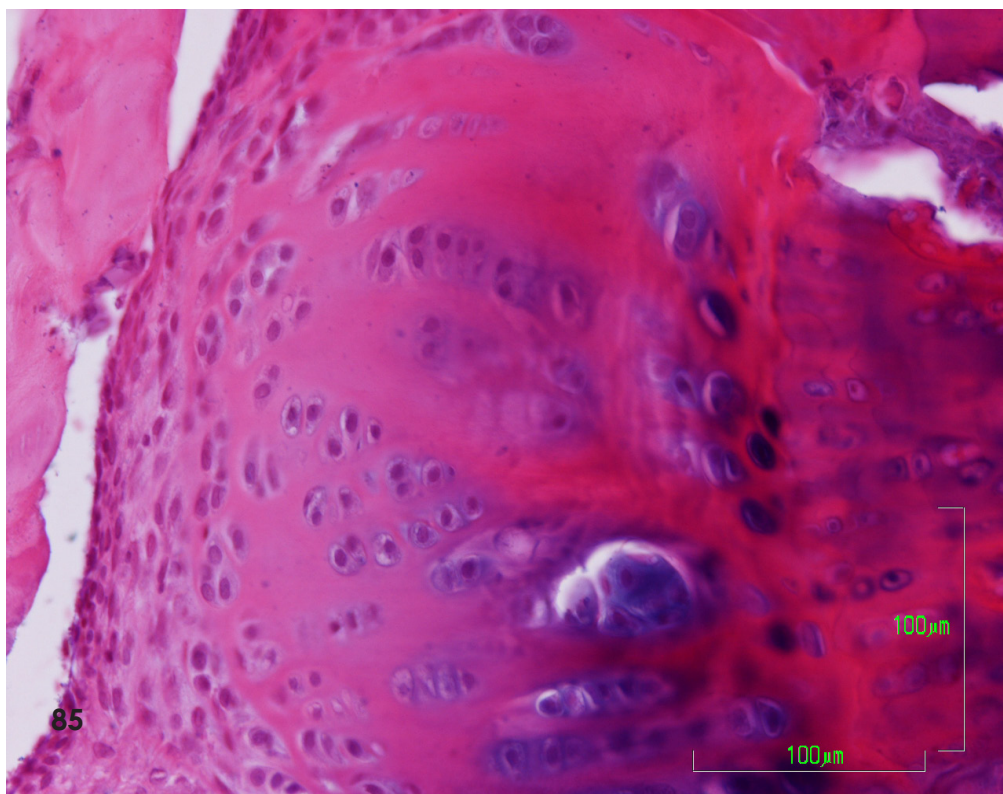
condronas basales hipertróficas, que está recubierto por tejido conectivo (Fig.85).

En el último subgrupo, sacrificado a las doce semanas, no se observa actividad inflamatoria, la superficie articular se encuentra revestida por cartílago muy similar al cartílago articular , aunque algo mas hipocelular (Fig. 86 y 87), pero lo que más llama la atención, es el gran desarrollo del hueso subcondral, entremezclado con focos de tejido cartilaginoso (Fig.86 y 87).





En resumen, en este grupo se ha conseguido la regeneración articular a las doce semanas, si bien los hallazgos regenerativos encontrados a la cuarta semana, no son comparables ni cuantitativa ni cualitativamente con los de los grupos en los que se ha empleado plasma enriquecido con plaquetas solo o asociado a ácido hialurónico.. Por tanto no se produce una sinergia marcada con la técnica utilizada de los tres productos administrados en este estudio.



- 83.-Detalle de área de lesión mostrando el borde articular cartilaginoso, la tidemark irregular, tejido óseo y tejido cartilaginoso de localización infraósea.
84.-Detalle de la proliferación ósea en la profundidad de la lesión, en relación con tejido cartilaginoso.
85.-Cartilago en regeneración con condronas basales hipertróficas.



DISCUSIÓN

6.1

EL ESTADO ACTUAL DE LA REPARACIÓN DE LAS LESIONES DEL CARTÍLAGO

Existe un interés creciente por la reparación de las lesiones del cartílago articular, de tal manera que, en los últimos años, se ha producido un cambio de actitud consistente en abandonar la idea de que es una patología que hay que dejar evolucionar hasta el momento de realizar una artroplastia de rodilla (Sgaglione et al., 2002). Es por ello que, durante estos años, han ido desarrollándose diferentes terapias que tratan de mejorar la baja capacidad de regeneración que tiene el cartílago. Se trata de un tejido que permite la transmisión de fuerzas y el movimiento, y para ello presenta unas características entre las que destacan la baja celularidad y la ausencia de aporte sanguíneo, de terminaciones nerviosas y de drenaje linfático. Sin embargo, estas características son a la

vez una limitación crucial para la reparación de los daños, ya sea por traumatismos agudos, o por la degeneración senil progresiva. Por tanto, el cartílago articular tiene poca, o carece de capacidad para repararse (Hananallah et al., 2003; O'Driscoll, 1998; Sellars et al., 1997).

Es necesario señalar que las lesiones articulares no tratadas evolucionan hacia una degeneración de la superficie articular, y que la respuesta reparadora produce un tejido fibroso incapaz de soportar las sollicitaciones a las que se ven sometidas las articulaciones de carga (Convery et al., 1972; Mankin, 1982; Hunter, 1995). Los defectos de espesor parcial, aquellos que no afectan al hueso subcondral, solo provocan una estimulación parcial de la

replicación de los condrocitos y de la producción de matriz en el área adyacente a la lesión. En el caso de las lesiones de espesor completo, en la que si se afecta el hueso subcondral, la exposición de los vasos sanguíneos y de la médula ósea subyacente permite que se desencadene una respuesta inflamatoria típica, con aporte de células y factores plasmáticos que hacen que la reparación sea más satisfactoria (O'Driscoll et al., 1986; Hurtig et al., 1988). Sin embargo, la restauración completa del cartílago hialino y del hueso subcondral raramente es conseguido, y en consecuencia, existe un enorme interés en el desarrollo de técnicas que regeneren o reconstruyan de una manera completa los defectos articulares.

El objetivo de la reconstrucción de la lesiones articulares es doble. Por un lado se trata de aliviar la clínica dolorosa e inflamatoria que provocan estas lesiones, y por otro se trata de detener o retrasar la evolución natural de estas lesiones hacia la artrosis, pues una vez establecida, la solución actual pasa por la implantación de una artroplastia total de rodilla. Sin embargo, dada la agresividad de esta intervención, el aumento de la expectativa de vida de la población actual y la vida limitada que presentan los implantes, existe una necesidad de encontrar terapias que dilaten la necesidad de su implantación, especialmente en pacientes jóvenes. Esto hace que sean múltiples las técnicas quirúrgicas que se han desarrollado para intentar favorecer la capacidad regenerativa del cartílago. (Reinholz et al., 2004).

Se han descrito varias técnicas para reparar el cartílago lesionado, pero todas ellas se pueden englobar en métodos reparativos, reconstructivos o regenerativos. Los métodos reparativos (per-

foraciones y microfracturas) ayudan a la formación del nuevo tejido fibrocartilaginoso facilitando el acceso de los vasos y las células progenitoras capaces de producir la condrogénesis mediante la perforación del hueso subcondral mecánicamente. Los métodos reconstructivos tratan de llenar el defecto con tejido autólogo o aloinjertos (injertos osteocondrales, mosaicoplastia o aloinjertos). Por último, los métodos regenerativos aprovechan técnicas de bioingeniería (injerto de condrocitos autólogos, de células madre mesenquimales o de matrices celulares) para desarrollar un tejido de cartílago hialino que sustituya al dañado. Sin embargo, tal como podremos ver a continuación, ninguna de estas técnicas ha resuelto los principales problemas que surgen a la hora de tratar este tipo de lesiones, y el tratamiento definitivo de la lesiones del cartílago articular está aún por venir.

Las perforaciones del hueso subcondral, la artroplastia de abrasión y las microfracturas, pretenden mejorar la calidad histológica del tejido reparativo que produce el cartílago hialino en la lesión mediante la estimulación osteocondral del hueso subyacente. Se trata de técnicas ampliamente utilizadas en la actualidad (Rae et al., 1989; Buckwalter, 1994; Rodrigo et al., 1994; Jhonson, 2001; Steadman et al., 2001; Steadman et al., 2003; Yen et al., 2008) y se basan en que, en las regiones con defectos de espesor completo o con lesiones degenerativas del cartílago articular, la lesión terapéutica del hueso subcondral subyacente provoca el sangrado de los vasos sanguíneos lo que conlleva la formación de un coágulo de fibrina en la superficie ósea (Buckwalter, 1994; Pässler, 2000; Williams et al., 2007). Las células madres indiferenciadas migraran hacia el coágulo,

proliferando y diferenciándose hacia células con las características morfológicas de los condrocitos (Shapiro et al., 1993). Sin embargo, en la mayoría de los casos, el tejido reparativo que se genera en la lesión es fibrocartilago (Furukawa et al., 1980; Khan et al., 2008; Steinwachs et al., 2008). En la zona más profunda del defecto se encuentran células procedentes del hueso subcondral con altos niveles de colágeno tipo I y mRNA de la osteonectina, produciéndose grandes cantidades de sustancia osteoide. En la superficie, el coágulo de fibrina se diferencia hacia un mesénquima indiferenciado con alto contenido en colágeno tipo III (Metsäranta et al., 1996). Por tanto, el tejido reparador que se forma con este tipo de técnicas es fibrocartilago, con escaso número de células que sintetizan colágeno II y, en consecuencia, de una menor calidad que el tejido cartilaginoso hialino a la hora de desempeñar las funciones de transmisión de cargas y permitir el deslizamiento con una baja fricción y resistencia a las fuerzas de cizallamiento (Buckwalter et al., 1990). En cuanto a los resultados clínicos de estas técnicas, los resultados varían considerablemente al revisar los estudios que existen en la bibliografía. Johnson obtiene resultados con un tejido fibrocartilaginoso viable seis años después de la lesión con la intervención de condroplastia de abrasión. De esta forma, consigue aumentar el tiempo durante el cual el paciente no precisa de una artroplastia total de rodilla (Johnson, 1986). Steadman consigue una mejoría clínica y funcional significativa en pacientes menores de 45 años tratados mediante la técnica de microfracturas (Steadman et al., 2003), y Williams también recoge buenos resultados en lesiones importantes de cartilago (grado III-IV de Outbridge) durante el primer año tras la cirugía, aunque

precisa que en muchos casos los pacientes no llegan a conseguir el grado de actividad previa a la lesión (Williams et al., 2007). Millett estudia el resultado clínico del tratamiento de las lesiones condrales con la técnica de microfracturas, observando que las lesiones de menor tamaño responden significativamente mejor a este tipo de tratamiento (Millett et al., 2009). En todo caso, el resultado tras la utilización de este tipo de técnicas por sí solas tiene importantes limitaciones, pues el tejido formado no posee las características ni la calidad del tejido cartilaginoso hialino y, en consecuencia, su deterioro es más rápido y los pacientes sometidos a este tipo de tratamientos tienen más probabilidades de precisar reoperaciones que aquellos que se someten a una artroplastia total de rodilla (McAdams et al., 2008). Por tanto, este tipo de técnicas no parecen, en el momento actual, la solución definitiva al problema de las lesiones cartilaginosas.

Frente a las técnicas reparativas, las técnicas de reconstrucción buscan obtener un cartilago hialino funcional que se integre en el cartilago indemne de alrededor de la lesión sin depender de la llegada de células madre. El trasplante de injertos autógenos osteocondrales provenientes de áreas de no carga de la articulación del propio paciente, o bien de aloinjertos de donantes, está asociado con resultados funcionales razonablemente buenos a corto plazo, y está indicado en lesiones osteocondrales amplias. Pero esta técnica aún presenta importantes problemas a solucionar, tal como son la comorbilidad de la región dadora, las características propias del cartilago de las zonas de carga y la deficiente integración entre el implante y el cartilago circundante (Jackson et al., 2001; Lohmander et al., 1994). Respecto a

los resultados clínicos, Kuntsen habla de mal resultado en un 23% de los casos a los 5 años en un estudio randomizado de 83 pacientes a los que se les sometía de manera comparativa a trasplante autólogo de condrocitos y a mosaicoplastia (Bodugoz-Senturk et al., 2009). Gudas, en otro estudio clínico prospectivo y randomizado, reporta una tasa de reoperación a los tres años del 4% en pacientes sometidos a mosaicoplastia, frente al 31% en aquellos sometidos a microfracturas (Bouwmeester et al., 1999). Por tanto, los resultados clínicos para estas técnicas, lejos de ser definitivos, son dispares y la capacidad de estas técnicas para detener o retrasar la progresión del daño articular no está clara (McAdams et al., 2008).

Las técnicas regenerativas basadas en la bioingeniería tisular son probablemente las que más esperanzas están creando a la hora de solucionar el problema del daño articular. El último objetivo de estos tratamientos sería conseguir replicar el proceso del desarrollo embriológico de la superficie articular, pero esto, con los conocimientos actuales no es posible hacerlo, pues en la articulación del adulto no existe el medio ambiente presente en el embrión, y los precisos requerimientos y la completa secuencia de los procesos que ocurren durante la formación del cartílago articular aún no son del todo conocidos (Reinholz et al., 2004). En consecuencia, la verdadera regeneración del cartílago articular no es factible en el momento actual. Sin embargo, la completa regeneración no se considera imprescindible para disminuir el dolor y restaurar la función articular. En contraposición a la completa regeneración, la sustitución del tejido dañado por un tejido funcional que no sea necesariamente idéntico al original, puede

convertirse en una solución a las lesiones del cartílago articular. Así, la sustitución de un tejido dañado por otro capaz de funcionar correctamente bajo altas cargas mecánicas durante un largo periodo de tiempo lleva haciéndose desde hace décadas en la cirugía oral y maxilofacial (Berry et al., 1998; Mjor, 1987).

Los cuatro pilares sobre los que se asienta la bioingeniería tisular son células, matrices para la liberación y/o almacenamiento celular, factores biorreactivos y los factores mecánicos que contribuyen a la diferenciación de un tejido (Potter et al., 1998). Se trata de un campo multidisciplinar que aplica los principios de la ingeniería y de la biología para el desarrollo de sustitutos biológicos que restauren, mantengan o mejoren la función tisular (MacAdams et al., 2005; Langer et al., 1993; Vacanti et al.; 1999). Actualmente, la ingeniería tisular combina el aporte de células, indiferenciadas o no, que se colocan sobre una matriz a la cual se pueden añadir factores que aceleren su proliferación y diferenciación para ser trasplantadas a la estructura dañada y conseguir su regeneración.

En el caso del cartílago articular, las células utilizadas son células madre mesenquimales, pues son las únicas que han demostrado su capacidad para diferenciarse hacia el fenotipo deseable y de producir la matriz extracelular cartilaginosa con éxito (Colnot, 2011). Pero dado que su aporte por sí solas, tal como ocurre en las técnicas de microfracturas, produce un tejido fibrocartilaginoso sin las propiedades mecánicas y funcionales del cartílago hialino, el uso de matrices busca conseguir un tejido de mejor calidad. (Gille et al., 2010). Multitud de matrices se han

utilizado en investigación tratando de dar con aquella que aporte el mejor entorno para el crecimiento celular, la mejor capacidad de biodegradación y eliminación de los productos de deshecho y la mejor capacidad para mantenimiento de la estructura espacial del tejido a formar (Meyer et al., 2006; Nuernberger et al, 2011).

Sin embargo, el uso y diseño de matrices para la reparación del cartílago da lugar a la aparición de otros problemas de difícil solución. Para que una matriz sea útil, ha de tener resistencia, pero a la vez crear un medio ambiente factible para el desarrollo celular, pues las matrices sólidas privan a las células en formación de los necesarios estímulos mecánicos para su desarrollo correcto, y las blandas pue-

den fallar a la hora de mantenerse en su sitio al implantarlos (Mouwn et al., 2007). Por otra parte, las matrices deben de ser lo suficientemente resistentes para resistir la fricción articular, pero a la vez no provocar daño articular abrasivo en el tejido sano circundante durante el periodo de integración. Si a estas dificultades a la hora de diseñar matrices le sumamos el hecho de que los resultados clínicos no demuestran una evidencia superior de mejores resultados al compararla con otras técnicas reparativas (Ripoll et al., 2011), hay autores que sugieren que el uso de las matrices complica aún más la búsqueda de un tratamiento para la reparación articular (Huey et al., 2012).



USO DE SUSTANCIAS INTRAARTICULARES

Con el fin de sortear los problemas que conlleva el uso de matrices en la reparación del cartílago articular, se han desarrollado técnicas que buscan promover la formación de un neocartílago resistente sin necesidad de implantar una matriz exógena (Athanasίου et al., 2009). En esta línea, el uso de ácido hialurónico, factores de crecimiento de origen plaquetario y de células madre mesenquimales aplicados en forma de inyección intraarticular es un campo actual de estudio. Las principales ventajas de estos tratamientos es la facilidad para su aplicación, su bajo coste y la ausencia comorbilidad en su obtención.

El papel clave que juega el ácido hialurónico en actividades biológicas tan diversas como la proliferación y la actividad celular ha sido estudiado en cartílago a nivel molecular (Anastassiades et al., 1984; Goldberg et al., 1987), de tal forma que su capacidad para neutralizar radicales libres y superóxidos como el óxido nítrico (Graf Voin Der Schulenberg et al., 1997), de reducir la producción de prostaglandina E2 (Punzi et al., 1989), sus propiedades estimuladoras de producción del ácido hialurónico endógeno presente en la matriz extracelular del cartílago articular (Smith, 1987), su capacidad para inhibir la apoptosis del condrocito en pacientes con artrosis y la acción biológica demostrada que provoca sobre los condrocitos humanos (Blanco, 2000), sugieren que el

ácido hialurónico puede tener un papel importante en la terapia regenerativa. Si a esto le sumamos los resultados alentadores en numerosos estudios clínicos (Clegg, 2013), creemos que su uso está plenamente justificado en este tipo de patología.

Los concentrados de sangre autóloga, entre los que se encuentra el plasma rico en plaquetas, han ganado popularidad creciente entre los profesionales de la salud y entre los deportistas como resultado de la atención que le han prestado los medios de comunicación (Yusta, 2012). Aparte de su uso en cirugía ortopédica, el uso de estos productos está ampliamente documentado en cirugía cardiovascular, maxilofacial y plástica. (Welsh, 2000; Wiltfang et al., 2003; Hanna, 2004; Khalafi, 2008). Su uso se basa en el concepto de que los concentrados de sangre autóloga ricos en plaquetas contienen gran cantidad de moléculas (Borregaard et al., 1997; Murray et al., 2007; Mishra et al., 2009; McCarrel et al., 2009) que contribuyen a la cicatrización de la lesión (Anitua et al., 2004; Woodell-May et al., 2008). Estos moléculas son citoquinas (FGF-2, IGF-1), factores de crecimiento (PDGF), TGF beta, VEGF y Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), todos ellos capaces tanto de incrementar la tasa de proliferación de varios tipos celulares como de influir en la síntesis de tejido y en su remodelación. (Lopez-Vidriero et al., 2010). El mecanismo de acción a la hora de favorecer la reparación de las lesiones del cartílago articular, se cree que está en relación con la capacidad de estimulación y diferenciación que tienen los factores de crecimiento plaquetarios sobre los condrocitos (Akeda et al., 2006), así como los efectos positivos que tienen sobre la síntesis de matriz extracelular (Chubinskaya et al.,

2007; Longobardi et al., 2007) y la capacidad para inducir una mayor producción de factores de crecimiento por parte de los condrocitos vecinos a la lesión (Shi et al., 2009).

Aunque el uso de plasma rico en plaquetas para la reparación del cartílago o su uso intraarticular como terapia para la patología articular es relativamente nuevo, existen estudios que refutan su uso (Jang, 2012). Estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento de condrocitos con estas sustancias producen un incremento significativo de la proliferación celular y un aumento de la producción de glicosaminoglicanos y colágeno tipo II (Akeda et al., 2006). Asimismo, su capacidad para inhibir la activación del factor nuclear KB y de disminuir la expresión de la ciclooxigenasa 2, ambos reguladores de la inflamación, también parece contribuir a favorecer la reparación del cartílago dañado (Bendinelli et al., 2010). Respecto a los estudios clínicos, existen casos publicados con buen resultado de uso de plasma rico en plaquetas en lesiones osteocondrales de pacientes, tanto solos (Sanchez et al., 2003) como asociados en matrices con células madre mesenquimales (Haleem et al., 2010). La aplicación intraarticular de PRP también ha sido estudiada, encontrándose una mejora en las escalas de dolor y una mejora de la funcionalidad (Sanchez et al., 2008; Kon et al., 2010), de tal forma que estos autores consideran que el tratamiento con plasma rico en plaquetas es una terapia segura y efectiva capaz de mejorar el dolor, la función y la calidad de vida de los pacientes con patología articular.

Dentro del campo de la bioingeniería, el descubrimiento de que era posible obtener células madre troncales del

tejido adiposo supuso una revolución, ya que así se podían obtener grandes cantidades de células madre con buenas características fenotípicas y con un correcto potencial de diferenciación, pero eliminando la necesidad de realizar una punción de la médula ósea del paciente (Zuck et al., 2001). Las células troncales de origen adiposo pueden ser utilizadas con fines médicos, y existen multitud de aplicaciones demostradas en los campos de la cirugía maxilofacial (Mesimaki et al., 2009), la cardiología (Singh et al., 2009), la cirugía torácica (Alvarez et al., 2008), la dermatología, cirugía plástica (Rigotti et al., 2007) y la cirugía general (García-Olmo et al., 2009; Pecanha et al., 2012).

En el caso de la cirugía ortopédica, existen múltiples líneas de investigación que estudian su aplicación en las lesiones osteocondrales en combinación con matrices con unos resultados esperanzadores, aunque todavía nada definitivos. Tal como hemos señalado en apartados anteriores, el principal problema con el que se enfrentan estas técnicas es que, aparte de solucionar los complejos problemas que surgen al investigar las células madre per se, se suman los importantes problemas que surgen al tratar de sintetizar una matriz artificial que cumpla los criterios de consistencia, integración, y biodegradación necesarios para que las

células madre en ella inmersa puedan desarrollarse correctamente. En contraposición, la aplicación intraarticular, aunque menos estudiada, emerge como un nuevo campo con resultados esperanzadores, pues permite centrar todo el esfuerzo en el elemento celular reparador. Aunque no muy numerosos, existen estudios previos que avalan el potencial antiinflamatorio y condroprotector de las inyecciones intraarticulares de células madre de origen adiposo en el animal de experimentación (Toghraie et al., 2011; Hurnee et al., 2012; Qy et al., 2012). Sin embargo, no encontramos en la bibliografía previa ningún estudio experimental que evaluara la posible acción sinérgica del uso conjunto de estos elementos celulares con el ácido hialurónico y el plasma rico en plaquetas.

Dadas las evidencias que hacen pensar que la aplicación intraarticular por separado de factores de crecimiento de origen plaquetario, ácido hialurónico y células madre de origen mesenquimal tiene un efecto beneficioso en el tratamiento de la patología del cartílago articular, el propósito de nuestro estudio es tratar de dilucidar si la aplicación intraarticular combinada de estas sustancias puede tener un efecto sinérgico, y en consecuencia mejorar la capacidad regenerativa del propio cartílago lesionado.



DISEÑO DEL ESTUDIO

Muchos estudios han utilizado el conejo como modelo animal de experimentación para investigar el tratamiento de las lesiones de cartílago articular. Se trata de un animal de experimentación relativamente barato, su estabilización es sencilla y la madurez esquelética la alcanzan a los 9 meses de vida. En nuestro estudio, realizamos lesiones de 3 mm de profundidad y 3 mm de grosor por considerarse éste el tamaño mínimo necesario para evitar la regeneración espontánea de la lesión característica de muchos de los animales de experimentación (Tamai et al., 2005, Trzeciack et al., 2006). Debido a que el grosor medio del cartílago del cóndilo del conejo es de 0,3 mm, cerca del

90% del volumen del defecto creado afectó al hueso subcondral. Para realizar la lesión utilizamos un punzón quirúrgico en vez de un punch de biopsia, pues nos pareció que este tipo de lesión se asemeja más a la que vemos en nuestra práctica clínica diaria. Respecto al lugar para situar la lesión, elegimos realizarla en los cóndilos medial y lateral del fémur, pues son considerados en este animal zonas de máxima carga (Wei et al., 1999; Ramallal et al., 2004) y estos son los lugares equivalentes en el humano a las zonas donde mayor número de lesiones aparecen y más sintomáticas son.

La edad de los conejos en el momento de la intervención fue de 24 semanas para evitar que la inmadurez esquelética interfiriera en la reparación del defecto cartilaginoso. El tiempo de seguimiento de las lesiones fue de 2 y 4 semanas, divididos en dos grupos de 12 conejos cada uno. Es cierto que este tiempo de seguimiento fue inferior a la media de otros estudios (Rudert, 2002), pero consideramos que existen estudios previos que justifican estos tiempos en este modelo animal para evaluar correctamente los resultados a corto plazo de las terapias de reparación cartilaginosa como una demostración de concepto (Aherrn et al., 2009). Por otra

parte, nos hubiera gustado contar con un mayor número de especímenes, con el objeto de aumentar el número de muestras y hacer un análisis estadístico de los resultados. Pero por un lado nos encontramos con el sobrecoste que supondría aumentar el número de individuos. Y por otro, nuestro estudio fue concebido como una demostración de concepto, con la esperanza de que, si las conclusiones resultaban satisfactorias, podríamos ampliar el número de individuos en otro estudio futuro descartando aquellos grupos con peores resultados y centrándonos en los grupos con resultados más favorables.

6.4

RESULTADOS DE LA APLICACIÓN AISLADA DE ÁCIDO HIALURÓNICO, PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOSO

Las lesiones del grupo control, al que no se le aplicó ninguna sustancia, presentaron en nuestro estudio la reacción cicatricial esperable en este tipo de lesiones del cartílago articular. A las dos semanas, la zona lesional permanecía deprimida y rellena de tejido conectivo con restos de cartílago y hueso postlesionales. La transición con el cartílago indemne estaba formada por un cartílago hipocelular con pérdida de la estructura histológica en la superficie, y que se hallaba recubierto por lengüetas de tejido conectivo procedentes del tejido cicatricial. A las 4 semanas la lesión ya se había rellenado totalmente, de tal forma que había igualado en la superficie al cartílago adyacente indemne. Pero la

profundidad de la lesión continuaba rellena por un tejido conjuntivo vascularizado, aunque algo más fibroso y organizado que a las 2 semanas. Sin embargo, ya se apreciaban algunas áreas de diferenciación cartilaginosa en el interior de la lesión, así como de hueso neoformado, aunque de poca calidad. En las zonas limítrofes al cartílago sano aparecían fisuras separando ambos tejidos, que interpretamos como defectos de integración.

Este tipo de reacción es la fisiológica que se aprecia en las lesiones del cartílago de espesor completo. Con el tiempo, la porción más profunda de la lesión se reconstruye con hueso y se restablece la lá-

mina subcondral. Sin embargo, el defecto se llena de fibrocartilago, cuyas propiedades biomecánicas son inferiores a las del cartilago articular. Este tejido tiene una concentración mayor de colágeno tipo I, y menos proteoglicanos que el cartilago articular, y no se regeneran las capas de colágeno tangenciales de la zona superficial. Los estudios a largo plazo han demostrado que este cartilago sufre un proceso de fibrilación y degeneración (Hayes, 2001).

El grupo al que se le aplicó ácido hialurónico intraarticular, a las dos semanas no mostró grandes cambios respecto al grupo control. La superficie de la lesión permanecía deprimida y, en profundidad, se apreciaba el mismo tejido conectivo vascularizado y pobremente diferenciado. El escaso tejido cartilaginoso existente era de poca calidad y solo apreciamos un aumento de las luces vasculares respecto al control. Sin embargo, a las 4 semanas si que encontramos diferencias importantes respecto al grupo control. Aunque la superficie permanecía algo deprimida, el cartilago se había desarrollado notablemente, apareciendo un grosor hasta 6 veces más que el grupo control. En general se trataba de un cartilago pobremente diferenciado, que recordaba al hialino en unas zonas y en otras al fibroso. Asimismo, se apreciaban condrocitos y condronas, pero con una distribución desordenada. En relación con el hueso subcondral, aparecía cartilago en regeneración que recordaba citológica y arquitecturalmente al cartilago articular, aunque en superficie se encuentra constituido por tejido conectivo fibroso. Es importante señalar que la arquitectura cartilaginosa articular solo la evidenciamos cuando el cartilago estaba en relación con el hueso subcondral, y este, en todo caso, aún era escaso, lo

que pone en evidencia la importancia del hueso subcondral a la hora de que la reparación del defecto cartilaginoso sea más rápida y de mejor calidad. En esta línea, existen estudios previos que corroboran que las perforaciones quirúrgicas aceleran la formación del hueso subcondral en las lesiones osteocondrales (Chen, 2012), y en nuestro estudio la aplicación de ácido hialurónico consiguió un efecto similar. Por tanto, la aplicación de ácido hialurónico conseguiría de esta forma un efecto similar al conseguido al realizar perforaciones pero sin la necesidad de una intervención quirúrgica. Sin embargo, dada la ausencia de un grupo control con el que comparar, y el insuficiente número de especímenes, no nos es posible confirmar este supuesto. No obstante, creemos que este aspecto merece de por si un estudio aparte dadas las importantes repercusiones que tendría en el tratamiento de las lesiones osteocondrales.

Creemos que el aumento de las luces vasculares en las dos primeras semanas podría guardar relación con el aporte de HA, pues existen estudios previos que hablan de la capacidad para promover la angiogénesis que tiene esta sustancia a través de la inducción de la interacción del receptor RHAMM-TGF β vía CD44-PKC δ (Park et al., 2012). Este aumento de la vascularización permitiría que la irrigación vascular del foco de la lesión fuera más eficaz, y en consecuencia la respuesta inflamatoria desencadenada y el acceso de células madre de la médula y de la matriz ósea fuera más eficiente, explicando de esta forma el mayor desarrollo en grosor del cartilago en la 4ª semana al compararlo con el control.

De todos los grupos a los que se les añadió una sola sustancia intraarticular, al que se le añadió plasma rico en plaquetas fue en el que más signos de regeneración cartilaginosa observamos. A las dos semanas el cartílago de reparación todavía era más delgado que el fisiológico aunque aparecía una mayor preservación en general del cartílago articular. En los bordes laterales se encontraron fenómenos de neoformación ósea en profundidad y, en algunas zonas, el cartílago reactivo presentaba una relativa conservación de la arquitectura con presencia de la tidemark y del cartílago calcificado, así como condrocitos hipertróficos suprayacentes con una basofilia marcada en el citoplasma. En algunos de los animales de este grupo, se encontraron signos de regeneración todavía más marcados, con formaciones condrocitarias situadas en la profundidad de la lesión con una orientación celular que mimetizaba la del cartílago articular normal, abundancia de condrocitos y con la matriz pericelular marcadamente basófila. Llamativamente, la porción basal de estas formaciones se hallaba normalmente en contacto con el hueso subcondral neoformado, una vez más poniendo de relieve la importancia que parece tener el hueso subcondral a la hora de definir la calidad y rapidez de reparación del cartílago articular. A las cuatro semanas, el tejido neoformado tenía más apariencia de cartílago hialino. Es notable la mayor proliferación del cartílago articular y del hueso subcondral, que parecía orientar la diferenciación cartilaginosa. Además existen dos hechos propios de este grupo. Por un lado la relativa madurez y avascularidad del cartílago superficial y, por otro, la diferenciación en profundidad del cartílago inmaduro, en el que junto a condrocitos redondeados aparecían células de hábito mesenquimal

alargado. Por último, al compararlo con los grupos antes descritos, nos sorprendió la ausencia de fisuras y la buena integración en el tejido contiguo sano.

Por tanto, parece que el plasma rico en plaquetas aislado tuvo un mayor efecto beneficioso sobre la reparación del cartílago que el ácido hialurónico y el grupo control. Es de destacar que estos efectos aparecieron en un periodo temprano, pues en la segunda semana, aunque más delgado y mal integrado (presencia de fisuras), el cartílago reactivo presentaba una relativa conservación de la arquitectura con presencia de cartílago calcificado y de tidemark, así como fenómenos de neoformación ósea. A las 4 semanas estas características morfológicas estaban mejoradas, unido a la ausencia de fisuras que orientaba hacia una mejor integración en el cartílago adyacente. Esto coincide con la bibliografía en cuanto a la mejora de la capacidad de cura del cartílago desde etapas tempranas (Krüger 2012). Creemos que el mecanismo causal viene dado por la capacidad de estimulación y diferenciación sobre los condrocitos (Akeda 2006), el aumento de síntesis de MEC (Chubinskaya 2007) (Logobardi, 2006) y la capacidad que tienen los factores de crecimiento plaquetarios para inducir la producción de factores de crecimiento por parte de los condrocitos vecinos (Shi 2009). Este último aspecto podría explicar la mejor integración de los bordes de la lesión que presenta este grupo.

El grupo al que se le añadió células madre fue el que peor resultado observamos al compararlo con el resto de sustancias probadas de manera aislada. De forma general, en las etapas tempranas apareció una reparación de la lesión con

un tejido conectivo denso, vascularizado, rico en fibras, y que no llegaba a igualar en nivel al cartílago sano adyacente y con fisuras verticales en los bordes laterales. A las 4 semanas aparecían signos de regeneración cartilaginosa y ósea, pero eran escasos y desorganizados. Se trataba de una mezcla de tejido conectivo fibroso bastante denso y cartílago inmaduro con una disposición anárquica de los condrocitos y de los restos óseos. Por tanto, en este grupo, aunque existen datos que orientan hacia una regeneración cartilaginosa, esta es pobre y desorganizada, aunque mejor que en el grupo control.

Por tanto, en nuestro estudio, las células madre aisladas y aportadas intra-articularmente no parece aportar benefi-

cio a la reparación. Quizá la causa sea que sea necesario aplicarlas directamente en la lesión, o en combinación con matrices, para que puedan desempeñar su función reparadora. Esta teoría podría confirmarse si, utilizando células madre de origen hematopoyético, se obtuviera un resultado similar.

Por tanto, a nuestro entender, no compensa hacer la inyección intraarticular de estas células, lo que no significa que la aplicación directamente en la cavidad formada por la lesión osteocondral no pueda tener un efecto beneficioso, tal como defienden estudios previos (Fuentes-Boquete, 2007).

6.5

RESULTADO DE LA APLICACIÓN COMBINADA DE ÁCIDO HIALURÓNICO, PLASMA RICO EN PLAQUETAS Y CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DE ORIGEN ADIPOSO

El grupo al que se le administró ácido hialurónico y plasma rico en plaquetas esperando encontrar un efecto sinérgico entre ambas sustancias fue el que mejor comportamiento presentó al compararlo con la totalidad de los grupos estudiados. A las dos semanas la lesión se hallaba ocupada por un tejido conectivo celular de aspecto abigarrado, con presencia en profundidad de restos óseos y cartílago en diferentes fases de degeneración, y con presencia de fisuras en los bordes de la lesión. Sin embargo, a las 4 semanas, aparecía un cartílago que, aunque inmaduro, era hipercelular y estaba bien integrado

en el cartílago articular vecino. Este nuevo cartílago se asentaba sobre hueso subcondral con signos activos de síntesis ósea y, a su vez, el hueso subcondral asentaba sobre una médula ósea bien vascularizada. El efecto sinérgico de ambas sustancias se apreció sobretodo en una mejor restauración del hueso subcondral y en la presencia de un cartílago hipercelular que, aunque todavía inmaduro, presenta más calidad que el del resto de grupos estudiados. Una vez más se resalta la importancia del hueso subcondral en el proceso de cura de las lesiones del cartílago, pues en nuestro estudio, aquellos grupos con

mejor respuesta siempre presentaron una mejor reparación previa del mismo, y no solo eso, sino que pareció inducir polaridad en el desarrollo del cartílago, lo que es indispensable para que se regenere mejor que el grupo control.

Aunque hay muchos estudios que comparan el efecto de ambas sustancias aplicadas por separado (Spaková, 2012; Mei-Dan O, 2012) no encontramos ninguno previo que estudie su aplicación combinada. Solo hemos encontrado un estudio que habla de que su uso combinado favorece la formación de hueso al combinar ambas sustancias con gránulos de hidroxapatita (Ohba S, 2012). Esto podría mejorar la reparación del hueso subcondral lesionado, y en consecuencia, actuar como acelerador de la reparación de cartílago, lo que explicaría el efecto sinérgico que se apreció en nuestro estudio.

El estudio de los animales a los que se le administró el plasma enriquecido con plaquetas asociado a células madre reveló en la etapa temprana una mayor preservación del cartílago articular tanto citológica como arquitecturalmente. A las 4 semanas presentó una buena reconstrucción del hueso subcondral, y la lesión aparecía rellena de un cartílago citológicamente maduro, aunque no presentaba la arquitectura del cartílago articular normal. También en este grupo apreciamos la presencia de condronas hiperplásicas, signo de reacción artrósica. Por tanto, este grupo se caracteriza por una mayor supervivencia y vitalidad del cartílago articular ya en las etapas tempranas, asociado a una buena reconstrucción del hueso subcondral en las tardías, hecho ya observado en el grupo descrito anteriormente (ácido hialurónico y plasma enriquecido en plaquetas).

El grupo experimental al que se le administró ácido hialurónico y células madre presentó en las etapas tempranas un relleno de la lesión a expensas de una combinación zonal de tejido conectivo y cartílago hipertrófico. En el primer caso, el tejido recordaba a los hallazgos encontrados tras la administración aislada de células madre, es decir tejido conectivo mezclado con tejido óseo, buena vascularización y actividad sintética del tejido óseo subcondral. En el segundo caso, observamos un cartílago hipertrófico sin la arquitectura típica y sin formación de hueso subcondral, tal como cuando se administraba ácido hialurónico aislado. De forma resumida, se puede decir que este grupo se caracterizó por presentar resultados dispares y que es el que menos resultado regenerativo y conservador del cartílago consiguió, y que, en vez de producirse un efecto sinérgico entre ambos agentes, es como si ambos se hubieran administrado por separado, no obteniéndose así el efecto perseguido.

Por último, el grupo al que se le administraron los tres agentes en conjunción presentó a las cuatro semanas un relleno de la lesión por un cartílago muy similar al cartílago articular, asentado sobre hueso subcondral, en el que se podía apreciar una zona de cartílago calcificado y una tidemark. Sin embargo, los hallazgos encontrados no son comparables cuantitativa ni cualitativamente con los grupos en los que se ha utilizado plasma enriquecido con plaquetas solo o asociado con ácido hialurónico. Por tanto, se puede concluir que no se produce la sinergia buscada utilizando estos tres productos.

Por tanto, de todos los grupos a los que se les administraron sustancias combinadas, al que se le administró ácido hialurónico y plasma rico en plaquetas fue el que mejor respuesta presentó, seguido del que se le administró células madre y plasma rico en plaquetas. En ambos casos observamos una mejora en cuanto a estructura del nuevo tejido formado, celularidad, integración en los márgenes con el tejido sano y reconstrucción de la lámina subcondral al compararlos con el control

y con los grupos a los que se les administraron las sustancias por separado. Frente a estos grupos en los que los agentes utilizados parecieron mostrar un efecto sinérgico, el resto presentaron resultados dispares: la combinación de ácido hialurónico y células madre produjo, en diferentes fases, el mismo efecto que si se hubiesen utilizado por separado, y la combinación de ácido hialurónico, células madre y plasma rico en plaquetas tampoco produjo la sinergia buscada.

7

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Analizados los resultados obtenidos en nuestro estudio, podemos establecer las siguientes conclusiones:

1. En la rodilla del conejo con lesiones osteocondrales inducidas experimentalmente, la aplicación de terapias inductivas ayuda a mejorar la capacidad autorreparativa del cartílago articular a corto plazo.
2. La aplicación por separado de ácido hialurónico y plasma rico en plaquetas produce una mejora de las características morfológicas del cartílago de reparación, y un aumento de su capacidad de regeneración.
3. La aplicación combinada de ácido hialurónico y plasma rico en plaquetas tiene un efecto sinérgico en la regeneración osteocondral al acelerar y mejorar el proceso reparativo.
4. Para que la regeneración cartilaginosa sea más eficaz y completa, es indispensable que antes se restablezca correctamente la arquitectura del hueso subcondral.
5. Los grupos que mostraron mejor respuesta reparadora presentaron un restablecimiento de la arquitectura del hueso subcondral más temprana y de mejor calidad morfológica.
6. La aplicación intraarticular de células madre mesenquimales de origen adiposo, sin soporte matricial o depósito directo en la cavidad lesionada, no produce un efecto acelerador en la reparación de las lesiones osteocondrales.
7. La aplicación combinada de ácido hialurónico, células madre y plasma rico en plaquetas no produce un efecto sinérgico a la hora de promover la reparación de las lesiones osteocondrales.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

(1) Moskowitz RW. The burden of osteoarthritis: clinical and quality of life issues. *Am J Mang Care*. 2009 sep; 15 (8 supl): S223-9.

(2) Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*. 2010 Aug; 26 (3):355-69.

(3) Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2006;20(1):3-25.

(4) Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res*. 2004; 427:6-15.

(5) Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ. Chondral injuries. *Curr Opin Rheumatol*. 2002;14(2):134-41.

(6) O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Surg Am*. 1998 Dec 01; 80 (12): 1795-1812.

- (7) Robinson JC, Pozen A, Tsenq S, Bozic KJ. Variability in cost associated with total hip and knee replacement implants. *J Bone Joint Surg Am.* 2012 Aug 8. doi: 10.2106/JBJS.K.00355.
- (8) Asheesh Bedi MD, Brian TF, Riley JW, Williams MD. Management of articular defects of the Knee. *J Bone Joint Surg Am.* 2010 Apr 01; 92 (4):994-1009.
- (9) Gulotta LV, Bizzinia BS, Cunningham MD, Fotier L, Maher S, Rodeo SA. What 's new in orthopaedic research. *J Bone Joint Surg Am.* 2011 Nov 16; 93 (22): 2136-2141.
- (10) Timothy MW, Maher SA. Current and novel approaches to treating chondral lesions. *J Bone Joint Surg Am.* 2009;91 Suppl 1:120-5.
- (11) Chun JS, Oh H, Yang S, Park M. Signaling in cartilage development and degeneration. *BMB Rep.* 2008; 41(7):485-94.
- (12) Pacifici M, Koyama E, Shibukawa Y, Wu C, Tamamura Y, Enomoto-Iwamoto M et Al. Cellular and molecular mechanisms of synovial joint and articular cartilage formation. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 68:74-86.
- (13) Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater.* 2006; 12:92-101.
- (14) Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *AAOS Instr Course Lect.* 1998; 47:477-86.
- (15) Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template tissue repair. *Clin Orthop.* 2001;(Supl 391):26-33.
- (16) Proteoglycans: Direct evidence for the variable length of the chondroitin sulfate-rich region of proteoglycan subunit core protein. *J Biol Chem.* 1982; 257:9830-9.
- (17) Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettner KE. Heterogeneity of articular chondrocytes. En: Kuettner KE y cols. *Articular Cartilage and Osteoarthritis.* New York. 1992; pp:237-49.
- (18) Buckwalter JA, Rosenberg LG. Electron microscopic studies of cartilage proteoglycans. A multi-modal multiphoton investigation of microstructure in the deep zone and calcified cartilage. *J Anat.* 2012; 4: 405-16.
- (19) Iqbal K, Khan Y, Minhas LA. Effects of immobilization on thickness of superficial zone of articular cartilage of patella in rats. *Indian J Orthop.* 2012; 46(4):391-4.

- (20) Wong M, Carter DR. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone*. 2003 Jul; 33(1):1-13.
- (21) Maroudas A. Physiochemical properties of articular cartilage. En: Freeman M. *Adult articular cartilage*. 2^a ed. Tunbridge Wells: Pitman Medical; 1979. p. 215-290.
- (22) Clark JM. The organization of collagen in cryofractured rabbit articular cartilage. A scanning electron microscopic study. *J Orthop Res*. 1985; 3:17-29.
- (23) Hunter JA, Finley B. Scanning electron microscopy of connective tissues: articular cartilage. *Int Rev Connect Tissue res*. 1973; 6:615.
- (24) Clarke IC. The microevaluation of articular surface contours. *Ann Biochem Eng*. 1972; 1:31.
- (25) Wright V, Dowson D, Kerr J. The structure of joints: articular cartilage. *Int Rev Connective Tissue Res*. 1973; 6:109.
- (26) Chen R, Chen S, Chen XM, Long X. Study of the tidemark in human mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol*. 2011 Nov; 56(11): 1390-7.
- (27) Burr DB. Subchondral bone. En: Brandt KD, Doherty M, Lohmander LS, editores. *Osteoarthritis*. Oxford, UK: Oxford University Press; 1998. p. 144-56.
- (28) Burr DB. Anatomy and physiology of the mineralized tissues: role in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2004;12:S20-S30.
- (29) Madry H, Van Dick CN, Mueller-Gerbl M. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2010 Apr; 18 (4): 419-33.
- (30) Yang F, Ying Z, Duan X, Tan H, Yang B, Guo L et al. Histomorphometric analysis of adult articular calcified cartilage zone. *J struct Biol*. 2009 Dec; 168 (3).
- (31) Eyre D. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold. *Science*. 1980; 207 13715-1322.
- (32) Kempson GE, Muir H, Pollard C, et al. The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta*. 1973; 297:456-472.
- (33) Miller EJ. The structure of fibril-forming collagens. *Ann N Y Acad Sci*. 1985; 460:1-13.

(34) Eyre DR, Wu JJ, Wodds P. Cartilage-specific collagens: Structural studies. En Kuettner KE, Schleyerbach R, Peyron JG et al, editores. Articular cartilage and osteoarthritis. Nueva York: Raven Press; 1992. p. 119-31.

(35) Sandell LJ. Molecular biology of collagens in normal and osteoarthritic cartilage. En: Kuettner KE, Goldberg VM, editores. Osteoarthritic disorders. Rosemont, IL. American Academy of orthopaedic surgeons. 1995. p. 131-46.

(36) Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *Faseb J*. 1989; 3:2042-51.

(37) Hill DJ, Logan A. peptide growth factors and their interactions during chondrogenesis. *Prog Growth Factor Res*. 1992;4:45-68.

(38) Glant TT, Hadhazy CS, Micek K, Sipos A. Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II. *Histochemistry*. 1985;82:149-58.

(39) Lohmander LS, Saxne T, Heinegard DK. Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis*. 1994;53:8-1.

(40) Cawston TE. Metalloproteinase inhibitors and the prevention of connective tissue breakdown. *Pharmacol Ther*. 1996; 70:163-82.

(41) Close DR. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*. 2001; 60(Supl 3):62-7.

(42) Goldbring MB. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2012 Aug; 4(4) 269-85.

(43) Wang Y, Wei L, Zeng L, He D, Wei X. Nutrition and degeneration of articular cartilage. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2012 Apr 4.

(44) Mobasheri A, Bondy CA, Moley K, Mendes AF, Rosa SC, Richardson SM et al. Facilitative glucose transporters in articular chondrocytes. Expression, distribution and functional regulation of GLUT isoforms by hypoxia, hypoxia mimetics, growth factors and proinflammatory cytokines. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2008;200:1-84.

(45) Peyron J, Stanescu V. Cartilage articulaire normal de l'adulte. Anatomie, physiologie, métabolisme et vieillissement. En: Dorfmann H., directeur. Encyclopédie médico-chirurgicale appareil locomoteur. Paris: Elsevier. 1994. 14-003-A-10 p.1-18.

- (46) Cohen NP, Foster RJ, Mow VC. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function and maintaining healthy state. *J Orthop Sport phys Ther.* 1998; 28:203.
- (47) Mow VC, Homes NH, Lai WM. Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review. *J Biomech.* 1984;17:377
- (48) Schwan DA, Radin EL, Hendren RB. The lubrication of articular cartilage by synovial fluid glycoproteins. *Arthritis Rheum.* 1979; 22:665-666.
- (49) Couceiro J. Fisiopatología del cartilago articular. En: *Manual SECOT de Traumatología y Cirugía Ortopédica*. 1ª ed. Editorial médica panamericana; 2003. p.128-141.
- (50) Aigner T, Rose J, Martin J, Buckwalter J. Aging theories of primary osteoarthritis: from epidemiology to molecular biology. *Rejuvenation Res.* 2004; 7:134-145.
- (51) Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect.* 2005; 54:465-480.
- (52) Buckwalter JA, Mankin HJ, Brown TD. Perspectives on chondrocyte mechanobiology and osteoarthritis. *Biorheology.* 2006; 43:603-609.
- (53) Goldring MB, Goldring SR. Osteoarthritis. *J Cell Physiol.* 2007; 213:626-634.
- (54) Williams RJ. Articular cartilage repair: clinical approach and decision making. *Operative techniques in Orthopaedics.* 2006;16(4): 218-26.
- (55) Loeser RF. Age related changes in the musculoskeletal system and the development of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010; 26:371-386.
- (56) Henning M, Nieck van Dick C, Mueller-Gerbl M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010; 18:419-433.
- (57) Jones RS, Keene GC, Learmonth DJ, Bickerstaff D, Awana NS, Costi JJ. Direct measurement of hoop strains in the intact and torn human medial meniscus. *Clin Biomech.* 1996;11:295-300.
- (58) Djian P, Versier G. Technique de reconstruction cartilagineuse. En: *EMC. Techniques chirurgicales Orthopédie-Traumatologie.* Paris: Elsevier Masson; 2006.44-035. p.1-18.
- (59) 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. *Eur Cell Mater.* 2008; 16:26-39.

- (60) Newman AP. Articular cartilage repair. *Am J Sports Med.* 1998; 26(2):309-24.
- (61) Schenck R, Goonight JM. Osteochondritis Dissecans. *Current Concept Review. J Bone and Joint Surg.* 1996; 78-A, (3): 439-456.
- (62) Sum JC, Hatch GF. Osteochondritis dissecans. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2011; 41 (10):796.
- (63) Onoda S, Sugita T, Aizawa T, Ohnuma M, Takahashi A. Osteochondritis dissecans of the knee in identical twins: a report of two cases. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2012; 20(1):108-10.
- (64) American Academy of Orthopaedic Surgeons Clinical Practice Guideline. The diagnosis and Treatment of Osteochondritis Dissecans. *J Bone Joint Surg Am.* 2012; 94 (14): 1322-1324.
- (65) Hunziker EB. Articular cartilage repair: are the intrinsic biological constraints undermining this process insuperable?. *Osteoarthritis Cartilage.* 1999; 7:15-28.
- (66) Hayes DW, Brower RL, John KJ. Articular cartilage. Anatomy, injury and repair. *Clin Podiatr Surg.* 2001; 18(1): 35-53.
- (67) Shapiro F, Koide S, Glimcher MJ. Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1993;75(4):532-53.
- (68) Moskowitz RW. The burden of osteoarthritis: clinical and quality of life issues. *Am J Mang Care.* 2009 sep; 15 (8): S223-9.
- (69) Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med.* 2010 Aug; 26 (3):355-69.
- (70) Arden N, Nevitt MC. Osteoarthritis: epidemiology. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2006;20(1):3-25.
- (71) Buckwalter JA, Saltzman C, Brown T. The impact of osteoarthritis: implications for research. *Clin Orthop Relat Res.* 2004; 427:6-15.
- (72) Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ. Chondral injuries. *Curr Opin Rheumatol.* 2002;14(2):134-41.
- (73) Widuchowski W, Lukasik P, Kwiatkowski G, Faltus R, Szyluk K, Widuchowski J. Isolated full thickness chondral injuries. Prevalance and outcome of treatment. A retrospective study of 5233 knee arthroscopies. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech.* 2008;75(5):382-6.

- (74) Gomoll A.H., Farr J, Gillogly SD, Kercher J, Minas T. Surgical management of articular Cartilage Defects of the Knee. Selected Instructional Course Lecture. *J Bone Joint Surg Am.* 2010; 92 (14): 2470-2490.
- (75) Jaiswal PK; Macmull S, Bentley G; Carrington RW, Skinner JA, Briggs TW. Does smoking influence outcome after autologous chondrocyte implantation?: a case-controlled study. *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91: 1575-8.
- (76) Ayral X. Arthroscopy and joint lavage. *Best Pract Res Clin Rheumatol.*2005;19(3):401-15.
- (77) Doral MN, Bozkurt M, Atay OA, Tetik O. Other arthroscopic procedures for the treatment of chondral injuries of the knee joint. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2007;41:93-7.
- (78) Fu X, Lin L, Zhang J, Yu C. Assessment of the efficacy of joint lavage in rabbits with osteoarthritis of the knee. *J Orthop Res.* 2009;27(1):91-6.
- (79) Moseley JB, O'Malley K, Petersen NJ, Menke TJ, Brody BA, Kuykendal DH. A controlled trial of arthroscopic surgery for osteoarthritis of the Knee. *N Eng J Med.* 2002; 347:81-8.
- (80) HorstmanCL, McLaughlin RM. The use of radiofrequency energy during arthroscopic surgery and its effects on intraarticular tissues. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2006; 19(2):65-71.
- (81) Peterson L. Experiencia con trasplante autólogo de condrocitos. En: *Insall & Scout: Cirugía de a Rodilla.* 3ª Ed. Marban. 2007. p 341-356.
- (82) Insall J: The Pridie debridement operation for osteoarthritis of the knee. *Clin Orthop.* 1974;101:61-67.
- (83) Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. *J Bone Joint Surg Am.* 1980;62(1):79-89.
- (84) Qiu YS, Shahgaldi BF, Revell WJ, Heatley FW. Observations of subchondral plate advancement during osteochondral repair: a histomorphometric and mechanical study in the rabbit femoral condyle. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003;11(11):810-20.
- (85) Johnson L. Arthroscopic abrasion arthroplasty historical and pathologic perspective: present status. *Arthroscopy.* 1986; 2(1):54-69.

(86) Johnson L. Arthroscopic abrasion arthroplasty: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:306-17.

(87) Akizuki S, Yasukawa Y, Takizawa T. Does arthroscopic abrasion arthroplasty promote cartilage regeneration in osteoarthritic knees with eburnation? A prospective study of high tibial osteotomy with abrasion arthroplasty versus high tibial osteotomy alone. *Arthroscopy.* 1997;13(1):9-17.

(88) Matsunaga D, Akizuki S, Takizawa T, Yamazaki I, Kuraishi J. Repair of articular cartilage and clinical outcome after osteotomy with microfracture or abrasion arthroplasty for medial gonarthrosis. *Knee.* 2007;14(6):465-71.

(89) Steadman JR, Rodkey WG, Brigs K, Rodrigo J. The microfracture technique in the management of complete cartilage defects in the knee joint. *Orthopade.* 1999;28(1): 26-32.

(90) Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo J. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;391:362-9.

(91) Steadman JR, rodkey WG, Singleton SB, et al: Microfracture technique for full-thickness chondral defects: Technique and clinical results. *Operative Techniques Orthop* 7(4):300.

(92) Lexer E: Substitution of whole or half joints from fersly amputated extremities by free plastic operation. *Surg Gynecol Obstet.* 1908; 6:601.

(93) Czitrom AA, Langer F, McKee N, Gross AE. Bone and cartilage allotransplantation. A review of 14 years of research and clinical studies. *Clin Orthop Relat Res.* 1986; 208:141-5.

(94) Matsusue Y, Yamamuro T, Hama H: Arthroscopic multiple osteochondral transplantation to the chondral defect in the knee associated with anterior cruciate ligament disruption (case report). *Arthroscopy.* 1993;9:318

(95) Hangody L, Kish G, Karpati Z, Szerb I, Udvarhelyi I. Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicoplasty for the treatment of femoral condylar articular defects. A preliminary report. *Knee Surg Spots Traumatol Arthrosc.* 1997;5(4):262-7.

(96) Bobic V: Arthroscopic osteochondral autograft in anterior cruciate ligament reconstruction: A preliminary clinical study. *Arthroscopy.* 1996; 3:252.

(97) Gross AL: Fresh osteochondral allografts for posttraumatic knee defects: Surgical technique. *Operative Techniques Orthop.* 1997; 7 (4): 312.

- (98) Hangody L, Vásárhelyi G, Hangody LR, Sükösd Z, Tibay G, Bartha L et al. Autologous osteochondral grafting-technique and long-term results. *Injury*. 2008; 39:32-9.
- (99) Szerb I, Hangody L, Duska Z, Kaposi NP. Mosaicoplasty: long term follow-up. *Bull Hosp Jt Dis*. 2005;63:54-62.
- (100) Pässler HH. Microfracture for treatment of cartilage defects. *Zentralbl Chir*. 2000;125(6):500-4.
- (101) Hunziker EB, Stähli A. Surgical suturing of articular cartilage induces osteoarthritis-like changes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(9):1067-73.
- (102) Homminga GN, van der Linden TJ, Terwindt-Rouwenhorst EA, Drukker J. Repair of articular defects by perichondrial grafts. Experiments in the rabbit. *Acta Orthop Scand*. 1989; 60(3):326-9.
- (103) Bruns J, Steinhagen J. Treatment of deep hyalin cartilage defects with autologous perichondrial grafts. *Int J Sports Med*. 2003;24(5):382-8.
- (104) Chesterman PJ, Smith AU: Homotransplantation of articular cartilage and isolated chondrocytes: An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg Br*. 1968; 50:184.
- (105) Grande PA, Pitman MI, Peterson L, et al. The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte implantation. *J Orthop Res*. 1989; 7:208.
- (106) Peterson L, Menche D, Grande D, et al. Chondrocyte transplantation : An experimental model in the rabbit. In *Transactions from the 30th Annual Orthopaedic Research Society, Atlanta, February 7-9, 1984*.
- (107) Marlovits S, Zeller P, Singer P, Resinger C, Vécsei V. Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur J Radiol*. 2006;57(1):24-31.
- (108) Brittberg M, Tallheden T, Sjögren-Jansson B, Lindahl A, Peterson L. Autologous chondrocytes used for articular cartilage repair: an update. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;391: 337-48.
- (109) Min BH, Woo JI, Kim WH, Kweon OK, Triffitt JT, Choi BH et al. The fate of implanted autologous chondrocytes in regenerated articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng H*. 2007; 221(5):461-5.
- (110) Hunziker EB, Stähli A. Surgical suturing of articular cartilage induces osteoarthritis-like changes. *Osteoarthritis Cartilage*. 2008;16(9):1067-73.

- (111) Forriol F. Ingeniería tisular en el cartílago articular: estudio in vivo del proceso de regeneración mediante scaffolds bioestables [tesis doctoral]. Valencia: servicio de publicaciones, Universidad de Valencia; 2010.
- (112) Schuman L, Buma P, Versleyen D, et al. Chondrocyte behaviour within materials. 1995; 16:809-814.
- (113) Chiang H, Jiang CC. Repair of articular cartilage defects: review and perspectives. J Formos Med Assoc. 2009; 108(2):87-101.
- (114) Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, et al. Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. J Biomed Mater Res. 1994;28:891-899.
- (115) Sittinger M, Reitzel D, Dauner M, et al. Reabsorbable polyesters in cartilage engineering: affinity in biocompatibility of polymer fibres structures to chondrocytes. J Biomed Mater Res. 1996; 33:57-63.
- (116) Agrawal CM, Athanasiou KA. Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants. J Biomed Mater Res. 1997; 38:105-114.
- (117) Agrawal CM, Athanasiou KA, Heckman JD. Biodegradable PLA-PGA polymers for tissue engineering in orthopaedics. Mater Sci Forum. 1997; 250:115-128.
- (118) Athanasiou KA, Agrawal CM, Barber FA. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymers. Arthroscopy. 1998; 14:726-737.
- (119) Suggs LJ, Kao EY, Palombo LL. Preparation and characterization of poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogels. J Biomed Sci Polym Ed. 1998; 9:653-666.
- (120) Suggs LJ, Krishnan RS, García CA. In vitro cytotoxicity and in vivo biocompatibility of poly (propylene fumarate-co-ethylene glycol) hydrogels. J Biomed Mater Res. 1999; 46:22-32.
- (121) Schek RM, Taboas JM, Segvich SJ, Hollister SJ, Krebsbach PH. Engineered osteochondral grafts using biphasic composite solid freeform fabricated scaffolds. Tissue Eng. 2004;10:1376-85.
- (122) Jiang CC, Chiang H, Liao CJ, Lin YJ, Kuo TF, Shieh CS et al. Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite. J Orthop Res. 2007;25(10):1277-90.

- (123) Aydelotte MB, Grennhill RR, Kuettner KE. Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. *Connect Tissue Res.* 1988; 18: 205-22.
- (124) Yu H, Grynnpas M, Kandel RA. Composition of cartilagenous tissue with mineralized and non-mineralized zones formed in Vitro. *Biomaterials.* 1997; 18:1425-1431.
- (125) Parkkinen JJ, Lammi MJ, Inkinen R. Influence of short-term hydrostatic pressure on organization of stress fibers in cultures chondrocytes. *J Orthop Res.* 1995; 13:495-502.
- (126) Jin CZ, Park SR, Choi BH, Park K, Min BH. In vivo cartilage tissue engineering using a cell-derived extracellular matrix scaffold. *Artif Organs.* 2007;31(3):183-92.
- (127) Sellars RS, Peluso D, Morris EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1997; 79:1452-1463.
- (128) Coutts RD, Sah RL, Amiel D. Effects of growth factors on cartilage repair. *Instr Course Lect.* 1997; 46:487-494.
- (129) Gao J, Yao JQ, Caplan AI. Stem cell for tissue engineering of articular cartilage. *Proc Inst Mech Eng.* 2007; 221: 441-50.
- (130) Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 2006;20:811-27.
- (131) Smith RL, Lin J, Trindale MC, et al. Time-dependent effects of intermittent hydrostatic pressure on articular chondrocyte type II collagen and aggrecan mRNA expression. *J Rehabil Res Dev.* 2000; 37:153-161.
- (132) Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2001; 17: 435-462.
- (133) Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 2004;91:4-15.
- (134) Balazs E., Watson D., Duff I.F., Roseman S. Hyaluronic acid in synovial fluid. A molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. *Arthritis Rheum.* 1987; 10: 357-76.
- (135) MacArthur BD, Oreffo ROC. Bridging the gap. *Nature.* 2005; 433:19.
- (136) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering, *Science.* 1993; 260:290-6.

- (137) Vacanti JP, Langer R. Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet*. 1999; 354 (sup) 1:S32-4.
- (138) Schneider A, Taboas JM, McCaukey LK, Krebsbach PH. Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res*. 2003; 21:859-64.
- (139) Hansen-Angelstaedt N, Algensatedt P, Böttcher A, Jooscheck C, Schwarloh B, Schaefer C et al. Bilaterally increased VEGF-levels in muscles during experimental unilateral callus distraction. *J Orthop Res*. 2003; 21:805-12.
- (140) Vats A, Tolley NS, Buttery LDK, Polak JM. The stem cell in orthopaedic surgery. *J Bone Joint Surg (Br)*. 2004; 86-B: 159-64.
- (141) Giannoudis P, Einhorn T, Marsch D. Fracture healing: A harmony of optimal biology and optimal fixation?. *Injury*. 2007; 38 (supl 4): S1-S2.
- (142) Giannoudis P, Einhorn T, Marsch D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007; 38 (supl 4): S3-S4.
- (143) Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 2006; 355:1253-61.
- (144) Forriol F, Esparza R. Ingeniería tisular: aplicación de las células troncales pluripotenciales en cirugía ortopédica y traumatológica. *Trauma Fund Mapfre*. 2008; 19: 88-101.
- (145) Young H , Mancini M, Wright, R, Smith J., Black A. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organism. *Dev Dyn*. 1995; 202:137-44.
- (146) Zuck P, Zhu M, Mizumo H, Huang J, Futrell J, Katz A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; 7:211-28.
- (147) Fraser J, Wulur I, Alfonso Z. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*. 2006; 24:150-4.
- (148) Ailhaud G, Grimaldi P. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr*. 1992; 12:207-33.
- (149) Grimble J, Katz A, Bunnell B. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res*. 2007; 100: 1249-60.

- (150) Housman T, Lawrwnce N, Mellen B, George M, Filippo J. The safety of liposuction: results of a national survey. *Dermatol surg.* 2002; 28:971-8.
- (151) Mizuno H, Zuk P, Zhu M, Lorenz H. Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 109: 199-209.
- (152) Halvorsen Y, Franklin D, Bond A, Hitt D, Auchter C. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 2001; 7:729-41.
- (153) Hicok K, Laney T, Zhou Y, Halvorsen Y, Hitt D. Human adipose-derived adult stem cells produce osteoid in vivo. *Tissue Eng.* 2004; 10:371-80.
- (154) Erikson G, Gimble J, Franklin D, Rice H, Award H. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290:763-9.
- (155) Hong J, Yaffe M. A b-catenin-like molecule that regulates mesenchymal stem cell differentiation. *Cell Cycle.* 2006; 5(2):176-9.
- (156) Safford K, Hicok K, Halvorsen Y, Wilkinson W, Grimble J. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 2002; 294:371-9.
- (157) Timper K, Seboek D, Eberhardt M, Linscheid P, Christ-Crain M. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, simvastatin and glucagon expressing cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 2006; 341: 1135-40.
- (158) Seo M, Suh S, Bae Y, Jung J. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Comm.* 2005; 328:258-64.
- (159) Miranville A, Heeschen C, Segenés C, Curat C, Busse R. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation.* 2004; 110:349-55.
- (160) Planat-Bénard V, Menard C, André M, Puceat M, Pérez A. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circ Res.* 2004; 94:223-9.
- (161) Broska M, Geiger H, Gauer S, Baer P. Epithelial differentiation of human adipose tissue-derived adult stem cells. *Biochem Biophys Res Comm.* 2005; 330: 142-50.
- (162) Schäffler A, Büchler C. Concise Review: adipose tissue derived stromal cells. Basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 2007; 25:818-27.

(163) Lendeckel S, Jödicke A, Christophis P. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg.* 2004; 32:370-3.

(164) Mesimaki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 38:201-9.

(165) García-Olmo D, Herreros D, Pascual M, Pascual I, Quintana P. Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion. *Int J Colorectal Dis.* 2009; 24:27-30.

(166) Alvarez P, Garcia-Arranz M, Georgiev-Hristov T, García-Olmo D. A new bronchoscopic treatment of tracheomediastinal fistula using autologous adipose-derived stem cells. *Thorax.* 2008, 63:374-6.

(167) Rigotti G, Marchi A, Galié M, Baroni G. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adipose-derived adult stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2007; 119:1409-22.

(168) Singh S, Arora R, Handa K, Khraisat A, Nagajothi N, Molnar J. Stem Cells improve left ventricular function I acute myocardial infraction. *Clin Cardiol.* 2009; 32:176-80.

(169) Pecanha R, De Lima L, Bagno S, Baldanza M, Robottom A. Adipose-derived stem-cell treatment of skeletal muscle injury. *J Bone Joint Surg Am.* 2012;94:609-17.

(170) Khalafi RS, Bradford DW, Wilson MG. Topical application of autologous blood products during surgical closure following a coronary artery bypass graft. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008;34:360-4.

(171) Welsh WJ. Autologous platelet gel-clinical function and usage in plastic surgery. *Cosmetic Dermatol.* 2000;51:13-8.

(172) Hanna R, Trejo PM, Weltman RL. Treatment of intrabone defects with bovine derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2004;75:1668-77.

(173) Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P. Sinus floor augmentation with beta-tricalciumphosphate (beta-TCP): does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation? *Clin Oral Implants Res.* 2003;14:213-8.

(174) GlobalData. Platelet rich plasma: a market snapshot.<http://www.docstoc.com/docs/47503668/Platelet-Rich-Plasma-A-Market-Snapshot>. Accessed 2010 Sep 16.

(175) Woodell-May JE, Pietrzak WS. Platelet-rich plasma in orthopedics. En: Pietrzak WS, editor. *Musculoskeletal tissue regeneration: biological materials and methods*. Nueva York: Springer-Verlag; 2008. p 547-68.

(176) Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2004;91:4-15.

(177) Lopez-Vidriero E, Goulding KA, Simon DA, Sanchez M, Johnson DH. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment. *Arthroscopy*. 2010;26:269-78.

(178) Sampson S, Gerhardt M, Mandelbaum B. Platelet-rich plasma injection grafts for musculoskeletal injuries. A review. *Curr Rev Musculoskelet Med*. 2008; 1:165-174.

(179) Marx RE, Carlson ER, Eichstaed RM. Platelet-rich factor: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod*. 1998; 85:638-646.

(180) Oyama K, Kawase T, Momose M. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol*. 2003; 74: 849-857.

(181) Hildner F, Albrecht C, Gabriel C, Redl H, Van Griensven M. State of the art and future perspectives of articular cartilage regeneration: a focus on adipose-derived stem cells and platelet-derived products. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011; 5: e36-e51.

(182) Hee HT, Majd ME, Holt RT, Myers L. Do autologous growth factors enhance transforaminal lumbar interbody fusion? *Eur Spine J*. 2003;12:400-7.

(183) Sánchez M, Azofra J, Anitua E, Andía I, Padilla S, Santisteban J, et al. Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc*. 2003;35:1648-52.

(184) Akeda K, Okuma M. Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthr Cartilage*. 2006; 14:1272-1280.

(185) Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix on collagenous macromolecules. *FASEB J*. 1987; 3: 2042-51.

(186) Balazs E, Watson D, Duff F, Roseman S. Hyaluronic acid in synovial fluid. A molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritic human fluids. *Arthritis Rheum*. 1987; 10: 357-76.

- (187) Forrester JV , Balaze EA. Inhibition of phagocytosis by high molecular weight hyaluronate. *Immunology* 1980; 40: 435-48.
- (188) Balaze EA, Gibbs DS. The radiological properties and biological function of hyaluronic acid. En: Blaze EA, editor. *Chemistry and molecular biology of the intercellular matrix*. Nueva York: Academic Press; 1970: 1241-54.
- (189) Balaze EA. Physical properties of synovial fluid. En: Helfet A, *Disorders of the knee*. Philadelphia: Lippincot Ed. 1974; 63-73.
- (190) Goldberg RL, Toole BP. Hyaluronate inhibition of cell proliferation. *Arthritis Rheum.* 1987; 30: 769-78.
- (191) Anastassiades T, Robertson W. Modulation of mitogen-dependent lymphocyte stimulation by hyaluronic acid. *J Rheumatol.* 1984; 11:729-3.
- (192) Tsai W, Liu C, Cherng C, Wu J, Tsai R, Jean Y, et al. Early intraarticular injection of hyaluronic acid attenuates osteoarthritis progression in anterior cruciate ligament-transected rats. *Mod Rheumatol.* 2012; Aug 23.
- (193) Guarda-Nardini L, Olivo M, Ferronato G, Salmaso L, Bonnini S, Manfredini D. Treatment effectiveness of arthrocentesis plus hyaluronic Acid injections in different age groups of patients with temporomandibular joint osteoarthritis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012; 70(9):2048-56.
- (194) Graf Voin Der Schulenberg J-M, Allhoff PG, Niethard FU. Cost-effectiveness and quality of life of treatment of gonarthrosis with hyaluronic acid. *Rheumatology in Europe.* 1997; Supplement 2(26) 187: 46.
- (195) American College of Rheumatology. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee. Subcommittee on osteoarthritis. Guidelines. *Arthritis and Rheumatism.* 2000; 9 (43): 1905-1915.
- (196) Dougados M, Listrat V. High molecular weight sodium hyaluronate (hyalectyn) in osteoarthritis of the knee. A one year placebo-controlled trial. *Osteoarthritis Cart.* 1993; 1 (2): 97-103.
- (197) Blanco FJ. Biological action of hyaluronic acid on human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cart.* 2000; Vol 8, Supl. B, TH016:526.
- (198) Punzi L., Schiovan F. The influence of intra-articular hyaluronic acid on PGE2 and CAMP of synovial fluid. *Clin. Exp. Rheum.* 1989;(3) ;7: 247-250.

(199) Smith, G. The synthesis of hyaluronic acid by human synovial fibroblast is influenced by the nature of the hyaluronate in the extracellular environment. *Rheumatology Int.* 1987; 7: 113-122.

(200) Mensitieri M, Ambrosio L. Viscoelastic evaluation of different knee osteoarthritis therapies. *Journal of Material Science. Materials in Medicine.* 1995; 6: 10-137.

